

## ВЫСОКОАФФИННЫЙ $K_v1.2$ -СЕЛЕКТИВНЫЙ ПЕПТИД

© 2022 г. А. М. Гиголаев<sup>1</sup>, Э. Л. Пиньейро-Жуниор<sup>2</sup>, С. Пеньёр<sup>2</sup>,  
Я. Титгат<sup>2</sup>, А. А. Василевский<sup>1,3,\*</sup>

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

<sup>2</sup>Лёвенский университет, Лёвен, Бельгия

<sup>3</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет),  
Долгопрудный, Россия

\*E-mail: avas@ibch.ru

Поступила в редакцию 22.09.2022 г.

После доработки 28.10.2022 г.

Принята к публикации 30.10.2022 г.

Изоформа потенциал-чувствительных калиевых каналов  $K_v1.2$  представляет интерес, поскольку мутации в ее гене ассоциированы с различными заболеваниями, например атаксией и эпилепсией. Для изучения функции  $K_v1.2$  в норме и патологии необходимы селективные лиганды. В нашей работе мы получили такой лиганд на основе известного пептидного токсина скорпиона – харибдотоксина (ChTx,  $\alpha$ -KTxl.1) из яда *Leiurus hebraeus* – путем введения в его структуру одной аминокислотной замены M29I. Пептид ChTx\_M29I был получен в бактериальной системе экспрессии. Его фармакологическая характеристика проводилась на ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих панель каналов  $K_v1$  человека. Было обнаружено, что по сравнению с исходным токсином пептид ChTx\_M29I менее аффинен к каналам  $K_v1.1$ , 1.3 и 1.6, при этом в отношении  $K_v1.2$  его активность многократно возросла. Мы связываем такой эффект со взаимодействием пептида с определенным остатком канала (V381 у  $K_v1.2$ ). Если в этой позиции находится сравнительно небольшой остаток, то образуется выгодный контакт, повышающий аффинность. Изученный нами пептид ChTx\_M29I представляет собой один из самых высокоаффинных (со значением полумаксимальной ингибирующей концентрации  $IK_{50} \approx 6$  пМ) и высокоселективных лигандов  $K_v1.2$  (аффинность в отношении других изоформ ниже в 680 раз и более).

**Ключевые слова:** потенциал-зависимый калиевый канал, эпилепсия, нейротоксин, блокатор калиевых каналов

**DOI:** 10.31857/S0869813922120056

Потенциал-чувствительные калиевые каналы ( $K_v$ ) представляют собой трансмембранные белки и содержат четыре основные  $\alpha$ -субъединицы [1]. Каждая  $\alpha$ -субъединица состоит из цитоплазматического домена T1 и шести трансмембранных спиралей (S1–S6). Спирали S1–S4 образуют потенциал-чувствительный домен, где собственно сенсором потенциала является спираль S4. В ее структуре можно выделить нехарактерные для внутримембранного пространства аминокислотные остатки (а. о.) K и R, которые в ответ на изменение потенциала вызывают движение всей спирали, что в итоге регулирует открытие и закрытие канала. Спирали S5 и S6 всех четырех  $\alpha$ -субъединиц образуют поровый домен, в ко-

тором можно выделить селективный фильтр, содержащий консервативную последовательность TVGYG – она взаимодействует с ионами  $K^+$ .

В геноме человека обнаружено 40 генов  $\alpha$ -субъединиц  $K_V$ , что делает эту группу самой крупной среди ионных каналов. В частности, каналы подсемейства  $K_V1$  широко представлены в мозге млекопитающих, особенно распространены  $K_V1.1$ , 1.2, 1.4 и 1.6 [2]. Эти изоформы каналов могут образовывать как гомо-, так и гетеромеры, что влияет на их характеристики [3, 4]. В основном изучению доступны гомотетрамерные каналы из-за ограничений экспериментальных систем, в которых сложно контролировать экспрессию гетеромерных каналов.

Изоформа каналов  $K_V1.2$  представляет особый интерес, поскольку, во-первых, среди остальных изоформ  $K_V1$  она сравнительно равномерно экспрессирована в центральной нервной системе, а во-вторых, может образовывать как функциональные гомомерные, так и гетеромерные каналы с другими  $K_V1$  [3]. С мутациями этой изоформы связаны несколько заболеваний, таких как атаксия и эпилепсия [5, 6]. Для изучения функции  $K_V1.2$  в норме и патологии нужны селективные и высокоаффинные лиганды.

Одним из богатых источников лигандов  $K_V$  является яд скорпионов. Из яда различных видов скорпионов было выделено множество пептидных блокаторов  $K_V$  (КТх), согласно базе данных *Kalium* их насчитывается около 200 [7]. По аминокислотной последовательности их разделяют на несколько семейств:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\kappa$ - и  $\lambda$ -КТх. Самым крупным и изученным является семейство  $\alpha$ -КТх, оно включает пептиды длиной ~20–40 а. о., имеющие пространственную укладку цистеин-стабилизированных  $\alpha$ -спирали и  $\beta$ -слоя (CSc $\alpha$ / $\beta$ ). Также для них характерно наличие так называемой “функциональной диады” из а. о. К и Y, где К физически блокирует пору канала, а Y взаимодействует с его внешним вестибулем [8].

Харибдотоксин (ChTx,  $\alpha$ -КТх1.1) – это классический токсин из яда скорпиона *Leiurus hebraeus*, который был изучен на многих каналах. Он является высокоаффинным и селективным по отношению к каналам  $K_V1.3$ , а также кальций-активируемым калиевым каналам  $K_{Ca}1.1$  и  $K_{Ca}3.1$  [9, 10]. В ходе исследований взаимодействия ChTx с различными калиевыми каналами в лаборатории Miller был получен ряд производных этого токсина. Наше внимание привлек пептид с заменой M29I [11]. Было показано, что если в  $K_V$  дрозофилы Shaker внести замену T449F, аффинность ChTx\_M29I падает в 1650 раз по сравнению с обычным ChTx. В каналах человека в аналогичной позиции находятся различные а. о., в том числе и крупные ароматические. Поэтому мы решили проверить, как данная мутация повлияет на аффинность токсина по отношению к каналам человека.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Получение рекомбинантного белка*

ChTx\_M29I был получен по стандартному протоколу, который мы использовали в предыдущих работах [12]. В бактериальной системе экспрессии велась наработка пептида в составе гибрида, содержащего вспомогательный белок тиоредоксин (Trx) [13], сайт гидролиза легкой цепи энтеропептидазы человека и гексагистидиновую последовательность для очистки белка при помощи аффинной хроматографии.

### *Клонирование целевого гена*

Последовательность ДНК, кодирующая ChTx\_M29I, была получена в результате двухэтапной ПЦР с использованием синтетических олигонуклеотидов. На первом этапе четыре праймера использовались для получения полноразмерной копии гена

**Таблица 1.** Последовательности праймеров, использованных для получения полноразмерного гена, кодирующего производное ChTx\_M29I

Название	Последовательность (5'–3')
F1	AGCTGCGGT <u>ACCGACGACGACGACCGTC</u> AGTTTACCAATGTGAGCTGC
F2	GAGCGTTTGCCAGCGTCTGCATAACACCTCTCGCGGCAAGTGTATTAATA
R1	ACTTGAGGATCCTTAAGAATAACAACGGCATTCTTATTAATACACTTGC
R2	CGCTGGCAAACGCTCCAACATTCTTTAGACGTGGTGCAGCTCACATTGGT

Сайты рестрикции обозначены подчеркиванием, жирным выделен сайт гидролиза энтеропептидазы.

(табл. 1). На втором этапе реакционная смесь из первого этапа использовалась в качестве матрицы для амплификации с праймерами F1 и R1. Полученная ДНК была клонирована в экспрессионный вектор pET-32b (Novagen) по сайтам KpnI и BamHI.

#### *Экспрессия и очистка химерного белка*

Экспрессионный штамм *Escherichia coli* SHuffle T7 Express (New England Biolabs) был трансформирован вектором, несущим ген ChTx\_M29I, рост клеточной биомассы в среде LB проходил при температуре 37°C до середины экспоненциальной фазы. Экспрессия была индуцирована добавлением изопропил-β-D-тиогаляктопиранозидом до концентрации 0.4 мМ. Далее клеточная биомасса культивировалась при комнатной температуре в течение 16 ч. Затем клетки были разрушены при помощи ультразвука, а клеточный лизат нанесли на колонку со смолой HisPur Cobalt Resin (Thermo Fisher Scientific). Гибридный белок очищали по протоколу производителя смолы.

#### *Очистка целевого пептида*

Очищенный химерный белок растворяли в 50 мМ Tris-HCl (pH 8.0) до концентрации 1 мг/мл. Ферментативный гидролиз проводился при помощи легкой цепи энтеропептидазы человека (1 МЕ фермента на 1 мг белка) при 37°C в течение 16 ч [14]. Полученный гидролизат подвергался разделению при помощи обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–60% за 60 мин) на колонке Jupiter C<sub>5</sub> (4.6 × 250 мм, Phenomenex). Детекция велась по оптическому поглощению элюата, а искомое соединение определялось по сравнению расчетных и экспериментально полученных масс, определенных при помощи матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) масс-спектрометрии.

#### *Масс-спектрометрия*

Для измерения молекулярной массы использовали спектрометр Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik), как описано ранее [15]. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту (Sigma-Aldrich). Эксперименты проводились в режиме рефлектрона с погрешностью измерения масс не более 100 ppm. Масс-спектры анализировали с помощью программного обеспечения Data Analysis 4.3 и Data AnalysisViewer 4.3 (Bruker).

#### *Электрофизиология*

Эксперименты были выполнены по протоколам, опубликованным ранее [12]. Потенциал-чувствительные калиевые каналы человека (K<sub>v</sub>1.1 (GenBank: NM000217),

1.2 (GenBank: NM004974), 1.3 (GenBank: NM002232) и 1.6 (GenBank: NM002235) были экспрессированы в ооцитах лягушки *Xenopus laevis*. Для этого были получены мРНК, кодирующие каналы, при помощи набора mMESSAGE mMACHINE T7 (Thermo Fisher Scientific). Затем полученные мРНК были инъецированы в ооциты с использованием микроинжектора (Drummond Scientific).

Запись токов, проходящих через мембрану ооцитов, велась при комнатной температуре методом двухэлектродной фиксации потенциала. Данные были получены с использованием усилителя GeneClamp 500 и программного обеспечения Clampex 9 (Molecular Devices). Потенциал покоя был равен  $-90$  мВ, открытие каналов вызывалось деполяризацией мембраны до  $0$  мВ в течение  $500$  мс, затем в течение еще  $500$  мс потенциал поддерживался на уровне  $-50$  мВ и возвращался к потенциалу покоя.

Для построения кривой зависимости ингибирования тока от концентрации токсина исследуемый пептид был последовательно разведен и добавлен в камеру с ооцитом, где достигалась конечная исследуемая концентрация. Полученные данные были анализированы по уравнению Хилла:

$$y = \frac{100}{1 + \left( \frac{ИК_{50}}{C_{\text{пептида}}} \right)^h},$$

где  $y$  – ингибирование тока в %,  $C_{\text{пептида}}$  – концентрация исследуемого пептида,  $ИК_{50}$  – полумаксимальная ингибирующая концентрация,  $h$  – коэффициент Хилла.

Все данные были получены как минимум в трех независимых экспериментах ( $n \geq 3$ ). Обработка результатов проводилась в программе Origin (OriginLab Corporation).

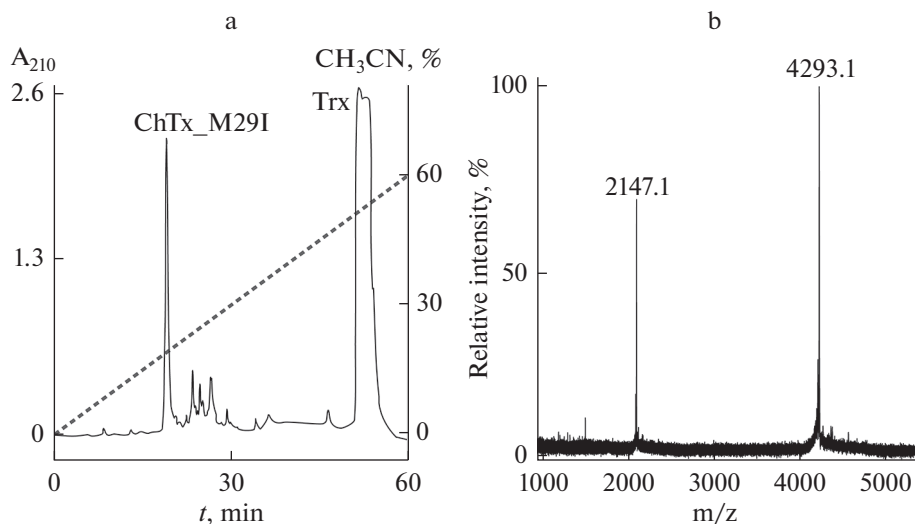
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### *Получение рекомбинантного пептида ChTx\_M29I*

Одним из основных способов получения пептидов с аминокислотными заменами является использование бактериальных систем экспрессии. Для того, чтобы в бактериях наработать нужный нам пептид, необходимо получить генетическую конструкцию, его кодирующую. Мы клонировали ген, кодирующий ChTx\_M29I, в экспрессионный вектор рЕТ-32b по сайтам рестрикции KpnI и BamHI. Полученной конструкцией мы трансформировали штамм *E. coli* SHuffle T7 Express, который предназначен для экспрессии дисульфид-богатых белков [16]. Целевой пептид нарабатывался в виде слитного белка с Ttx, который был очищен с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. Слитный белок затем подвергся ферментативному гидролизу по сайту энтерокиназы человека, а гидролизат разделялся при помощи ОФ-ВЭЖХ (рис. 1). Определение пика на хроматограмме, соответствующего пептиду ChTx\_M29I, велось при помощи МАЛДИ масс-спектрометрии. Выход целевого пептида составил  $4$  мг с  $1$  литра питательной среды.

### *Электрофизиологическое исследование полученного пептида*

Фармакологическую характеристику пептида ChTx\_M29I мы провели при помощи метода двухэлектродной фиксации потенциала на панели каналов  $K_V1$ . По сравнению с обычным ChTx он оказался намного менее аффинным по отношению к каналам  $K_V1.1$  и  $1.6$ : в концентрации  $2$  мкМ он блокирует эти каналы на  $3.1 \pm 2.7\%$  и  $9.6 \pm 0.6\%$  соответственно (рис. 2, табл. 2). Среди  $K_V$  ChTx проявляет селективность по отношению к каналу  $K_V1.3$  (табл. 2), в то время как полученный мутант оказался в  $1500$  раз более аффинным по отношению к каналу  $K_V1.2$  ( $ИК_{50} = 6 \pm 0.4$  пМ) и в  $20$  раз менее аффинным к  $K_V1.3$  ( $ИК_{50} = 4.1 \pm 0.8$  нМ). Таким образом, соотноше-



**Рис. 1.** (а) – хроматографическое разделение продуктов гидролиза гибридного белка энтеропептидазой. (б) – спектр очищенного ChTx\_M29I, полученный при помощи МАЛДИ масс-спектрометрии в режиме рефлектрона, показаны соответствующие моноизотопные массы. Расчетная моноизотопная масса [M+H]<sup>+</sup> составляет 4292.9 Да, экспериментально измеренная – 4293.1 Да.

ние между ИК<sub>50</sub> по отношению к каналам K<sub>V</sub>1.2 и 1.3 составило 680 раз, что делает ChTx\_M29I одним из наиболее селективных лигандов K<sub>V</sub>1.2.

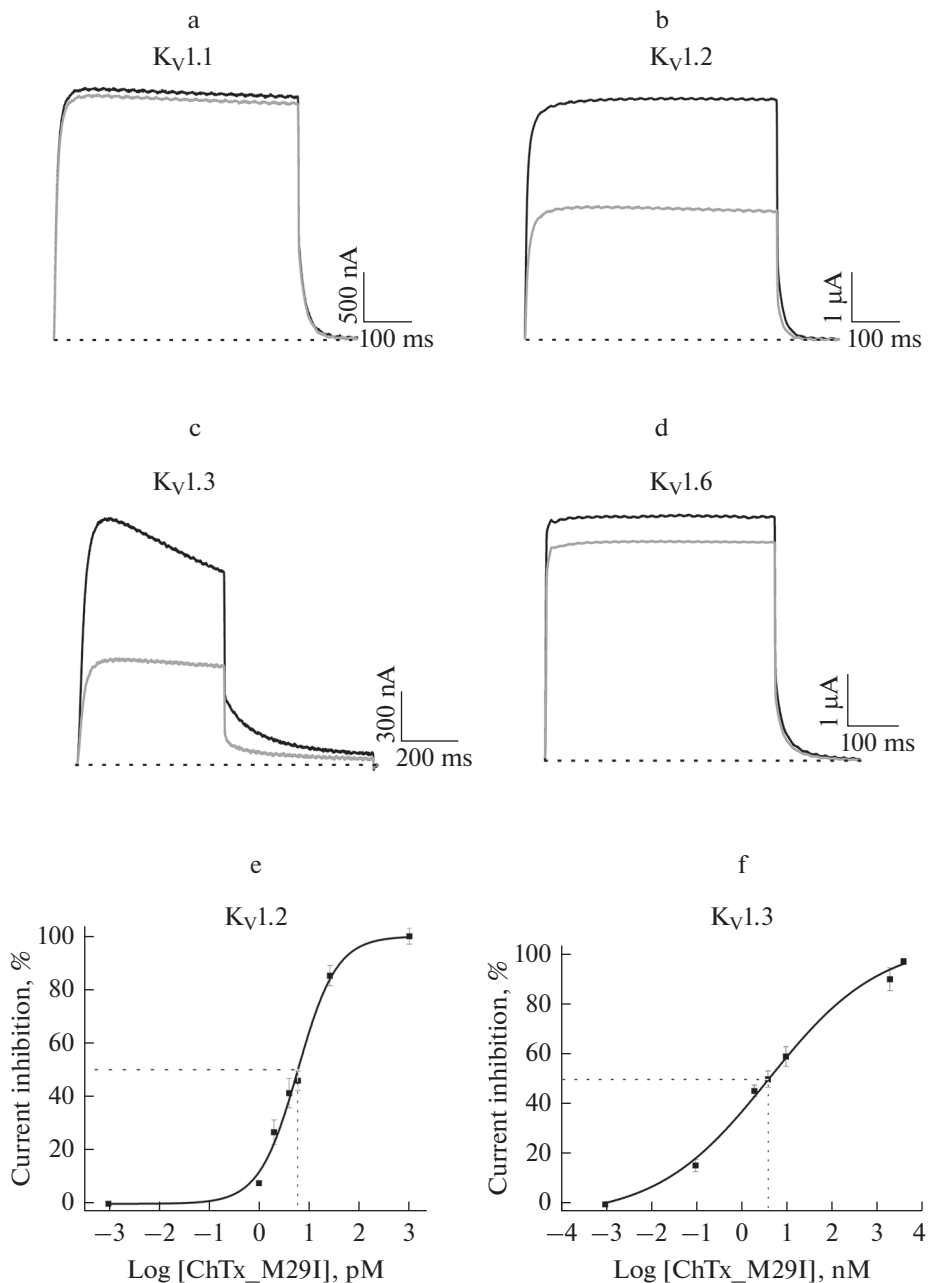
Ранее Miller и соавт. было предположено, что имеет место взаимодействие между а. о. токсина ChTx (M29) и канала Shaker (T449; табл. 3). При этом формируется высокоаффинный комплекс (K<sub>d</sub> ≈ 0.063 нМ) [11]. При введении замен в токсин (M29I) и канал (T449F) получался менее стабильный комплекс (K<sub>d</sub> ≈ 1100 нМ). То есть введение большого ароматического а. о. в положение 449 канала приводит к чрезвычайному ухудшению связывания производного ChTx\_M29I. В случае изоформ K<sub>V</sub>1 человека ухудшение связывания этого производного с каналами K<sub>V</sub>1.1 и 1.6 не является неожиданным, так как в соответствующем положении находится большой ароматический а. о. (Y379 и Y429 соответственно; табл. 3).

В случае K<sub>V</sub>1.3 мы также наблюдаем снижение аффинности, что аналогично можно связать с наличием крупного а. о. (H451) в этой позиции. В свою очередь, у канала K<sub>V</sub>1.2 в этом положении находится сравнительно небольшой гидрофобный а. о. (V381), Ван-дер-ваальсовы взаимодействия с ним, по-видимому, объясняют

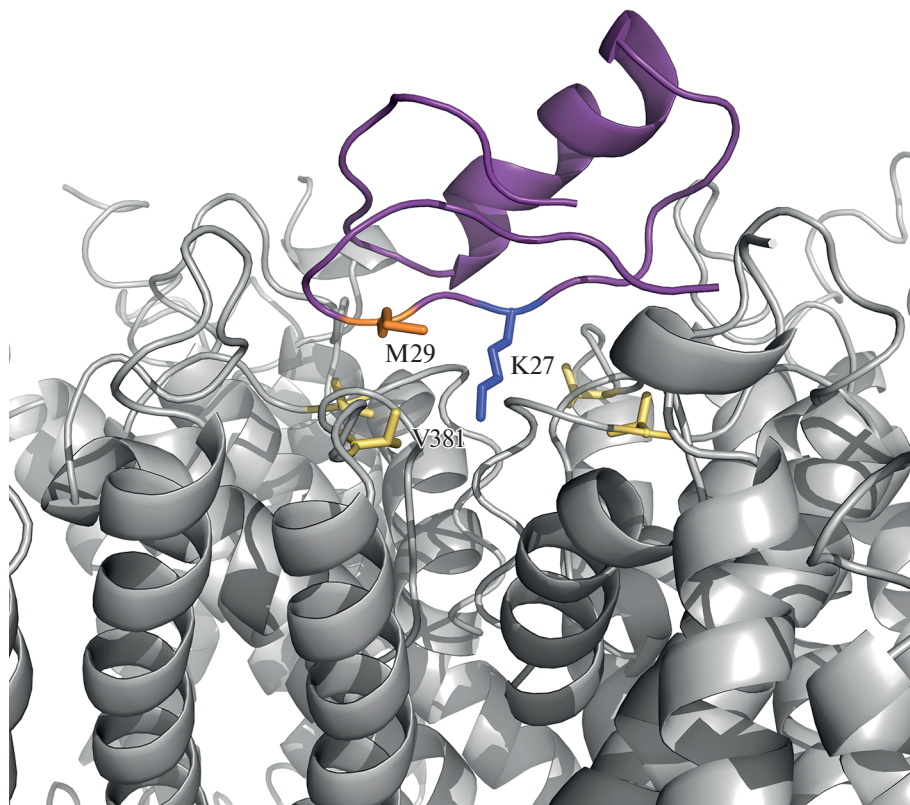
**Таблица 2.** Фармакологическая характеристика хариботоксина (ChTx) и его мутанта ChTx\_M29I

Пептид	Последовательность	K <sub>V</sub> 1.1	K <sub>V</sub> 1.2	K <sub>V</sub> 1.3	K <sub>V</sub> 1.6
ChTx	ZFTNVVSC <sup>1</sup> TTTSKEC <sup>2</sup> W <sup>3</sup> SV <sup>4</sup> C <sup>5</sup> QRLHNTSRGK <sup>6</sup> CM <sup>7</sup> NKK <sup>8</sup> RC <sup>9</sup> YS	1500	9	0.19	22
ChTx_M29I	QFTNVVSC <sup>1</sup> TTTSKEC <sup>2</sup> W <sup>3</sup> SV <sup>4</sup> C <sup>5</sup> QRLHNTSRGK <sup>6</sup> CT <sup>7</sup> NKK <sup>8</sup> RC <sup>9</sup> YS	2000/3.1 <sup>1</sup>	0.006	4.1	2000/9.6

<sup>1</sup> А/Б, где А – концентрация пептида, Б – процент ингибирования. Светло-серым выделены остатки цистеина, темно-серым обозначена позиция, в которую вносилась замена. Z обозначает остаток пироглутаминовой кислоты. Указаны значения K<sub>d</sub> (для ChTx) [10, 17] и ИК<sub>50</sub> (для ChTx\_M29I) в нМ.



**Рис. 2.** Фармакологическая характеристика пептида ChTx\_M29I. (a–d) – записи токов через мембрану ооцитов в контроле (черные кривые) и в присутствии пептида (2 мкМ для Kv1.1 и 1.6, 6 пМ для Kv1.2 и 4 нМ для Kv1.3; серые кривые). (e, f) – кривые доза–ответ для каналов Kv1.2 и 1.3, пунктирными линиями показаны значения ИК<sub>50</sub>. Коэффициенты Хилла (*h*) составляют  $1.1 \pm 0.1$  и  $0.35 \pm 0.02$  соответственно.



**Рис. 3.** Структура комплекса ChTx с каналом K<sub>v</sub>1.2/2.1. Канал показан серым, а. о. V381 выделен желтым; токсин показан фиолетовым, K27 выделен синим, M29 – оранжевым.

высокую аффинность ChTx\_M29I к данному каналу. Для объяснения наблюдаемых эффектов можно рассмотреть уже известную структуру комплекса ChTx с химерой K<sub>v</sub>1.2/2.1 [18]. Мы предполагаем, что ChTx\_M29I располагается в вестибуле поры канала так же, как и сам ChTx. На рис. 3 можно видеть, что а. о. M29 токсина и V381 канала сближены в пространстве. Соответственно, если в этом положении у канала находится большой ароматический а. о., то это приводит к стерическому затруднению и уменьшению аффинности.

**Таблица 3.** Сравнение аминокислотных последовательностей порового региона канала Shaker и K<sub>v</sub>1

Shaker	416	FAEAGSENSFFKSI PDAFWWAVVTMTTVGYGDMTPVGVW	454
hK <sub>v</sub> 1.1	346	FAEAEEAESHFSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMYPVTIG	384
hK <sub>v</sub> 1.2	348	FAEADERESQFPSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMVPTTIG	386
hK <sub>v</sub> 1.3	418	FAEADDPTSFGFSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMHPVTIG	456
hK <sub>v</sub> 1.6	396	FAEADDDDSLIFPSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMYPMTVG	434

Различающиеся а. о. обозначены серым фоном, полужирным выделены ключевые а. о., предположительно взаимодействующие с а. о. токсина M/129.

**Таблица 4.** Список известных полипептидных лигандов, селективно воздействующих на  $K_{V1.2}$ 

	$K_{V1.1}$	$K_{V1.2}$	$K_{V1.3}$	$K_{V1.6}$	Ссылки
ChTx_M29I	2000/3 <sup>1</sup>	0.006 <sup>2</sup>	4.1	2000/10	Эта работа
MeКТх11-1	2110	0.19	67	8900	[19]
MeКТх11-3	130	3.1	78	910	[19]
Css20	>10 <sup>3</sup>	1.3	7.2	4	[23]
Toxin II.10.4	>10	3.6	~72		[24]
Toxin II.10.5	>10	0.3	8.3		[24]
Toxin II.12.5	> 0	0.7	26.2		[24]
Toxin II.12.8	4.8	2.9	>10		[24]
TsTX-K-alpha	1000/85	0.2	1000/85	1000/94	[25, 26]
Tst26	>10	1.9	10.7		[27]
Pi-1	>5000	0.44	9.7		[28, 29]
Maurotoxin	45	0.8	180		[30]
Pi-4	>10000	0.008	>10000		[22]
Urotoxin	253	0.16	91		[20]
OdK1	>400	183	>400		[31]
Kbot1	145	2.5	15		[32]
CoTx1	24400	27	5300		[33]
OsK-2	>250	97	>250		[34]
Ts15	500/10	196	508	500/20	[35]
MMTX	>50000	15.6	12500		[21]
Vcs3a	405	0.03	74	1.31	[36]
Vcs4a	3000/54	173	1007	2246	[36]
RIIIJ	~4000	33	~10000	~8000	[37]
RIIIK	>10000	280	>10000	5000/10	[38, 39]
$\alpha$ -DTX	9.4	0.38	>100	9	[40–42]
DTX-I	3.1	0.13	4533	10/26	[43–45]

<sup>1</sup> А/Б, где А – концентрация пептида в нМ, Б – процент ингибирования. <sup>2</sup> ИК<sub>50</sub>, нМ. <sup>3</sup> лиганд не действует в концентрации больше указанного значения в нМ. <sup>4</sup> нет данных.

В нашей лаборатории ранее был получен и охарактеризован токсин из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* MeКТх11-1 ( $\alpha$ -КТх1.16), проявляющий высокую аффинность к  $K_{V1.2}$  (ИК<sub>50</sub>  $\approx$  0.2 нМ) [19]. Однако этот токсин уступает и по аффинности, и по селективности рассматриваемому в данной статье пептиду ChTx\_M29I. У MeКТх11-1 в структуре в положении 29 находится М, что наталкивает на мысль о получении более селективного лиганда при внесении такой же замены M29I.

Для сопоставления наших результатов со сведениями из литературы с помощью базы данных *Kalium* был составлен список селективных лигандов канала  $K_{V1.2}$  (табл. 4). Большинство из них – это токсины скорпионов, но также можно отметить несколько токсинов актиний, конусов и змей. Общая наблюдаемая тенденция заключается в том, что большинство лигандов не обладают высокой селективностью. Помимо MeКТх11-1, стоит упомянуть уротоксин [20] и мезомартоксин (ММТХ) [21], обладающих сопоставимой селективностью с ChTx\_M29I, однако аффинность которых существенно ниже. И наконец, Pi-4 из яда скорпиона *Pandi-*



*nus imperator* [22] обладает сходной аффинностью и даже превосходит ChTx\_M29I по селективности, однако активность этого пептида не была исследована в отношении K<sub>v</sub>1.6.

Мутации в гене канала K<sub>v</sub>1.2 могут приводить к эпилептической энцефалопатии [6]. В основном, это мутации с потерей функции, когда канал теряет способность открываться в ответ на деполяризующий стимул. Однако известны патогенные мутации K<sub>v</sub>1.2 с приобретением функции, которые вызывают смещение порогового потенциала активации каналов в отрицательную область. В таком случае как раз могли бы найти применение селективные блокаторы в качестве фармакологического агента, корректирующего работу мутантного канала.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы продемонстрировали, что одна аминокислотная замена может привести к значительному изменению аффинности и селективности лиганда калиевого канала на примере хорошо изученного хариботоксина (ChTx). Замена M29I привела к ухудшению аффинности токсина по отношению к каналам K<sub>v</sub>1.1, 1.3 и 1.6, а к каналу K<sub>v</sub>1.2 мы наблюдали увеличение аффинности более чем в 1500 раз (ИК<sub>50</sub> ≈ 6 пМ). Полученный пептид в итоге оказался высокоаффинным и высоко-селективным лигандом канала K<sub>v</sub>1.2.

## ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана РФФ (проект № 20-44-01015; электрофизиологические исследования) и РФФИ (проект № 20-34-90158; получение пептида).

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

## ВКЛАД АВТОРОВ

А.М.Г. и А.А.В. спланировали исследование. А.М.Г. выполнил биохимические эксперименты и получил рекомбинантные пептиды. С.П. и Э.Л.П.-Ж. выполнили электрофизиологические эксперименты. А.А.В. руководил биохимическими экспериментами. Я.Т. руководил электрофизиологическими экспериментами. А.М.Г. и А.А.В. написали статью.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hille B (2001) Ion Channels of Excitable Membranes, 3rd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
2. Zeisel A, Hochgerner H, Lönnerberg P, Johnsson A, Memic F, Zwan J van der, Häring M, Braun E, Borm LE, Manno G La, Codeluppi S, Furlan A, Lee K, Skene N, Harris KD, Hjerling-Leffler J, Arenas E, Ernfors P, Marklund U, Linnarsson S (2018) Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. Cell 174:999–1014.e22. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2018.06.021>
3. Shamotienko OG, Parejz DN, Dolly JO (1997) Subunit combinations defined for K<sup>+</sup> channel Kv1 subtypes in synaptic membranes from bovine brain. Biochemistry 36: 8195–8201. <https://doi.org/10.1021/bi970237g>
4. Dodson PD, Barker MC, Forsythe ID (2002) Two heteromeric Kv1 potassium channels differentially regulate action potential firing. J Neurosci 22: 6953–6961. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.22-16-06953.2002>
5. Pena SDJ, Coimbra RLM (2015) Ataxia and myoclonic epilepsy due to a heterozygous new mutation in KCNA2: proposal for a new channelopathy. Clin Genet 87: e1–e3. <https://doi.org/10.1111/CGE.12542>

6. Syrbe S, Hedrich UBS, Riesch E, Djémié T, Müller S, Möller RS, Maher B, Hernandez-Hernandez L, Synofzik M, Caglayan HS, Arslan M, Serratos JM, Nothnagel M, May P, Krause R, Löffler H, Detert K, Dorn T, Vogt H, Krämer G, Schöls L, Mullis PE, Linnankivi T, Lehesjoki AE, Sterbova K, Craiu DC, Hoffman-Zacharska D, Korff CM, Weber YG, Steinlin M, Gallati S, Bertsche A, Bernhard MK, Merckenschlager A, Kiess W, Gonzalez M, Züchner S, Palotie A, Suls A, De Jonghe P, Helbig I, Biskup S, Wolff M, Maljevic S, Schüle R, Sisodiya SM, Weckhuysen S, Lerche H, Lemke JR (2015) De novo loss- or gain-of-function mutations in KCNA2 cause epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 2015 474 47: 393–399.  
<https://doi.org/10.1038/ng.3239>
7. Tabakmakher VM, Krylov NA, Kuzmenkov AI, Efremov RG, Vassilevski AA (2019) Kalium 2.0, a comprehensive database of polypeptide ligands of potassium channels. *Sci Data* 2019 61 6: 1–8.  
<https://doi.org/10.1038/s41597-019-0074-x>
8. Mouhat S, De Waard M, Sabatier JM (2005) Contribution of the functional dyad of animal toxins acting on voltage-gated K<sub>v</sub>1-type channels. *J Pept Sci* 11: 65–68.
9. MacKinnon R, Miller C (1988) Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel. *J Gen Physiol* 91: 335.  
<https://doi.org/10.1085/JGP.91.3.335>
10. Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33: 6834–6839.  
<https://doi.org/10.1021/bi00188a012>
11. Naranjo D, Miller C (1996) A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a Shaker K<sup>+</sup> channel. *Neuron* 16: 123–130.  
[https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80029-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80029-X)
12. Berkut AA, Usmanova DR, Peigneur S, Oparin PB, Mineev KS, Odintsova TI, Tytgat J, Arseniev AS, Grishin EV, Vassilevski AA (2014) Structural similarity between defense peptide from wheat and scorpion neurotoxin permits rational functional design. *J Biol Chem* 289: 14331–14340.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530477>
13. McCoy J, LaVallie E (2001) Expression and Purification of Thioredoxin Fusion Proteins. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons Inc. Hoboken NJ USA. 16.8.1–16.8.14
14. Gasparian ME, Ostapchenko VG, Schulga AA, Dolgikh DA, Kirpichnikov MP (2003) Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*. *Protein Exp Purif* 31(1): 133–139.  
[https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(03\)00159-1](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(03)00159-1)
15. Kuzmenkov AI, Sachkova MY, Kovalchuk SI, Grishin E V, Vassilevski AA (2016) *Lachesana tarabaevi*, an expert in membrane-active toxins. *Biochem J* 473: 2495–2506.  
<https://doi.org/10.1042/BCJ20160436>
16. Lobstein J, Emrich CA, Jeans C, Faulkner M, Riggs P, Berkmen M (2012) SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microb Cell Fact* 11: 56.  
<https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>
17. Takacs Z, Toups M, Kollwe A, Johnson E, Cuello LG, Driessens G, Biancalana M, Koide A, Ponte CG, Perozo E, Gajewski TF, Suarez-Kurtz G, Koide S, Goldstein SAN (2009) A designer ligand specific for K<sub>v</sub>1.3 channels from a scorpion neurotoxin-based library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 22211–22216.  
<https://doi.org/10.1073/PNAS.0910123106>
18. Banerjee A, Lee A, Campbell E, MacKinnon R (2013) Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K<sup>+</sup> channel. *Elife* 2: e00594.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.00594>
19. Kuzmenkov AI, Nekrasova O V., Peigneur S, Tabakmakher VM, Gigoлаев AM, Fradkov AF, Kudryashova KS, Chugunov AO, Efremov RG, Tytgat J, Feofanov AV, Vassilevski AA (2018) K<sub>v</sub>1.2 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>
20. Luna-Ramírez K, Bartok A, Restano-Cassulini R, Quintero-Hernández V, Coronas FIV, Christensen J, Wright CE, Panyi G, Possani LD (2014) Structure, molecular modeling, and function of the novel potassium channel blocker urotoxin isolated from the venom of the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*. *Mol Pharmacol* 86: 28–41.  
<https://doi.org/10.1124/MOL.113.090183>
21. Wang X, Umetsu Y, Gao B, Ohki S, Zhu S (2015) Mesomartoxin, a new K(v)1.2-selective scorpion toxin interacting with the channel selectivity filter. *Biochem Pharmacol* 93: 232–239.  
<https://doi.org/10.1016/J.BCP.2014.12.002>
22. M'Barek S, Mosbah A, Sandoz G, Fajloun Z, Olamendi-Portugal T, Rochat H, Sampieri F, Guijarro JI, Mansuelle P, Delepierre M, De Waard M, Sabatier JM (2003) Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K<sup>+</sup> channels. *Eur J Bio-*

- chem 270: 3583–3592.  
<https://doi.org/10.1046/J.1432-1033.2003.03743.X>
23. Corzo G, Papp F, Varga Z, Barraza O, Espino-Solis PG, Rodríguez de la Vega RC, Gaspar R, Panyi G, Possani LD (2008) A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. *Biochem Pharmacol* 76: 1142–1154.  
<https://doi.org/10.1016/J.BCP.2008.08.018>
  24. Olamendi-Portugal T, Bartok A, Zamudio-Zuñiga F, Balajthy A, Becerril B, Panyi G, Possani LD (2016) Isolation, chemical and functional characterization of several new K<sup>(+)</sup>-channel blocking peptides from the venom of the scorpion *Centruroides tecomanus*. *Toxicon* 115: 1–12.  
<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2016.02.017>
  25. Cerni FA, Pucca MB, Peigneur S, Cremonese CM, Bordon KCF, Tytgat J, Arantes EC (2014) Electrophysiological characterization of Ts6 and Ts7, K<sup>+</sup> channel toxins isolated through an improved *Tityus serrulatus* venom purification procedure. *Toxins (Basel)* 6: 892–913.  
<https://doi.org/10.3390/TOXINS6030892>
  26. Possani LD, Selisko B, Gurrola GB (1999) Structure and function of scorpion toxins affecting K<sup>+</sup>-channels. *Perspect Drug Discov Des* 150 (15): 15–40.  
<https://doi.org/10.1023/A:1017062613503>
  27. Papp F, Batista CVF, Varga Z, Herceg M, Román-González SA, Gaspar R, Possani LD, Panyi G (2009) Tst26, a novel peptide blocker of Kv1.2 and Kv1.3 channels from the venom of *Tityus stigmurus*. *Toxicon* 54: 379–389.  
<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2009.05.023>
  28. Fajloun Z, Carlier E, Lecomte C, Geib S, Di Luccio E, Bichet D, Mabrouk K, Rochat H, De Waard M, Sabatier JM (2000) Chemical synthesis and characterization of Pi1, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* active on K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem* 267: 5149–5155.  
<https://doi.org/10.1046/J.1432-1327.2000.01577.X>
  29. Péter M, Varga Z, Panyi G, Bene L, Damjanovich S, Pieri C, Possani LD, Gáspár R (1998) *Pandinus imperator* scorpion venom blocks voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 242: 621–625.  
<https://doi.org/10.1006/BBRC.1997.8018>
  30. Kharrat R, Mansuelle P, Sampieri F, Crest M, Oughideni R, Van Rietschoten J, Martin-Eauclaire MF, Rochat H, El Ayeub M (1997) Maurotoxin, a four disulfide bridge toxin from *Scorpio maurus* venom: purification, structure and action on potassium channels. *FEBS Lett* 406: 284–290.  
[https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00285-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00285-8)
  31. Abdel-Mottaleb Y, Clynen E, Jalali A, Bosmans F, Vatanpour H, Schoofs L, Tytgat J (2006) The first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion *Odonthobuthus doriae*. *FEBS Lett* 580: 6254–6258.  
<https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2006.10.029>
  32. Mahjoubi-Boubaker B, Crest M, Khalifa R Ben, El Ayeub M, Kharrat R (2004) Kbot1, a three disulfide bridges toxin from *Buthus occitanus tunetanus* venom highly active on both SK and Kv channels. *Peptides* 25: 637–645.  
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.02.017>
  33. Jouirou B, Mosbah A, Visan V, Grissmer S, M'Barek S, Fajloun Z, Van Rietschoten J, Devaux C, Rochat H, Lippens G, El Ayeub M, De Waard M, Mabrouk K, Sabatier JM (2004) Cobatoxin I from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K<sup>+</sup> channels. *Biochem J* 377: 37–49.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20030977>
  34. Dudina EE, Korolkova YV, Bocharova NE, Koshelev SG, Egorov TA, Huys I, Tytgat J, Grishin EV (2001) OsK2, a new selective inhibitor of Kv1.2 potassium channels purified from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*. *Biochem Biophys Res Commun* 286: 841–847.  
<https://doi.org/10.1006/BBRC.2001.5492>
  35. Cologna CT, Peigneur S, Rosa JC, Selistre-de-Araujo HS, Varanda WA, Tytgat J, Arantes EC (2011) Purification and characterization of Ts15, the first member of a new  $\alpha$ -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 58: 54–61.  
<https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2011.05.001>
  36. Orts DJB, Peigneur S, Madio B, Cassoli JS, Montandon GG, Pimenta AMC, Bicudo JEPW, Freitas JC, Zaharenko AJ, 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>
  37. Chen P, Dendorfer A, Finol-Urdaneta RK, Terlau H, Olivera BM (2010) Biochemical characterization of kappaM-RIIII, a Kv1.2 channel blocker: evaluation of cardioprotective effects of kappaM-conotoxins. *J Biol Chem* 285: 14882–14889.  
<https://doi.org/10.1074/JBC.M109.068486>
  38. Ferber M, Sporning A, Jeserich G, DeLaCruz R, Watkins M, Olivera BM, Terlau H (2003) A novel conus peptide ligand for K<sup>+</sup> channels. *J Biol Chem* 278: 2177–2183.  
<https://doi.org/10.1074/JBC.M205953200>

39. Ferber M, Al-Sabi A, Stocker M, Olivera BM, Terlau H (2004) Identification of a mammalian target of  $\kappa$ M-conotoxin RIIIK. *Toxicon* 43: 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.12.010>
40. Tytgat J, Debont T, Carmeliet E, Daenens P (1995) The alpha-dendrotoxin footprint on a mammalian potassium channel. *J Biol Chem* 270: 24776–24781. <https://doi.org/10.1074/JBC.270.42.24776>
41. Swanson R, Marshall J, Smith JS, Williams JB, Boyle MB, Folander K, Luneau CJ, Antanavage J, Oliva C, Buhrow SA, Bennet C, Stein RB, Kaczmarek LK (1990) Cloning and expression of cDNA and genomic clones encoding three delayed rectifier potassium channels in rat brain. *Neuron* 4: 929–939. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90146-7](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90146-7)
42. Hurst RS, Busch AE, Kavanaugh MP, Osborne PB, North RA, Adelman JP (1991) Identification of amino acid residues involved in dendrotoxin block of rat voltage-dependent potassium channels. *Mol Pharmacol* 40.
43. Robertson B, Owen D, Stow J, Butler C, Newland C (1996) Novel effects of dendrotoxin homologues on subtypes of mammalian Kv1 potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett* 383: 26–30. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00211-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00211-6)
44. Hopkins WF, Demas V, Tempel BL (1994) Both N- and C-terminal regions contribute to the assembly and functional expression of homo- and heteromultimeric voltage-gated K<sup>+</sup> channels. *J Neurosci* 14: 1385–1393. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-03-01385.1994>
45. Hopkins WF, Allen ML, Houamed KM, Tempel BL (1994) Properties of voltage-gated K<sup>+</sup> currents expressed in *Xenopus* oocytes by mKv1.1, mKv1.2 and their heteromultimers as revealed by mutagenesis of the dendrotoxin-binding site in mKv1.1. *Pflugers Arch* 428: 382–390. <https://doi.org/10.1007/BF00724522>

### K<sub>V</sub>1.2-Selective Peptide with High Affinity

A. M. Gigolaev<sup>a</sup>, E. L. Pinheiro-Junior<sup>b</sup>, S. Peigneur<sup>b</sup>, J. Tytgat<sup>b</sup>, and A. A. Vassilevski<sup>a, c, \*</sup>

<sup>a</sup>*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

<sup>b</sup>*KU Leuven, Leuven, Belgium*

<sup>c</sup>*Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny, Russia*

\*e-mail: [avas@ibch.ru](mailto:avas@ibch.ru)

The isoform of voltage-gated potassium channels K<sub>V</sub>1.2 is of interest because mutations in its gene are associated with various diseases, such as ataxia and epilepsy. Selective ligands are needed to study the function of K<sub>V</sub>1.2 in health and disease. In our work, we obtained such a ligand based on the known scorpion peptide toxin, charybdotoxin (ChTx,  $\alpha$ -KTx1.1) from the venom of *Leiurus hebraeus*, by introducing a single amino acid substitution M29I into its structure. ChTx\_M29I peptide was generated in a bacterial expression system. Its pharmacological characterization was carried out in *Xenopus laevis* frog oocytes expressing a panel of human K<sub>V</sub>1 channels. We found that, compared to the parent toxin, ChTx\_M29I peptide showed smaller affinity for channels K<sub>V</sub>1.1, 1.3, and 1.6, while its activity against K<sub>V</sub>1.2 increased manifold. We attribute this effect to the interaction of the peptide with a specific channel residue (V381 in K<sub>V</sub>1.2). If there is a relatively small residue at this position, then an advantageous contact is formed that increases the affinity. ChTx\_M29I peptide studied by us presents one of the highest affinity (with a half-maximal inhibitory concentration IC<sub>50</sub>  $\approx$  6 pM) and selectivity among K<sub>V</sub>1.2 ligands (affinity for other isoforms is lower by 680 times or more).

**Keywords:** voltage-gated potassium channel, epilepsy, neurotoxin, potassium channel blocker