

ИСКУССТВЕННЫЙ ПЕПТИДНЫЙ ЛИГАНД КАЛИЕВОГО КАНАЛА $K_V1.1$ С ВЫСОКОЙ СЕЛЕКТИВНОСТЬЮ

© 2021 г. В. М. Табакмахер^{1,2}, А. И. Кузьменков¹, А. М. Гиголаев¹,
Э. Л. Пиньейро-Жуниор³, С. Пеньёр³, Р. Г. Ефремов^{1,4,5},
Я. Титгат³, А. А. Василевский^{1,5,*}

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

²Школа биомедицины, Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

³Лёвенский университет, Лёвен, Бельгия

⁴Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, Москва, Россия

⁵Московский физико-технический институт (государственный университет),
Долгопрудный, Россия

*E-mail: avas@ibch.ru

Поступила в редакцию 27.11.2020 г.

После доработки 07.12.2020 г.

Принята к публикации 13.02.2021 г.

У млекопитающих обнаружено порядка 40 изоформ потенциал-чувствительных калиевых каналов (K_V). Для изучения такого разнообразия K_V необходимы вещества, которые способны селективно с ними связываться и изменять их свойства. Ранее мы сообщали о выделении и фармакологической характеристике MeKTx13-3 – пептидного токсина из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*. Этот токсин обладал высокой аффинностью к ряду K_V с незначительной селективностью в отношении изоформы $K_V1.1$. В настоящей работе мы докладываем о получении методом рационального дизайна искусственного производного MeKTx13-3, названного MeKTx13-3_RMRH. Селективность MeKTx13-3_RMRH по отношению к $K_V1.1$ была увеличена на порядок, что делает его одним из самых специфичных лигандов данной изоформы K_V . Наконец, используя компьютерное моделирование, мы продемонстрировали, что избирательность нового лиганда $K_V1.1$ может реализовываться за счет специфического положения токсина в комплексе с каналом.

Ключевые слова: нейротоксин, потенциал-зависимый калиевый канал, блокатор калиевых каналов, яд скорпиона, молекулярное моделирование, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S0869813921040130

ВВЕДЕНИЕ

Потенциал-чувствительные калиевые каналы (K_V) – трансмембранные (ТМ) белки, обеспечивающие пассивный селективный ток ионов калия через мембрану

Список обозначений: K_V – потенциал-чувствительные калиевые каналы; ChTx – харибдотоксин из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus*; IC_{50} – концентрация полуингибирования; Ttx – тиоредоксин; ТМ – трансмембранный; ПЦР – полимеразная цепная реакция; Трис-НС1 – трис(гидроксиметил)аминометан гидрохлорид; ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; МД – молекулярная динамика.

в ответ на изменение мембранного потенциала [1]. Зрелый ионный канал представляет собой тетрамер α -субъединиц, каждая из которых сформирована шестью ТМ сегментами (S1–S6) с одним поровым участком (P) между S5 и S6 [2]. Поровый домен канала образуется сближенными S5 и S6 всех четырех α -субъединиц. Кроме того, в составе K_v могут быть вспомогательные β -субъединицы, которые способны модифицировать свойства канала [3]. Отличительной особенностью K_v является наличие потенциал-чувствительных доменов, образованных четырьмя ТМ сегментами (S1–S4) каждой из α -субъединиц [4, 5]. Согласно последнему руководству Международного союза фундаментальной и клинической фармакологии (IUPHAR), у человека известно порядка 40 генов α -субъединиц K_v , которые называют изоформами [6]. В зависимости от локализации, а также выполняемых функций, K_v могут быть сформированы одинаковыми или разными α -субъединицами, то есть представлять собой гомо- или гетеромеры [7, 8].

Изучение структурных особенностей, физиологических и фармакологических характеристик K_v тесно сопряжено с применением их лигандов [9–11], которые можно разделить на несколько групп. Перечислим основные: (а) ионы металлов, например Cs^+ и Ba^{2+} [12, 13]; (б) небольшие органические молекулы, такие как 4-аминопиридин и тетраэтиламмоний [14]; и (в) полипептидные токсины, например, харибдотоксин (ChTx) и дендротоксин [15]. Пожалуй, самым богатым источником лигандов K_v выступают яды различных животных, таких как змеи, морские анемоны, улитки конусы, пауки и скорпионы [16]. Токсины скорпионов, несомненно, сыграли ключевую роль в изучении K_v : от пионерских работ по ингибированию калиевого тока в гигантском аксоне кальмара с помощью ноксистоксина из яда скорпиона *Centruroides noxius* [17, 18] до получения кристаллической структуры комплекса K_v с ChTx из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus* [19, 20]. В настоящий момент, согласно базе данных Kalium (<https://kaliumdb.org/>), известно и охарактеризовано приблизительно 350 полипептидных лигандов калиевых каналов, более половины (~200) из которых — это токсины, выделенные из яда скорпионов [21, 22].

Большинство токсинов скорпионов, действующих на K_v , состоят из 30–50 аминокислотных остатков, 6 или 8 из которых — остатки цистеина, образующие 3 или 4 внутримолекулярные дисульфидные связи соответственно [16, 23]. При этом в пространстве формируется характерная укладка, получившая название $CS\alpha/\beta$ (цистеин-стабилизированные α -спираль и β -слой) [24, 25]. Несмотря на общность пространственной структуры, токсины могут проявлять различные фармакологические характеристики, избирательно действуя на ту или иную изоформу K_v . Считается, что селективность определяется конкретными аминокислотными остатками токсина, которые формируют специфические контакты с поровым доменом канала [26–28]. В свою очередь, эти особенности могут быть использованы для рационального дизайна искусственных производных с заданными свойствами на базе общего молекулярного каркаса [29–31].

Ранее мы сообщали об идентификации и характеристике токсина MeKTx13-3 (Kalium ID: α -KTx 3.19, UniProt ID: C0HJQ6, 37 аминокислотных остатков, три дисульфидные связи) из яда среднеазиатского скорпиона *Mesobuthus eupeus* [32]. Мы провели фармакологическую характеристику этого полипептида и с помощью электрофизиологических методов установили, что он способен ингибировать калиевый ток через некоторые гомотетрамерные K_v , а именно: $K_v1.1$, 1.2, 1.3 и 1.6 с концентрациями полунгибирования (IC_{50}) ~ 2, 100, 10 и 60 нМ соответственно. У этого токсина была обнаружена селективность действия в отношении $K_v1.1$, а не $K_v1.2$ или 1.3, что является достаточно редким свойством полипептидных лигандов

Таблица 1. Список олигонуклеотидов, использованных для конструирования гена MeKTx13-3_RMRH

Название	Последовательность 5'–3'
F1	GCGATAG GGTACC GACGATGACGATCGTGTGGGCATTAATGTGAAATGC
F2	CAGTGCCTGAAACCGTGCAAAGATGCGGGCATGCGTTTTGGCAAATGC
R1	TATCGGGAT TCCCTA TTTCGGGGTGCAATGGCATT TACGATT CATGCATTGGCCAAAACGC
R2	TGCACGGTTTCAGGCACTG ACGG GAATGTTTGCATTTACATTAATGCC

Сайты рестрикции выделены жирным шрифтом; стоп-кодон выделен курсивом; кодоны, кодирующие сайт расщепления энтеропептидазой, подчеркнуты; кодоны, различающиеся с MeKTx13-3, показаны на сером фоне.

K_v [23]. Теперь мы докладываем, что внесение ряда замен в аминокислотную последовательность MeKTx13-3 позволило нам получить более селективный по отношению к K_v 1.1 пептид – MeKTx13-3_RMRH. С помощью методов молекулярного моделирования структуры и динамики комплексов этого производного MeKTx13-3 с гомотетрамерами K_v 1.1–1.3 мы установили, что избирательность его действия может реализовываться за счет специфического положения токсина в комплексе с каналом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Заявление об этике. Наше исследование строго соответствовало Международным методическим рекомендациям по биомедицинским исследованиям с использованием животных Всемирной организации здравоохранения. Исследование проводилось в организации, аккредитованной AAALAC, в соответствии со стандартами Руководства по уходу и использованию лабораторных животных (8-е издание, Институт лабораторных исследований животных). Лягушки *Xenopus laevis* использовались в лаборатории токсикологии и фармакологии в соответствии с лицензией LA1210239, что было одобрено этическим комитетом по экспериментам на животных Лёвенского университета (P186/2019). Уход за животными и экспериментальные процедуры проводились в соответствии с методическими рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 18.III.1986).

Получение рекомбинантных пептидов. Рекомбинантный MeKTx13-3_RMRH был получен по общей схеме, использованной нами ранее [31]. Целевой пептид получали в бактериальной системе экспрессии в виде слитного белка с тиоредоксином (Txh) [33], который расщепляли рекомбинантной легкой цепью энтеропептидазы человека [34]. Последовательность ДНК, кодирующая MeKTx13-3_RMRH, была сконструирована из частично комплементарных синтетических олигонуклеотидов с помощью ПЦР за два этапа. Сначала в течение пяти циклов использовали четыре олигонуклеотида (F1, F2, R1 и R2, см. табл. 1) для сборки полной последовательности гена. Затем с использованием краевых олигонуклеотидов (F1 и R1) и разбавленной реакционной смеси из первого раунда в качестве матрицы во втором раунде ПЦР был амплифицирован целевой фрагмент ДНК.

Полученный в результате ПЦР фрагмент клонировали в экспрессионный вектор pET-32b (Novagen) по сайтам рестрикции KpnI и BamHI. Штамм *Escherichia coli* SHuffle T7 Express (New England Biolabs) трансформировали вектором со вставкой целевого гена и культивировали при 30°C в среде LB до $OD_{600} \sim 0.6$. Экспрессию трансгена индуцировали добавлением 0.2 мМ изопропил- β -D-1-тиогактопиранозидом. Культуру культивировали при комнатной температуре (24°C) в течение ночи (16 ч), после чего клеточную массу осаждали центрифугированием. Осадок клеток ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 300 мМ NaCl и 50 мМ

Трис-НСI (рН 8.0), и обрабатывали ультразвуком. Лизат наносили на металл-хелатную колонку HisPur (ThermoFisher Scientific); слитный белок с Тгх очищали в соответствии с протоколом производителя.

Очищенный слитный белок растворяли в 50 мМ Трис-НСI (рН 8.0) в концентрации 1 мг/мл и гидролизовали в течение ночи (16 ч) при 37°C легкой цепью энтеропептидазы человека (1 ед. фермента на 1 мг субстрата). MeKTx13-3_RMRH очищали обращенно-фазовой (ОФ) ВЭЖХ в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–60% за 60 мин) в присутствии 0.1%-ной трифторуксусной кислоты на колонке Jupiter C5 (4.6 × 250 мм; Phenomenex). Чистоту целевого пептида проверяли с использованием масс-спектрометрии и аналитической хроматографии на колонке Vydac C18 (4.6 × 250 мм; Separations Group) в том же градиенте ацетонитрила.

Масс-спектрометрия. Измерение молекулярной массы пептида проводили с использованием МАЛДИ масс-спектрометрии с времяпролетным масс-анализатором на приборе Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik), как описано ранее [35]. В качестве матрицы была использована 2,5-дигидроксibenзойная кислота (Sigma-Aldrich). 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).

Экспрессия ионных каналов. Подробно общий подход к экспрессии ионных каналов в ооцитах был описан ранее [36]. Для экспрессии генов K_V (крысы (r) $K_V1.1$, $K_V1.2$, человека (h) $K_V1.3$, $K_V1.4$, $K_V1.5$ и $K_V1.6$) в ооцитах *X. laevis* линейаризованные плазмиды, содержащие соответствующие нуклеотидные последовательности генов, были транскрибированы с использованием набора T7 mMESSAGE-mMACHINE (Ambion). 50 нл раствора кРНК (1 нг/нл) вводили в ооциты с помощью микроинжектора (Drummond Scientific). Ооциты инкубировали в растворе ND96, содержащем: (мМ) 96 NaCl, 2 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂ и 5 HEPES, рН 7.4, с добавлением сульфата гентамицина (50 мг/л).

Электрофизиологические исследования. Измерения токов через мембрану ооцитов проводились методом двухэлектродной фиксации потенциала при комнатной температуре (18–22°C) с использованием усилителя Geneclamp 500 (Molecular Devices) под управлением системы сбора данных pClamp (Axon Instruments), как описано ранее [36]. В качестве омывающего раствора использовали ND96, потенциал покоя выставляли равным –90 мВ. Токи, опосредованные K_V , индуцировали деполяризацией до 0 мВ в течение 250 мс, после чего потенциал удерживали при –50 мВ в течение 250 мс. Для исследования вольтамперной характеристики токи вызывали последовательной деполяризацией мембраны с шагом в 10 мВ. Для оценки концентрационной зависимости эффектов были построены кривые доза–эффект, где процент ингибирования тока выражен как функция концентрации токсина. Кривые были построены по уравнению Хилла:

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

где y – доля ингибированного тока, IC_{50} – концентрация токсина, при которой достигается полумаксимальное ингибирование, $[\text{токсин}]$ – концентрация токсина, h – коэффициент Хилла. Сравнение двух выборочных средних было выполнено с использованием парного критерия Стьюдента ($p = 0.05$ использовалось в качестве порога значимости). Все данные были получены как минимум в трех независимых экспериментах ($n \geq 3$) и представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего. Обработка полученных результатов проводилась с использованием программы Origin (OriginLab Corporation).

Молекулярное моделирование. Структурная модель MeKTx13-3_RMRH была построена в программе PyMOL Molecular Graphics System, версия 1.8 (Schrödinger,

LLC), с использованием процедуры *in silico* мутагенеза. Поскольку аминокислотная последовательность MeKTx13-3 идентична VmKTX [37], пространственная структура последнего (PDB ID: 1BKT) [38] была использована в качестве шаблона. Модели K_V1.1 и 1.3 были сгенерированы ранее [31, 39–41] в программе MODELLER [42] с использованием структуры K_V1.2 (3LUT) [43] в качестве шаблона.

Комплексы MeKTx13-3_RMRH с калиевыми каналами моделировали согласно процедуре, описанной в предыдущих работах [31, 39–41], предполагая, что токсин взаимодействует с K_V аналогично ChTx [44]. Модель комплекса MeKTx13-3_RMRH с K_V1.2 была построена на основе структуры комплекса K_V1.2/2.1–ChTx (4JTA) [20]: пептид пространственно выравнивали со структурой ChTx в комплексе с каналом, затем удаляли ChTx, оставляя выровненный токсин. Комплексы с K_V1.1 и 1.3 были созданы аналогичным образом, однако первым шагом было пространственное выравнивание моделей каналов с химерой K_V1.2/2.1 [31, 39–41].

Молекулярная динамика. Подготовку исследуемых молекулярных систем к моделированию молекулярной динамики (МД) проводили автоматически, с использованием оригинального программного пакета IMPULSE (Крылов и др., готовится к печати). Процедура включала несколько этапов. Полученные комплексы MeKTx13-3_RMRH с K_V помещали внутрь липидного бислоя, имитирующего мембрану нейронов. Был использован предварительно уравновешенный фрагмент бислоя (7.0 × 7.0 × 13.5 нм³; 1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин/1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин/холестерин, POPC : POPE : Chl; 100 : 50 : 50 молекул соответственно, сольватированных 14172 молекулами воды), что подробно описано в предыдущих работах [41, 45, 46]; некоторые молекулы фосфолипидов и холестерина были удалены, чтобы освободить место для белка. Для сольватации использовали модель воды TIP3P [47] и ионы Na⁺/Cl⁻ в количестве, необходимом для поддержания электронейтральности системы.

Все системы были уравновешены (нагреты до 37°C) в течение 100 пс моделирования МД. Положения C^α-атомов остатков канала, не формирующих вестибуль его поры, а также N^ε-атом остатка Lys26 у MeKTx13-3_RMRH фиксировали во время уравнивания для предотвращения дестабилизации исходного комплекса. Затем рассчитывали МД систем длительностью 500 нс. Все молекулярно-динамические эксперименты были выполнены с помощью программного обеспечения GROMACS [48] (версия 2018) с использованием набора параметров AMBER99SB-ILDN [49]. Моделирование проводили с шагом по времени 2 фс с использованием трехмерных периодических граничных условий, в изотермическом-изобарическом (NPT) ансамбле с полуизотропным давлением 1 бар и при температуре 37°C. Использовали алгоритмы баростата Берендсена [50] и термостата V-rescale [51]. Вандер-ваальсовы взаимодействия рассчитывали с применением сферической функции обрезания потенциала с отсечкой 1.4 нм. Электростатические взаимодействия учитывали с помощью алгоритма PME. Во время моделирования положение N^ε-атома остатка Lys26 токсина в каждом комплексе фиксировали внутри поры канала.

Анализ межмолекулярных контактов и оценку вкладов аминокислотных остатков в энергию межмолекулярного взаимодействия в ходе МД выполняли с использованием программного пакета IMPULSE (Крылов и др., готовится к печати) аналогично процедурам, подробно описанным в предыдущих исследованиях [31, 41]. Водородные связи оценивали с использованием параметров утилиты hbond пакета GROMACS [48] (расстояние D–A ≤ 0.35 нм и угол D–H–A ≥ 150° для водородной связи D–H…A, где D и A – донор и акцептор водородной связи соответственно); солевые мостики, π-катионные и стэкинг-взаимодействия, а также гидрофобные контакты рассчитывали, как описано ранее [52, 53]. Оценку энергии межмолекулярных невалентных

взаимодействий осуществляли с использованием силового поля AMBER99SB-ILDN [49] с отсечкой по расстоянию 1.4 нм. Для визуализации молекул использовали программу PyMOL. Графики профилей энергии взаимодействия строили с помощью стандартных библиотек Python и пакета NumPy.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Стратегия создания нового лиганда K_V . Благодаря ряду предыдущих исследований были выявлены ключевые аминокислотные остатки токсинов семейства α -КТх 3, обуславливающие высокое сродство к изоформе $K_V1.3$. Так, мутагенез $VmKTx$, имеющего ту же аминокислотную последовательность, что и $MeKTx13-3$, показал, что замена $Asp33His$ в несколько раз усиливает его активность в отношении $K_V1.3$ [54]. Другой мутантный вариант $VmKTx$, названный $ADWX-1$ и содержащий остатки $Arg11$ и $His33$, блокирует K_V в субнанолярных концентрациях [29], тогда как замена этих остатков ($Arg11Ala$ или $His33Ala$) приводит к значительному снижению активности. Кроме того, $AgTx-2$ [30, 55], $OSK-1$ [56] и некоторые другие токсины, которые имеют остатки $Arg12$, $Met29$, $Arg31$ и $His34$ (соответствуют $Arg11$, $Met28$, $Arg30$ и $His33$ в токсинах α -КТх 3, лишенных N-концевого остатка глицина), также были описаны как высокоэффективные блокаторы $K_V1.3$ (табл. 2). Мы решили внести соответствующие четыре замены в структуру $MeKTx13-3$ ($Gly11Arg$, $Leu28Met$, $Gly30Arg$ и $Asp33His$), ожидая получить при этом новый высокоселективный блокатор $K_V1.3$. Неожиданно полученный пептид $MeKTx13-3_RMRH$ продемонстрировал высокое сродство к $K_V1.1$, в то время как его активность в отношении $K_V1.3$ не изменилась.

Получение рекомбинантного токсина. Рекомбинантный $MeKTx13-3_RMRH$ получали в штамме *E. coli* SHuffle В по нашему стандартному протоколу. Кодирующую токсин последовательность ДНК клонировали в экспрессионный вектор $pET-32b$ по сайтам рестрикции $KpnI$ и $BamHI$. Trx был использован в качестве белка-помощника для обеспечения правильного расположения дисульфидных связей. После гидролиза слитного белка целевой пептид был очищен с помощью ОФ-ВЭЖХ (рис. 1) и идентифицирован с использованием МАЛДИ масс-спектрометрии и сравнения расчетной и экспериментально установленной молекулярной массы. Конечный выход пептида составил ~ 3.5 мг с одного литра бактериальной культуры.

Электрофизиологическое исследование $MeKTx13-3_RMRH$. Характеристика фармакологической активности $MeKTx13-3_RMRH$ проводилась посредством электрофизиологического исследования на ряде изоформ K_V методом двухэлектродной фиксации потенциала. На рис. 2 приведены записи токов через гомотетрамерные калиевые каналы различных изоформ ($K_V1.1-1.3$) до и после добавления токсина в концентрации 1 нМ. Хорошо видно, что $MeKTx13-3_RMRH$ проявляет высокую селективность в отношении $K_V1.1$. В больших концентрациях он также ингибировал изоформы $K_V1.2$, 1.3 и 1.6, в то время как на $K_V1.4$ и 1.5 эффект отсутствовал вплоть до концентрации 1 мкМ (данные не показаны). Для всех изоформ K_V , на которых наблюдался эффект, были построены кривые концентрационной зависимости ингибирования (рис. 2, снизу) и рассчитаны значения IC_{50} , составившие 0.11 ± 0.02 , 10.7 ± 0.8 , 8.1 ± 0.2 и 16.3 ± 1.0 нМ для $K_V1.1$, 1.2, 1.3 и 1.6 соответственно.

Молекулярное моделирование. В нашем недавнем исследовании, посвященном молекулярному дизайну селективного блокатора $K_V1.3$, были проанализированы структурные и динамические детали взаимодействия $MeKTx13-3$ с K_V [31]. В текущей работе мы выполнили компьютерное исследование комплексов мутированно-го варианта этого пептида, названного $MeKTx13-3_RMRH$, с калиевыми канала-

Таблица 2. Аминокислотные последовательности токсинов семейства α -КТх 3, их мутантов и синтетических аналогов с активностью, изученной на K_V

Токсин Название и источник данных	Аминокислотная последовательность и нумерация остатков ^a								Активность, нМ ^b				
	01	05	10	15	20	25	30	35	38	$K_V1.1$	$K_V1.2$	$K_V1.3$	$K_V1.6$
KTx-1 [30]	GVEINVRC	SGSPQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CMNRK	CHCTPK				1.1 ^{d,v}	20 ^{d,v}	0.1 ^{d,v}	
AgTx-2 [30, 55]	GVEINVRC	CTGSPQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CMNRK	CHCTPK				0.044 ^{i,v}	3.4 ^{d,v}	0.004 ^{i,v}	0.037 ^{i,v}
Aam-KTx [57]	GVEINVRC	CTGSHQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINRK	CHCTPK-NH ₂				>750 ^{c,v}	10.4 ^{c,v}	1.1 ^{c,v}	
AgTx-1 [55]	GVEINVRC	CTGSPQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CHCTPK				136 ^{i,v}		1.7 ^{i,v}	149 ^{i,v}
OsK-1 [56]	GVIINVRC	KTISRQ	CLPCKK	DAGMRFGK	CMNGK	CHCTPK				0.6 ^{c,p}	5.4 ^{c,p}	0.014 ^{c,p}	>1000 ^{c,p}
BoiTx1 [58]	GVEINVRC	CRGRD	CLDPCK	DAGMRFGK	CINSGK	CHCTPK				550/50 ^{c,v}		550/50	
OdK2 [59]	GVEITDVC	CRGSPQ	CLPCKD	DAGMRFGK	CMNGK	CHCTPK				>35 ^{c,v}	>35 ^{c,v}	7.2 ^{c,v}	>35 ^{c,v}
MeKTx13-2 [32, 60]	-REI	PVCK	SGSKQ	CLOSCK	AGMTY	GKCMNGK	NC	TPK-NH ₂		90.3 ^{c,v}	2677.7 ^{c,v}	311.7 ^{c,v}	266.3 ^{c,v}
MeuKTx-3 [61]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CMNGK	CD	TPK-NH ₂		0.203 ^{c,v}	8.92 ^{c,v}	0.172 ^{c,v}	2000/93 ^{c,v}
MeKTx13-3 [32, 60]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK-NH ₂		1.9 ^{c,v}	105 ^{c,v}	8.9 ^{c,v}	63.4 ^{c,v}
MeKTx13-3_AAAR [31]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLPCKD	DAGMRFGK	CINGK	CR	TPK		541.5 ^{c,v}	218.2 ^{c,v}	9.1 ^{c,v}	1522.3 ^{c,v}
MeKTx13-3_RMRH (эта работа)	-VG	INVR	CKHSRQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CMNRK	CH	CTPK		0.11 ^{c,v}	10.7 ^{c,v}	8.1 ^{c,v}	16.3 ^{c,v}
BmKTx [54, 61]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK-NH ₂		2000/100 ^{i,v}	2000/73 ^{i,v}	0.090 ^{c,p}	2000/91 ^{i,v}
BmKTx (N4A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				0.437 ^{c,p}	
BmKTx (K6A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				0.581 ^{c,p}	
BmKTx (K8A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				0.410 ^{c,p}	
BmKTx (H9A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				2.140 ^{c,p}	
BmKTx (Q12A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				0.930 ^{c,p}	
BmKTx (K15A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLPCKD	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				0.055 ^{c,p}	
BmKTx (K18A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				3.898 ^{c,p}	
BmKTx (M22A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				0.454 ^{c,p}	
BmKTx (R23A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				175.706 ^{c,p}	
BmKTx (F24A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				9.700 ^{c,p}	
BmKTx (K26N) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				5.457 ^{c,p}	
BmKTx (K31A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				0.821 ^{c,p}	
BmKTx (T35A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				0.134 ^{c,p}	
BmKTx (P36A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CD	TPK				1.460 ^{c,p}	
BmKTx-D33H [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CH	CTPK				0.015 ^{c,p}	
BmKTx-D33H (R23A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CH	CTPK				27.218 ^{c,p}	
BmKTx-D33H (F24A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CH	CTPK				20.998 ^{c,p}	
BmKTx-D33H (K26A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CH	CTPK				4.555 ^{c,p}	
BmKTx-D33H (I28A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CANGK	CH	CTPK				0.721 ^{c,p}	
BmKTx-D33H (N29A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CIAGK	CH	CTPK				6.164 ^{c,p}	
BmKTx-D33H (H33A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CA	CTPK				0.430 ^{c,p}	
BmKTx-D33H (T35A) [54]	-VG	INVR	CKHSGQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CINGK	CH	CDTPK				0.340 ^{c,p}	
ADWX-1 [29]	-VG	INVR	CKHSRQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CTINGK	CH	CTPK		0.65 ^{c,p}	>100 ^{c,p}	0.002 ^{c,p}	
ADWX-1 (R11A) [29]	-VG	INVR	CKHSAQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CTINGK	CH	CTPK				0.336 ^{c,p}	
ADWX-1 (R23A) [29]	-VG	INVR	CKHSRQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CTINGK	CH	CTPK				7.344 ^{c,p}	
ADWX-1 (F24A) [29]	-VG	INVR	CKHSRQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CTINGK	CH	CTPK				4.013 ^{c,p}	
ADWX-1 (K26A) [29]	-VG	INVR	CKHSRQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CTINGK	CH	CTPK				9.674 ^{c,p}	
ADWX-1 (T28A) [29]	-VG	INVR	CKHSRQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CANGK	CH	CTPK				0.058 ^{c,p}	
ADWX-1 (N29A) [29]	-VG	INVR	CKHSRQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CTAGK	CH	CTPK				0.454 ^{c,p}	
ADWX-1 (H33A) [29]	-VG	INVR	CKHSRQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CTINGK	CA	CTPK				0.077 ^{c,p}	
ADWX-1 (T35A) [29]	-VG	INVR	CKHSRQ	CLKPKCK	DAGMRFGK	CTINGK	CH	CDTPK				0.028 ^{c,p}	

a – нумерация остатков для пептидов с N-концевым остатком глицина показана над последовательностями, нумерация для остальных пептидов показана под последовательностями; –NH₂ указывает на C-концевое амидирование природного токсина. Консервативные остатки цистеина показаны жирным шрифтом; остатки, которые отличают пептиды от MeKTx13-3, показаны на сером фоне; наиболее частые замены выделены жирным шрифтом на сером фоне. *b* – значения показаны в следующих форматах: *X* – значение K_d , K_i или IC_{50} в нМ; $>X$ – токсин не действовал до значения *X*; X/Y – означает, что токсин в концентрации *X* снижает ионный ток через канал на *Y* процентов. Тип данных: *c* – полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}); *d* – константа диссоциации (K_d); *i* – константа ингибирования (K_p). Примененные экспериментальные методы: *v* – электрофизиология с использованием метода двухэлектродной фиксации потенциала; *p* – электрофизиология с использованием техники локальной фиксации потенциала. Данные об аминокислотных последовательностях, N-концевом амидировании и активности токсинов получены с использованием базы данных Kalium [22].

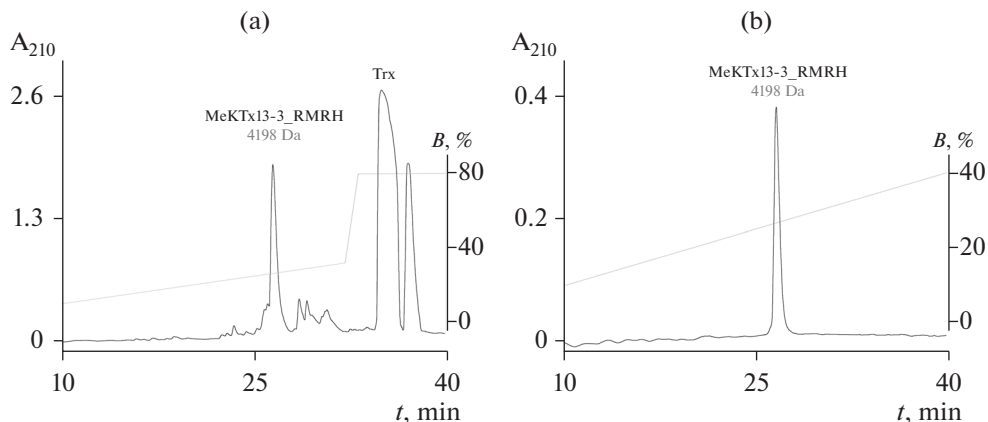


Рис. 1. Получение MeKTx13-3_RMRH. (a) – ОФ-ВЭЖХ: выделение рекомбинантного MeKTx13-3_RMRH из гидролизата слитного белка, расщепленного легкой цепью энтерокиназы человека. (b) – очистка целевого пептида с помощью ОФ-ВЭЖХ.

ми, для выяснения причин неожиданной специфичности к $K_v1.1$. Мы построили модели пространственной структуры комплексов MeKTx13-3_RMRH с $K_v1.1$ –1.3, рассчитали траектории МД комплексов, встроенных в липидный бислой, проанализировали межмолекулярные контакты и вклады остатков в энергию взаимодействия канал–токсин, а также сравнили результаты с данными для MeKTx13-3 (см. рис. 3, 4b–d, 5, табл. 3).

Согласно результатам компьютерного исследования, замена Ile28Met не приводит к заметному изменению межмолекулярных контактов или энергии межмолекулярных взаимодействий (рис. 3). Число и качество межмолекулярных контактов, образованных остатком 28 в комплексах MeKTx13-3 и MeKTx13-3_RMRH, различаются незначительно (табл. 3). Это наблюдение хорошо согласуется с экспериментальными данными, демонстрирующими, что мутация Ile28Met не приводит к функциональным изменениям токсина при переходе от VmKTx к MeuKTx-3 (табл. 2) [61].

Как было отмечено в нашей предыдущей работе [31], остаток Asp33 у MeKTx13-3 вносит значительный положительный вклад в энергию взаимодействия (снижает аффинность) (рис. 3) из-за электростатического отталкивания от консервативного отрицательно заряженного остатка в вестибуле канала (Asp377/375/399 у $K_v1.1/1.2/1.3$, см. рис. 4a). Неудивительно, что замена Asp33His в MeKTx13-3_RMRH нивелирует неблагоприятный энергетический вклад. Кроме того, His33 образует водородную связь в комплексе с $K_v1.1$ (His33-Gly376, см. рис. 4c). Таким образом, преимущества замены Asp33His для стабилизации комплекса MeKTx13-3_RMRH– $K_v1.1$ не подлежат сомнению. Однако маловероятно, что этот остаток является существенным для увеличения специфичности к $K_v1.1$, наблюдаемом при переходе от MeKTx13-3 к MeKTx13-3_RMRH, поскольку (a) His9 образует две водородные связи с $K_v1.2$, что может вносить вклад в увеличение сродства к этому каналу (табл. 2); (б) замена Asp33Arg в MeKTx13-3_AAAR [31] (привносит благоприятный вклад в энергию взаимодействия и обеспечивает множество возможностей для образования полярных контактов) не предотвратила уменьшение сродства к $K_v1.1$, вызванное другими заменами.

Другие замененные остатки у MeKTx13-3_RMRH, Arg11 и Arg30, вносят значительный благоприятный вклад в энергию взаимодействия (рис. 3). Более того, эти модификации приводят к образованию двенадцати (четверть от общего числа)

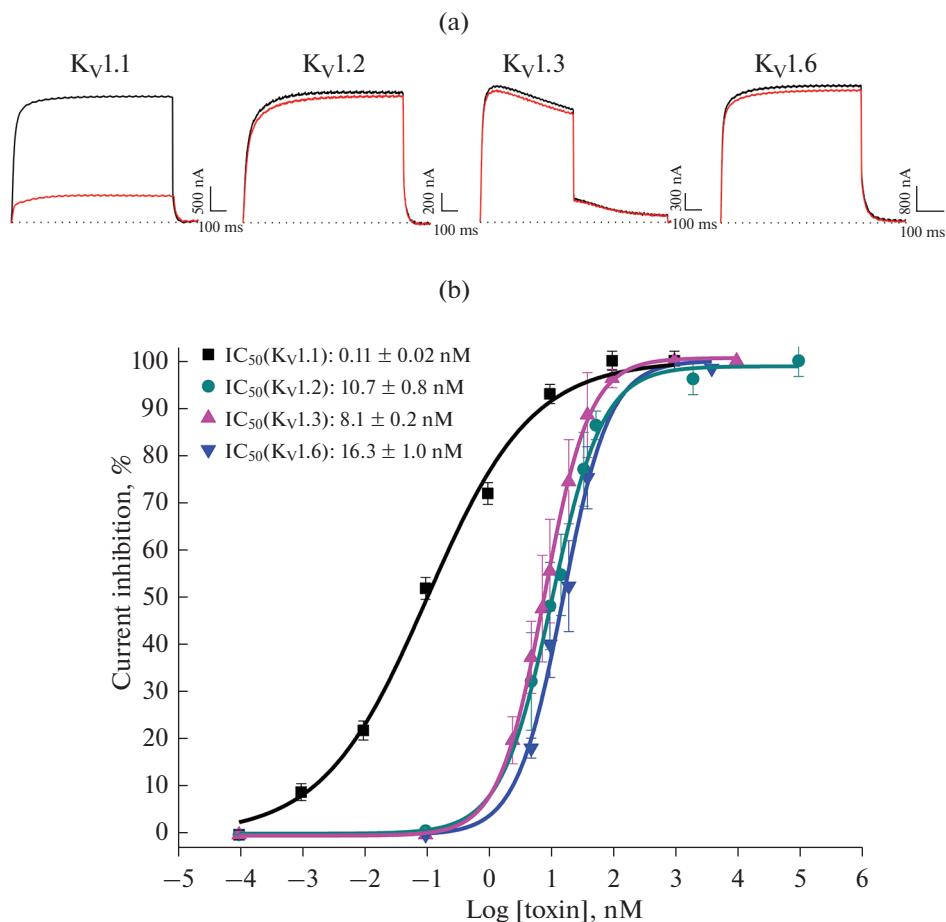


Рис. 2. Фармакологическая характеристика MeKTx13-3_RMRH. (a) – записи тока через мембрану ооцитов *X. laevis*, опосредованного каналами K_V , в контроле (черные кривые) и после добавления 1 нМ пептида (красные кривые). (b) – зависимость уровня ингибирования каналов K_V 1.1–1.3 и 1.6 от концентрации токсина по результатам электрофизиологических экспериментов.

межмолекулярных контактов (табл. 3): трех водородных связей и трех солевых мостиков (Arg11–Asp361, Arg11–Asp377, Arg30–Asp361, см. рис. 4c, d), а также трех π - π - и трех π -катионных взаимодействий (Arg11–His355, Arg11–Phe356, Arg30–Phe356) в комплексе с K_V 1.1. Стоит отметить, что аналогичные контакты невозможны в комплексах MeKTx13-3 с K_V , поскольку остатки Gly11 и Gly30 не имеют боковых цепей.

Тем не менее, контакты, образованные Arg11 и Arg30, сами по себе не объясняют высокую специфичность MeKTx13-3_RMRH к K_V 1.1. Эти замены не вызывают столь значительного увеличения сродства к K_V 1.2 и 1.3, хотя они также участвуют во множестве взаимодействий с этими двумя каналами. Очевидно, что контакты Arg11 и Arg30 способствуют оптимальному положению токсина и ориентации участков канала для возникновения других взаимодействий в комплексе с K_V 1.1, что в конечном итоге и обуславливает специфичность пептида. В частности, контакты Arg30–Asp361 и Arg30–Phe356 фиксируют участок канального белка между

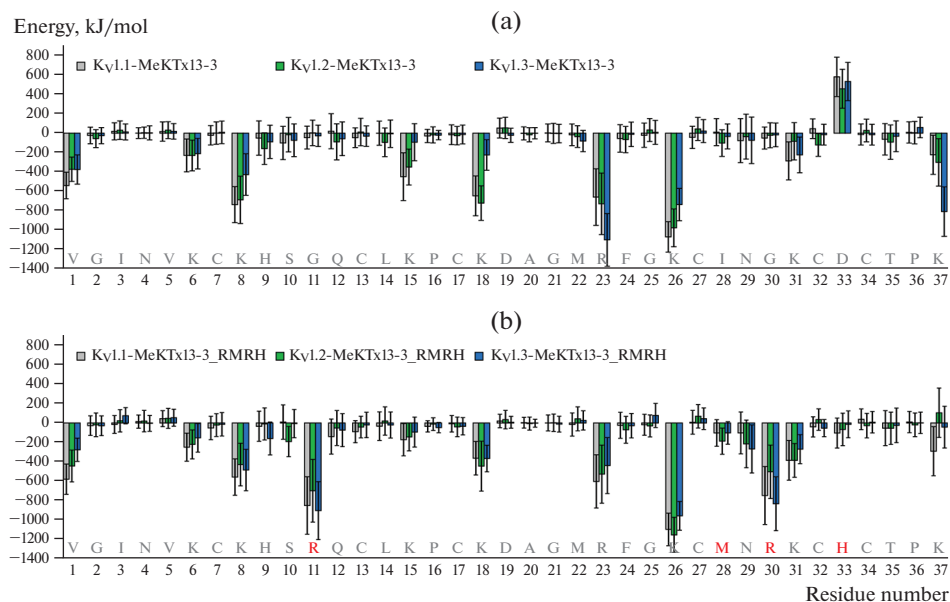
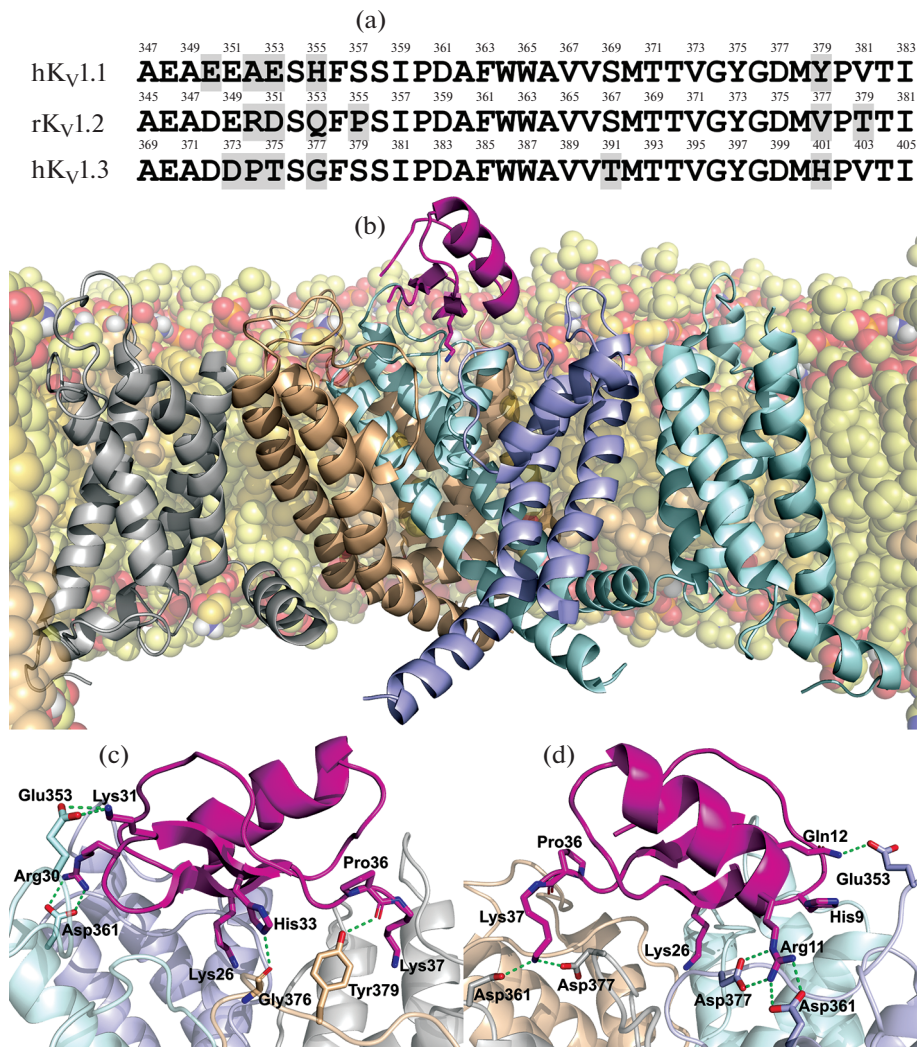


Рис. 3. Профили энергии взаимодействия пептидных токсинов в комплексах с Kv1.1–1.3. (a) – профиль MeKTx13-3; (b) – MeKTx13-3_RMRH. Гистограммы показывают вклады остатков в энергию взаимодействия, усредненные по траектории МД. Планки погрешностей отражают стандартные отклонения. Аминокислотные последовательности показаны над номерами остатков; замены в MeKTx13-3_RMRH показаны красным шрифтом. Данные для MeKTx13-3 были описаны в предыдущем исследовании [31].

остатками Phe356 и Asp361 рядом с токсином в комплексе MeKTx13-3_RMRH–Kv1.1. Такая фиксация может ограничивать подвижность соседнего фрагмента канала между остатками Glu353 и His355, обеспечивая оптимальное положение Glu353 для образования водородной связи и солевого мостика с остатком пептида Lys31 (рис. 4, 5). Аналогичные контакты не реализуются в комплексах с Kv1.2/1.3, поскольку боковые цепи соответствующих остатков Asp351/Thr375 не могут достичь ϵ -аминогруппы Lys31.

Контакт Pro36–Tyr379 также возникает благодаря особому положению токсина в комплексе с Kv1.1. Основная цепь Pro36 у MeKTx13-3_RMRH образует водородную связь с боковой цепью Kv1.1-специфичного остатка Tyr379 (рис. 4с), чего не происходит в комплексе MeKTx13-3–Kv1.1. Аналогичные контакты не наблюдаются в комплексах с другими каналами: боковая цепь Val377 у Kv1.2 слишком коротка и не имеет соответствующей функциональной группы, а боковая цепь His401 у Kv1.3 не может достичь основной цепи Pro36.

Очевидно, что формирование двух водородных связей и двух солевых мостиков Lys37–Asp361 и Lys37–Asp377, а также “среднеживущих” водородных связей His9–Glu353 и Gln12–Glu353 (рис. 4d) также становится возможными в комплексе MeKTx13-3_RMRH–Kv1.1 в результате особого пространственного расположения токсина относительно канального белка. Следует отметить, что аналогичные контакты, образованные Lys37, наблюдаются в комплексе MeKTx13-3 с Kv1.3 (Lys37–Asp383, Lys37–Asp399), и такие же контакты, образованные His9 и Gln12, обнаружены в комплексе MeKTx13-3 с Kv1.2 (His9–Asp351, Gln12–Asp351) [31], но не в комплексах MeKTx13-3_RMRH с любым из этих двух каналов. Потеря этих



контактов также может быть объяснена несколько различающимся положением токсина дикого типа и его мутанта в комплексах с K_V1.2 и 1.3.

Особое расположение MeKTx13-3_RMRH, стабилизируемое взаимодействиями Arg11 и Arg30 в исследуемых комплексах, приводит не только к исчезновению некоторых контактов, наблюдаемых в комплексах токсина дикого типа, но и появлению новых взаимодействий. Так, в комплексах MeKTx13-3_RMRH с K_V1.1, 1.2 и 1.3 наблюдаются 45, 29 и 23 специфичных контакта соответственно, и лишь 10, 8 и 3 из них идентичны для MeKTx13-3 и MeKTx13-3_RMRH. По-видимому, при переходе от MeKTx13-3 к MeKTx13-3_RMRH увеличение числа контактов приводит к увеличению сродства к K_V1.1 и 1.2 (поскольку мутант образует больше контактов в этих двух комплексах), но не влияет на сродство к K_V1.3. (табл. 2, 3).

Рис. 4. Модель структуры MeKTx13-3_RMRH в комплексе с Kv1.1. (a) – выравнивание аминокислотных последовательностей внеклеточных участков поры каналов Kv1.1–1.3. Индексы “h” и “r” перед названиями каналов указывают на организм – источник (человек и крыса соответственно). Нумерация остатков указана над каждой последовательностью; отличающиеся остатки показаны на сером фоне. (b) – общая структура комплекса Kv1.1–MeKTx13-3_RMRH в гидратированном липидном бислое после 500 нс МД. Субъединицы Kv1.1 показаны в виде ленточной модели (серым, коричневым, голубым и синим); спирали порового домена субъединицы канала на переднем плане и потенциал-чувствительный домен соседней субъединицы, а также длинные внеклеточные петли не показаны для ясности визуального восприятия. Липиды показаны в виде полупрозрачных шаровых моделей; цвета атомов: кислород – красный; фосфор – оранжевый; азот – синий; водород amino- и гидроксигруппы – белый; углерод POPC – светло-желтый; углерод POPE – желтый; углерод холестерина – бежевый. Некоторые липиды не показаны для ясности визуального восприятия. MeKTx13-3_RMRH показан розовым цветом; остаток Lys26 (закупоривает пору канала) показан в виде стержневой модели. (c, d) – крупный план (вид слева и справа соответственно) вестибуля поры канала, показанной на панели b. Канал показан в полупрозрачном виде. Липиды не показаны. Боковые цепи Lys26 и других остатков, участвующих в межмолекулярных контактах, показаны в виде стержневых моделей; для остатков Pro36, Lys37 и Gly376 показаны некоторые атомы основной цепи. Полярные контакты (водородные связи и солевые мостики) показаны зелеными пунктирными линиями. В момент, показанный на панели d, His9 не образует контакт с Glu353.

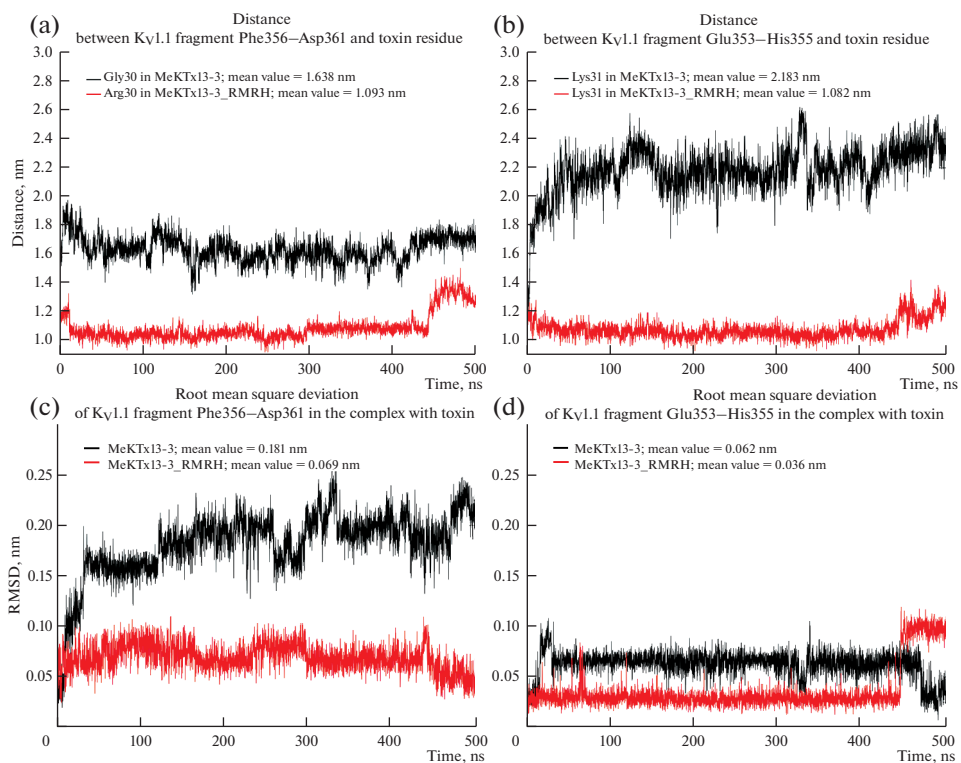


Рис. 5. (a, b) – изменение расстояния между фрагментами канала и токсинов в течение МД: (a) – между фрагментом Phe356–Asp361 Kv1.1 и остатком Gly30/Arg30 у MeKTx13-3/MeKTx13-3_RMRH, (b) – между фрагментом Glu353–His355 Kv1.1 и остатком Lys31 токсинов. Расстояние рассчитано между геометрическими центрами полипептидных фрагментов канала и атомами основной цепи соответствующих остатков токсинов. (c, d) – среднеквадратичное отклонение (RMSD) положения фрагментов Kv1.1 в комплексе с MeKTx13-3/MeKTx13-3_RMRH в течение МД: (c) – RMSD фрагмента Phe356–Asp361 Kv1.1, (d) – фрагмента Glu353–His355.

Таблица 3. Межмолекулярные контакты, наблюдаемые в комплексах MeKTx13-3 и MeKTx13-3_RMRH с K_V на протяжении траектории MD

Контакты ^a	Число контактов в комплексах					
	K _V 1.1		K _V 1.2		K _V 1.3	
	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH
	Все специфические взаимодействия ^b					
Долгоживущие	7	17	9	9	15	17
Среднеживущие	21	23	10	17	11	4
Короткоживущие	4	5	3	3	4	2
Общее число	32	45 (10) ^c	22	29 (8)	30	23 (3)
	Водородные связи					
Долгоживущие	5	8	8	7	8	10
Среднеживущие	10	14	8	14	7	3
Короткоживущие	2	3	3	2	3	2
Общее число	17	25 (7)	19	23 (8)	18	15 (3)
	Солевые мостики					
Долгоживущие	1	5	1	2	4	5
Среднеживущие	3	2	2	2	2	—
Короткоживущие	—	—	—	1	1	—
Общее число	4	7 (1)	3	5 (0)	7	5 (0)
	Стэкинг/π-π-взаимодействия					
Долгоживущие	—	2	—	—	2	—
Среднеживущие	3	2	—	—	1	1
Короткоживущие	1	1	—	—	—	—
Общее число	4	5 (1)	—	—	3	1 (0)

Таблица 3. Окончание

Контакты ^a	Число контактов в комплексах					
	K _v 1.1		K _v 1.2		K _v 1.3	
	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH	MeKTx13-3	MeKTx13-3_RMRH
	Л-катионные взаимодействия					
Долгоживущие	1	2	–	–	1	2
Среднеживущие	5	5	–	1	1	–
Короткоживущие	1	1	–	–	–	–
Общее число	7	8 (1)	–	1 (0)	2	2 (0)
	Все неспецифические (гидрофобные) взаимодействия					
Долгоживущие	154	188	162	169	149	168
Среднеживущие	92	86	68	113	94	66
Короткоживущие	18	10	9	25	20	11
Общее число	264	284	239	307	263	245
	Гидрофобные взаимодействия Ile28/Met28					
Долгоживущие	19	13	10	14	12	13
Среднеживущие	1	5	5	5	7	2
Короткоживущие	–	–	–	–	1	1
Общее число	20	18 (9)	15	19 (14)	20	16 (13)

^a – время жизни каждого контакта, учитываемое как часть времени траектории МД (всего 300 нс, начиная с 200 нс не учитывали для получения репрезентативных данных). Короткоживущие контакты: время жизни более 7%, но менее 10%; среднеживущие контакты: время жизни менее 50%; долгоживущие контакты: время жизни более 50%. *b* – водородные связи, солевые мостики, стэкинг/л-л-взаимодействия и л-катионные взаимодействия. *c* – число идентичных контактов в комплексах с MeKTx13-3_RMRH и MeKTx13-3 указано в скобках.

Согласно результатам компьютерного анализа межмолекулярных контактов, MeКТх13-3_RMRH образует 23 специфических и 245 гидрофобных контактов с $K_v1.3$, а MeКТх13-3 – 30 и 263 соответственно. Однако число долгоживущих водородных связей и солевых мостиков в комплексе с MeКТх13-3_RMRH (10 и 5 соответственно) больше, чем в комплексе с токсином дикого типа (8 и 4). Предположительно, сходная активность токсинов в отношении $K_v1.3$ связана с перераспределением количества и качества контактов (табл. 3).

Обобщая результаты вычислительного анализа, можно сделать вывод, что Arg11 и Arg30 играют существенную роль в селективном связывании MeКТх13-3_RMRH с $K_v1.1$. В комплексах с K_v эти остатки стабилизируют специфическое положение токсина относительно канального белка за счет большого количества межмолекулярных взаимодействий. Особое расположение токсина обеспечивает формирование дополнительных контактов (остатками Lys31, Pro36, Lys37, а также His9 и Gln12) в комплексе с $K_v1.1$, что, как мы полагаем, лежит в основе высокого сродства к этой изоформе.

Селективные лиганды $K_v1.1$ редко встречаются среди токсинов животных. В результате анализа имеющихся данных об известных лигандах калиевых каналов, проведенного с использованием базы данных Kalium [22], было установлено, что лишь небольшое число природных полипептидных токсинов обладает селективностью к $K_v1.1$. Среди них всего три токсина скорпионов: хонготоксин-1 (HgTX1; α -КТх 2.5, P59847) из яда *Centruroides limbatus*, MeКТх13-2 (α -КТх 3.18, C0HJQ4) и MeКТх13-3 (α -КТх 3.19, C0HJQ6) из яда *M. eupeus* [32, 62]. В яде других животных $K_v1.1$ -селективные токсины также являются весьма редкими компонентами. Были обнаружены и выделены лишь две такие молекулы: BgK (κ -actitoxin-Bgr1a, P29186) и APEКТх1 (κ PI-actitoxin-Ael3a, P86862) из морских анемонов *Bunodosoma granuliferum* и *Anthopleura elegantissima* соответственно [36, 63]. В настоящее время APEКТх1 является бесспорным лидером среди $K_v1.1$ -селективных лигандов, демонстрируя значение IC_{50} около 1 нМ и не проявляя перекрестной активности на других изоформах K_v вплоть до концентрации 1 мкМ [36].

Для количественной оценки специфичности лиганда в отношении различных изоформ ионных каналов, в частности $K_v1.1$, был использован коэффициент селективности: соотношение значений IC_{50} (или K_d) для двух каналов [40]. Этот параметр наглядно отражает специфичность каждого токсина в отношении $K_v1.1$ (табл. 4). Как и предполагалось, APEКТх1 имеет самый высокий коэффициент селективности (более 1000 для каждой пары калиевых каналов). MeКТх13-2 и MeКТх13-3 – природные токсины из яда скорпиона, демонстрирующие специфичность к $K_v1.1$ по сравнению с $K_v1.3$, но для MeКТх13-3_RMRH этот параметр на порядок выше. Таким образом, в настоящее время MeКТх13-3_RMRH является наиболее селективным лигандом $K_v1.1$, созданным на основе структуры токсина из яда скорпиона (табл. 4).

Подавляющее большинство полипептидных лигандов могут ингибировать несколько сходных изоформ гомотетрамерных калиевых каналов [16, 64, 65]. Иногда у токсинов наблюдают специфичность в отношении одной или двух определенных изоформ. Например, OSK1 (α -КТх 3.7, P55896) из яда скорпиона *Orthochirus scrobiculosus* селективен по отношению к $K_v1.3$, тогда как OSK3 (α -КТх 8.8, A0A1L2FZD4) из яда того же скорпиона действует на $K_v1.2$ и 1.3 в сопоставимых концентрациях [39, 56]. Большинство работ по идентификации и дизайну селективных полипептидов, действующих на калиевые каналы, сосредоточено на лигандах $K_v1.3$ [10]. Эта изоформа K_v считается одной из важнейших фармакологических мишеней в развитии ряда аутоиммунных заболеваний [66], поэтому селективные пептидные ингибиторы,

Таблица 4. Пептидные токсины с наибольшей селективностью в отношении $K_V1.1$. Для перечисленных токсинов соотношение IC_{50} (или K_d) показано для указанных пар каналов

Токсин	$K_V1.2/K_V1.1$	$K_V1.3/K_V1.1$
Токсины скорпионов		
MeКТх13-3_RMRH (эта работа)	79	57
MeКТх13-2 [32]	30	4
MeКТх13-3 [32]	56	5
HgГХ1 [62]	6	3
Токсины морских анемонов		
АРЕКТх1 [36]	>1111	>1111
VgK [63]	2	3

например *moKa1* [30], *ShK-186* [67] и *HsГХ1 [R14A]* [68], рассматриваются в качестве потенциальных терапевтических средств [69]. Ряд пептидов, таких как конотоксин κ M-RPII (κ -conotoxin RPII, P0CG45) [70] и актинотоксин *VesTx1* (κ -actitoxin-*Ves3a*, C0HJC2) [71], а также токсины скорпионов *MeКТх11-1* (α -КТх 1.16, C0HJQ7) [40] и *ММТХ* (α -КТх 26.4, P0DL65) [72], обладают высокой селективностью в отношении $K_V1.2$. Для родственной изоформы $K_V1.1$ список селективных лигандов намного короче (см. выше).

Существует несколько общих ограничений для исследований, направленных на создание и характеристику новых изоформ-специфичных лигандов, включая производные токсинов. Во-первых, субъединичный состав тетрамеров K_V может быть весьма различным, а гетеромерные каналы гораздо чаще экспрессируются *in vivo*, включая каналы, содержащие комплексы $K_V1.1$ и 1.2 [73]. При этом стехиометрия подобных комплексов пока не установлена и неизвестно, где конкретно в организме происходит их экспрессия. Второе ограничение связано с недостатком фармакологических данных для большого количества известных лигандов. К сожалению, полномасштабные измерения, включая определение IC_{50} и K_d , к настоящему времени были выполнены для небольшого числа полипептидных токсинов. Наконец, дальнейшая разработка новых лигандов K_V в значительной степени связана с исследованиями пространственной структуры комплексов канал–токсин [20], поэтому решение задач этого направления структурной биологии имеет приоритетное значение. Стоит отметить, что $K_V1.1$ и 1.2 считаются одними из наиболее распространенных изоформ K_V в центральной нервной системе, где они локализируются преимущественно в аксонах и окончаниях нейронов [7]. Использование селективных лигандов, подобных описанному нами *MeКТх13-3_RMRH*, позволит разобратся в специфических функциях этих каналов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 20-44-01015).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.И.К. и А.А.В. спланировали исследование. А.И.К. и А.М.Г. выполнили биохимические эксперименты и получили рекомбинантные пептиды. С.П. и Э.Л.П.-Ж. выполнили электрофизиологические эксперименты. В.М.Т. выполнил молекулярное моделирование. А.А.В. руководил биохимическими экспериментами. Я.Т. руководил электрофизиологическими экспериментами. Р.Г.Е. руководил молекулярным моделированием. В.М.Т., А.И.К. и А.А.В. написали статью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Вычисления на суперкомпьютерах были профинансированы в рамках программы фундаментальных исследований Национального исследовательского университета "Высшая школа экономики" и проекта повышения конкурентоспособности "5-100". Расчеты МД проводили с использованием вычислительных ресурсов суперкомпьютерного центра "Политехнический" Санкт-Петербургского Политехнического университета (<http://scc.spbstu.ru>) и ЦКП "Дальневосточный вычислительный ресурс" ИАПУ ДВО РАН (<https://cc.dvo.ru>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Hille B.* (2001) Ion channels of excitable membranes, 3rd edn. Sinauer Associates: Sunderland MA, Chicago.
2. *Long S.B., Campbell E.B., MacKinnon R.* (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science*. 309: 897–903. <https://doi.org/10.1126/science.1116269>
3. *Pongs O., Leicher T., Berger M., Roeper J., Bähring R., Wray D., Giese K.P., Silva A.J., Storm J.F.* (1999) Functional and molecular aspects of voltage-gated K⁺ channel β subunits. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* e868: 344–355. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb11296.x>
4. *Catterall W.A.* (2010) Ion channel voltage sensors: Structure, function, and pathophysiology. *Neuron*. 67: 915–928. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.08.021>
5. *Sansom M.S.P.* (2000) Potassium channels: Watching a voltage-sensor tilt and twist. *Curr. Biol.* 10: R206–R209. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00354-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00354-7)
6. *Alexander S.P.H., Mathie A., Peters J.A., Veale E.L., Striessnig J., Kelly E., Armstrong J.F., Facenda E., Harding S.D., Pawson A.J., Sharman J.L., Southan C., Davies J.A., Aldrich R.W., Becirovic E., Biel M., Catterall W.A., Conner A.C., Davies P., Delling M., Virgilio F. Di, Falzoni S., George C., Goldstein S.A.N., Grissmer S., Ha K., Hammelmann V., Hanukoglu I., Jarvis M., Jensen A.A., Kaczmarek L.K., Kellenberger S., Kennedy C., King B., Lynch J.W., Perez-Reyes E., Plant L.D., Rash L.D., Ren D., Sivilotti L.G., Smart T.G., Snutch T.P., Tian J., Van den Eynde C., Vriens J., Wei A.D., Winn B.T., Wulff H., Xu H., Yue L., Zhang X., Zhu M.* (2019) The Concise Guide to Pharmacology 2019/20: Ion channels. *Br. J. Pharmacol.* 176: S142–S228. <https://doi.org/10.1111/bph.14749>
7. *Vacher H., Mohapatra D.P., Trimmer J.S.* (2008) Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons. *Physiol. Rev.* 88: 1407–1447. <https://doi.org/10.1152/physrev.00002.2008>
8. *Manganas L.N., Trimmer J.S.* (2000) Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression. *J. Biol. Chem.* 275: 29685–29693. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005010200>
9. *Garcia M.L., Galvez A., Garcia-Calvo M., King V.F., Vazquez J., Kaczorowski G.J.* (1991) Use of toxins to study potassium channels. *J. Bioenerg. Biomembr.* 23: 615–646. <https://doi.org/10.1007/BF00785814>
10. *Wulff H., Castle N.A., Pardo L.A.* (2009) Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 8: 982–1001. <https://doi.org/10.1038/nrd2983>
11. *Norton R.S., Chandy K.G.* (2017) Venom-derived peptide inhibitors of voltage-gated potassium channels. *Neuropharmacology*. 127: 124–138. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.07.002>
12. *Hagiwara S., Miyazaki S., Rosenthal N.P.* (1976) Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* 67: 621–638. <https://doi.org/10.1085/jgp.67.6.621>
13. *Ludwig J., Terlau H., Wunder F., Bruggemann A., Pardo L.A., Marquardt A., Stuhmer W., Pongs O.* (1994) Functional expression of a rat homologue of the voltage gated ether a go-go potassium

- channel reveals differences in selectivity and activation kinetics between the *Drosophila* channel and its mammalian counterpart. *EMBO J.* 13: 4451–4458.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06767.x>
14. *Robertson D.W., Steinberg M.I.* (1990) Potassium channel modulators: Scientific applications and therapeutic promise. *J. Med. Chem.* 33: 1529–1541.
<https://doi.org/10.1021/jm00168a001>
 15. *Moczydlowski E., Lucchesi K., Ravindran A.* (1988) An emerging pharmacology of peptide toxins targeted against potassium channels. *J. Membr. Biol.* 105: 95–111.
<https://doi.org/10.1007/BF02009164>
 16. *Kuzmenkov A.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A.* (2015) Diversity of potassium channel ligands: Focus on scorpion toxins. *Biochemistry (Mosc.)*. 80: 1764–1799.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915130118>
 17. *Domingos Possani L., Martin B.M., Svendsen I.B.* (1982) The primary structure of noxiustoxin: A K⁺ channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 47: 285–289.
<https://doi.org/10.1007/BF02907789>
 18. *Carbone E., Wanke E., Prestipino G., Possani L.D., Maelicke A.* (1982) Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature.* 296: 90–91.
<https://doi.org/10.1038/296090a0>
 19. *Miller C., Moczydlowski E., Latorre R., Phillips M.* (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature.* 313: 316–318.
<https://doi.org/10.1038/313316a0>
 20. *Banerjee A., Lee A., Campbell E., Mackinnon R.* (2013) Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel. *Elife.* 2: e00594.
<https://doi.org/10.7554/eLife.00594>
 21. *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: baw056.
<https://doi.org/10.1093/database/baw056>
 22. *Tabakmakher V.M., Krylov N.A., Kuzmenkov A.I., Efremov R.G., Vassilevski A.A.* (2019) Kalium 2.0, a comprehensive database of polypeptide ligands of potassium channels. *Sci. Data* 6: 73.
<https://doi.org/10.1038/s41597-019-0074-x>
 23. *Bergeron Z.L., Bingham J.P.* (2012) Scorpion toxins specific for potassium (K⁺) channels: A historical overview of peptide bioengineering. *Toxins (Basel)*. 4: 1082–1119.
<https://doi.org/10.3390/toxins4111082>
 24. *Mouhat S., Andreotti N., Jouirou B., Sabatier J.-M.* (2008) Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. *Curr. Pharm. Des.* 14: 2503–2518.
<https://doi.org/10.2174/138161208785777441>
 25. *Mouhat S., Jouirou B., Mosbah A., De Waard M., Sabatier J.M.* (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem. J.* 378: 717–726.
<https://doi.org/10.1042/bj20031860>
 26. *Jouirou B., Mouhat S., Andreotti N., De Waard M., Sabatier J.M.* (2004) Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K⁺ channels. *Toxicon.* 43: 909–914.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2004.03.024>
 27. *Giangiacomo K.M., Ceralde Y., Mullmann T.J.* (2004) Molecular basis of α -KTx specificity. *Toxicon.* 43: 877–886.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.029>
 28. *Rodríguez De La Vega R.C., Merino E., Becerril B., Possani L.D.* (2003) Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol. Sci.* 24: 222–227.
[https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(03\)00080-4](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(03)00080-4)
 29. *Han S., Yi H., Yin S.J., Chen Z.Y., Liu H., Cao Z.J., Wu Y.L., Li W.X.* (2008) Structural basis of a potent peptide inhibitor designed for Kv1.3 channel, a therapeutic target of autoimmune disease. *J. Biol. Chem.* 283: 19058–19065.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M802054200>
 30. *Takacs Z., Toups M., Kollwe A., Johnson E., Cuello L.G., Driessens G., Biancalana M., Koide A., Ponte C.G., Perozo E., Gajewski T.F., Suarez-Kurtz G., Koide S., Goldstein S.A.N.* (2009) A designer ligand specific for Kv1.3 channels from a scorpion neurotoxin-based library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106: 22211–22216.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0910123106>
 31. *Gigolaev A.M., Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Tabakmakher V.M., Pinheiro-Junior E.L., Chugunov A.O., Efremov R.G., Tytgat J., Vassilevski A.A.* (2020) Tuning scorpion toxin selectivity: Switching from KV1.1 to KV1.3. *Front. Pharmacol.* 11: 1010.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01010>
 32. *Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Tytgat J., Vassilevski A.A.* (2019) Pharmacological characterisation of MeKTx13-2 and MeKTx13-3, peptide ligands of potassium channels from the scorpion *Mesobuthus eupeus* venom. *Russ. J. Physiol.* 105: 1452–1462.
<https://doi.org/10.1134/S0869813919110074>

33. McCoy J., Lavallie E. (2001) Expression and purification of thioredoxin fusion proteins. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* Chapter. 16: Unit 16.8.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1608s28>
34. Gasparian M.E., Bychkov M.L., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. (2011) Strategy for improvement of enteropeptidase efficiency in tag removal processes. *Protein. Expr. Purif.* 79: 191–196.
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.04.005>
35. Kuzmenkov A.I., Sachkova M.Y., Kovalchuk S.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A. (2016) *Lachesana tarabaevi*, an expert in membrane-active toxins. *Biochem. J.* 473: 2495–2506.
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160436>
36. Peigneur S., Billen B., Derua R., Waalkens E., Debaveye S., Béress L., Tytgat J. (2011) A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. *Biochem. Pharmacol.* 82: 81–90.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.03.023>
37. Romi-Lebrun R., Lebrun B., Martin-Eauclair M.-F., Ishiguro M., Escoubas P., Wu F.Q., Hisada M., Pongs O., Nakajima T. (1997) Purification, characterization, and synthesis of three novel toxins from the Chinese scorpion *Buthus martensi*, which act on K⁺ channels. *Biochemistry.* 36: 13473–13482.
<https://doi.org/10.1021/bi971044w>
38. Renisio J.G., Romi-Lebrun R., Blanc E., Bornet O., Nakajima T., Darbon H. (2000) Solution structure of BmKTX, a K⁺ blocker toxin from the Chinese scorpion *Buthus martensi*. *Proteins.* 38: 70–78.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(20000101\)38:1<70::AID-PROT8>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(20000101)38:1<70::AID-PROT8>3.0.CO;2-5)
39. Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Chugunov A.O., Tabakmakher V.M., Efremov R.G., Tytgat J., Grishin E.V., Vassilevski A.A. (2017) 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.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.02.001>
40. 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. (2018) KV1.2 channel-specific blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom: Structural basis of selectivity. *Neuropharmacology.* 143: 228–238.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.09.030>
41. Berkut A.A., Chugunov A.O., Mineev K.S., Peigneur S., Tabakmakher V.M., Krylov N.A., Oparin P.B., Lihonosova A.F., Novikova E.V., Arseniev A.S., Grishin E.V., Tytgat J., Efremov R.G., Vassilevski A.A. (2019) Protein surface topography as a tool to enhance the selective activity of a potassium channel blocker. *J. Biol. Chem.* 294: 18349–18359.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010494>
42. Webb B., Sali A. (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER. In: *Current Protocols in Bioinformatics.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, N.J., USA. 5.6.1-5.6.37.
<https://doi.org/10.1002/cpbj.3>
43. Chen X., Wang Q., Ni F., Ma J. (2010) Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107: 11352–11357.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1000142107>
44. Goldstein S.A., Pheasant D.J., Miller C. (1994) The charybdotoxin receptor of a Shaker K⁺ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron.* 12: 1377–88.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90452-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90452-9)
45. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Janickova H., Dolejsi E., Dolezal V., Utkin Y.N., Tsetlin V.I., Arseniev A.S., Efremov R.G., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. (2015) Structural insight into specificity of interactions between nonconventional three-finger weak toxin from *Naja kaouthia* (WTX) and muscarinic acetylcholine receptors. *J. Biol. Chem.* 290: 23616–23630.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.656595>
46. Chugunov A.O., Volynsky P.E., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G. (2016) Temperature-sensitive gating of TRPV1 channel as probed by atomistic simulations of its trans- and juxtamembrane domains. *Sci. Rep.* 6: 33112.
<https://doi.org/10.1038/srep33112>
47. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79: 926–935.
<https://doi.org/10.1063/1.445869>
48. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. (2015) GRO-MACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX.* 1: 19–25.
<https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
49. Klepeis J.L., Lindorff-Larsen K., Shaw D.E., Palmo K., Dror R.O., Maragakis P., Piana S. (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field. *Proteins.* 78: 1950–1958.
<https://doi.org/10.1002/prot.22711>

50. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. *J. Chem. Phys.* 81: 3684–3690.
<https://doi.org/10.1063/1.448118>
51. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling. *J. Chem. Phys.* 126: 014101.
<https://doi.org/10.1063/1.2408420>
52. Pyrkov T.V., Chugunov A.O., Krylov N.A., Nolde D.E., Efremov R.G. (2009) PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes. *Bioinformatics.* 25: 1201–1202.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp111>
53. Pyrkov T., Efremov R. (2007) A fragment-based scoring function to re-rank ATP docking results. *Int. J. Mol. Sci.* 8: 1083–1094.
<https://doi.org/10.3390/i8111083>
54. Chen Z., Hu Y., Yang W., Sabatier J.M., De Waard M., Cao Z., Li W., Han S., Wu Y. (2014) Unusual binding mode of scorpion toxin BmKTX onto potassium channels relies on its distribution of acidic residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447: 70–76.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.101>
55. Garcia M.L., Garcia-Calvo M., Hidalgo P., Lee A., MacKinnon R. (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry.* 33: 6834–6839.
<https://doi.org/10.1021/bi00188a012>
56. Mouhat S., Visan V., Ananthakrishnan S., Wulff H., Andreotti N., Grissmer S., Darbon H., De Waard M., Sabatier J.M. (2005) K⁺ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochem. J.* 385: 95–104.
<https://doi.org/10.1042/BJ20041379>
57. Abbas N., Belghazi M., Abdel-Mottaleb Y., Tytgat J., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.F. (2008) A new Kaliotoxin selective towards Kv1.3 and Kv1.2 but not Kv1.1 channels expressed in oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376: 525–530.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.033>
58. Kozminsky-Atias A., Somech E., Zilberberg N. (2007) Isolation of the first toxin from the scorpion *Buthus occitanus israelis* showing preference for Shaker potassium channels. *FEBS Lett.* 581: 2478–2484.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.04.065>
59. Abdel-Mottaleb Y., Vandendriessche T., Clynen E., Landuyt B., Jalali A., Vatanpour H., Schoofs L., Tytgat J. (2008) OdK2, a Kv1.3 channel-selective toxin from the venom of the Iranian scorpion *Odonthobuthus doriae*. *Toxicon.* 51: 1424–1430.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.03.027>
60. 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(19): 12195–12209.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M115.637611>
61. Gao B., Peigneur S., Tytgat J., Zhu S. (2010) A potent potassium channel blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. *Biochimie.* 92: 1847–1853.
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.08.003>
62. Koschak A., Bugianesi R.M., Mitterdorfer J., Kaczorowski G.J., Garcia M.L., Knaus H.G. (1998) 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.
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.5.2639>
63. Cotton J., Crest M., Bouet F., Alessandri N., Gola M., Forest E., Karlsson E., Castañeda O., Harvey A.L., Vita C., Ménez A. (1997) A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. *Eur. J. Biochem.* 244:192–202.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00192.x>
64. Peigneur S., Orts D.J.B., Prieto da Silva A.R., Oguiura N., Boni-Mitake M., de Oliveira E.B., Zaharenko A.J., de Freitas J.C., Tytgat J. (2012) Crotoamine pharmacology revisited: Novel insights based on the inhibition of KV channels. *Mol. Pharmacol.* 82: 90–96.
<https://doi.org/10.1124/mol.112.078188>
65. Grissmer S., Nguyen A.N., Aiyar J., Hanson D.C., Mather R.J., Gutman G.A., Karmilowicz M.J., Auperin D.D., Chandy K.G. (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.* 45(6): 1227–1234.
66. Chandy K.G., Norton R.S. (2017) Peptide blockers of Kv1.3 channels in T cells as therapeutics for autoimmune disease. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 38:97–107.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.02.015>
67. Beeton C., Pennington M.W., Wulff H., Singh S., Nugent D., Crossley G., Khaytin I., Calabresi P.A., Chen C.Y., Gutman G.A., Chandy K.G. (2005) Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol. Pharmacol.* 67:

- 1369–1381.
<https://doi.org/10.1124/mol.104.008193>
68. Rashid M.H., Huq R., Tanner M.R., Chhabra S., Khoo K.K., Estrada R., Dhawan V., Chauhan S., Pennington M.W., Beeton C., Kuyucak S., Norton R.S. (2015) A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTx1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases. *Sci. Rep.* 4: 4509.
<https://doi.org/10.1038/srep04509>
69. Tajti G., Wai D.C.C., Panyi G., Norton R.S. (2020) The voltage-gated potassium channel KV1.3 as a therapeutic target for venom-derived peptides. *Biochem. Pharmacol.* 181: 114146.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114146>
70. Chen P., Dendorfer A., Finol-Urdaneta R.K., Terlau H., Olivera B.M. (2010) Biochemical characterization of κ M-R111J, a Kv1.2 channel blocker. *J. Biol. Chem.* 285: 14882–14889.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068486>
71. Orts D.J.B., Peigneur S., Madio B., Cassoli J.S., Montandon G.G., Pimenta A.M.C., Bicudo J.E.P.W., Freitas J.C., Zaharenko A.J., Tytgat J. (2013) Biochemical and electrophysiological characterization of two sea anemone type I potassium toxins from a geographically distant population of *Bunodosoma caissarum*. *Mar. Drugs.* 11: 655–679.
<https://doi.org/10.3390/md11030655>
72. Wang X., Umetsu Y., Gao B., Ohki S., Zhu S. (2015) Mesomartoxin, a new Kv1.2-selective scorpion toxin interacting with the channel selectivity filter. *Biochem. Pharmacol.* 93:232–239.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.12.002>
73. Koch R.O., Wanner S.G., Koschak A., Hanner M., Schwarzer C., Kaczorowski G.J., Slaughter R.S., Garcia M.L., Knaus H.G. (1997) Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K⁺ channels. Basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology. *J. Biol. Chem.* 272: 27577–27581.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.27577>

Artificial Peptide Ligand of Potassium Channel K_V1.1 with High Selectivity

V. M. Tabakmakher^{a, b}, A. I. Kuzmenkov^a, A. M. Gigolaev^a, E. L. Pinheiro-Junior^c, S. Peigneur^c, R. G. Efremov^{a, d, e}, J. Tytgat^c, and A. A. Vassilevski^{a, e, *}

^aShemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^bSchool of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

^cKU Leuven, Leuven, Belgium

^dNational Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

^eMoscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia

*e-mail: avas@ibch.ru

In mammals, about 40 isoforms of voltage-gated potassium channels (K_Vs) have been found. To study such a variety of K_Vs, substances are needed that are able to selectively bind to them and change their properties. We have previously reported on the isolation and pharmacological characterization of MeKTx13-3, a peptide toxin from the venom of the scorpion *Mesobuthus eupeus*. This toxin has shown high affinity to a number of K_Vs, with little selectivity for the K_V1.1 isoform. In this paper, we describe the production of an artificial derivative of MeKTx13-3, named MeKTx13-3_RMRH, using rational design. The selectivity of MeKTx13-3_RMRH in relation to K_V1.1 is increased by an order of magnitude making it one of the most specific ligands of this K_V isoform. Finally, using computer simulations, we demonstrate that the preference of the new ligand to K_V1.1 can be realized through a specific positioning of the toxin in complex with the channel.

Keywords: neurotoxin, voltage-gated potassium channel, potassium channel blocker, scorpion venom, molecular modeling, molecular dynamics