Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)

На правах рукописи

Василевский Александр Александрович

Токсины паукообразных: многообразие, фундаментальные и прикладные аспекты

Специальность: 1.4.9 – «Биоорганическая химия»

Диссертация на соискание ученой степени
доктора химических наук

Москва — 2026

Оглавление

Оглавление 2

Введение 12

Основная часть 20

1. Обзор литературы 20

1.1. Ядовитые паукообразные 20

1.2. Медицинское значение яда паукообразных 22

1.2.1. Лечение отравлений и противоядия 25

1.2.2. Природная устойчивость к яду 28

1.3. Молекулярный состав яда паукообразных 30

1.3.1. Номенклатура токсинов 36

1.4. Низкомолекулярные компоненты яда паукообразных 39

1.4.1. Ацилполиамины 43

1.5. Цитолитические и антимикробные пептиды 47

1.6. Линейные пептиды из яда паукообразных, не относящиеся к АМП 56

1.7. Разнообразие дисульфид-содержащих пептидов из яда паукообразных 58

1.8. Пространственная структура дисульфид-содержащих пептидов 63

1.9. Токсины, воздействующие на K^+ каналы 66

1.9.1. Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов 66

1.9.2. Ингибиторы активации K_v из яда пауков 77

1.9.3. Другие токсины паукообразных, воздействующие на K^+ каналы 82

1.10. Токсины, воздействующие на Na^+ каналы 85

1.10.1. α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы 89

1.10.2. β-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы 98

1.10.3. Другие токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы 104

1.10.4. Разнообразие токсинов пауков, воздействующих на Na^+ каналы 105

1.10.5. Ингибиторы инактивации Na_v из яда пауков 106

1.10.6. Ингибиторы активации Na_v из яда пауков 109

1.10.7. Инсектотоксины из яда воронковых пауков, потенцирующие Na_v 115

1.10.8. Другие токсины пауков, воздействующие на Na^+ каналы 118

1.11. Токсины, воздействующие на Ca^{2+} каналы 119

1.11.1. ω-Агатоксины 120

1.11.2. Ингибиторы Ca_v из яда *Phoneutria nigriventer* 124

1.11.3. Инсектотоксины австралийских воронковых пауков, действующие на Ca_v 124

1.11.4. Токсины, воздействующие на рианодиновые рецепторы 126

1.12. Токсины, воздействующие на болевые рецепторы 129

1.12.1. Токсины, воздействующие на терморецепторы (каналы TRPV1).....130
1.12.2. Токсины, воздействующие на рецепторы раздражающих веществ (каналы TRPA1).....132
1.12.3. Токсины, воздействующие на рецепторы кислоты (каналы ASIC).....133
1.13. Другие дисульфид-богатые пептиды из яда паукообразных.....135
1.13.1. Короткие инсектотоксины из яда скорпионов.....135
1.13.2. Пептиды, воздействующие на Cl^- каналы.....138
1.13.3. Компоненты, потенцирующие действие токсинов.....139
1.13.4. Другие малочисленные группы.....140
1.13.4.1. Токсины, воздействующие на механорецепторы.....140
1.13.4.2. Ингибиторы протеаз.....140
1.13.4.3. Лектин из яда паука.....141
1.13.4.4. Противомалярийные пептиды.....141
1.13.4.5. Синтетические аналоги с новыми свойствами.....141
1.14. Двудоменные токсины из яда паукообразных.....143
1.14.1. Двудоменные токсины скорпионов.....143
1.14.2. Двудоменные токсины пауков.....146
1.14.2.1. Цитоинсектотоксины.....146
1.14.2.2. Токсины с двумя ICK-доменами.....147
1.14.2.3. Токсины, содержащие линейный и ICK-домен.....151
1.15. Белковые токсины паукообразных.....153
1.15.1. Некротоксины из яда *Loxosceles*.....154
1.15.2. Латротоксины.....158
1.16. Биосинтез токсинов паукообразных.....164
1.17. Эволюция токсинов паукообразных.....169
1.17.1. Происхождение токсинов.....170
1.17.2. Эволюция состава яда.....173
1.17.3. Яд как комбинаторная библиотека токсинов.....176
1.18. Токсины паукообразных как молекулярные инструменты исследования нервной системы.....180
1.18.1. Изучение Na^+ каналов.....182
1.18.2. Изучение K^+ каналов.....186
1.18.3. Изучение Ca^{2+} каналов.....190
1.18.4. Изучение болевых рецепторов.....191
1.18.5. Изучение синапсов и нейроэкзоцитоза с помощью α-LTX.....193
1.19. Возможности практического использования токсинов паукообразных.....195
1.19.1. Токсины паукообразных как инсектициды.....195
1.19.2. Потенциал компонентов яда паукообразных для разработки лекарств.....196

1.19.2.1. Болевые синдромы и анальгетики 197
1.19.2.2. Ишемия и кардиопротекторы....199
1.19.2.3. Эпилепсия и противосудорожные 199
1.19.2.4. Эректильная дисфункция 200
1.19.2.5. Глиомы и противоопухолевые препараты....200
1.19.2.6. Аутоиммунные заболевания и иммуносупрессоры 202
1.20. Заключительные комментарии 202
2. Материалы и методы....203
2.1. Программное обеспечение 203
2.2. Приборы общего назначения 205
2.3. Материалы 206
2.3.1. Коллекция ядов....206
2.3.2. Бактериальные штаммы....206
2.3.3. Клеточные линии 206
2.3.4. Животные....206
2.3.4.1. Метод двухэлектродной фиксации потенциала 206
2.3.4.2. Токсичность, тест отдергивания хвоста....207
2.3.4.3. Болевые тесты....207
2.3.4.4. Невралгия тройничного нерва 208
2.3.4.5. Срезы мозга и спинальные ганглии....208
2.3.4.6. Спинальные ганглии для микроскопии....208
2.3.4.7. Срезы языка 208
2.3.5. Химические соединения, растворители 208
2.3.6. Ферменты....209
2.3.7. Антитела....209
2.4. Методы....210
2.4.1. Спектрофотометрия 210
2.4.1.1. Измерение концентрации полипептидов 210
2.4.1.2. Измерение концентрации нуклеиновых кислот 211
2.4.2. Флуоресцентная спектроскопия 211
2.4.3. Круговой дихроизм....211
2.4.4. Ядерный магнитный резонанс 212
2.4.5. Масс-спектрометрия 213
2.4.5.1. Масс-спектрометрия, сопряженная с жидкостной хроматографией....214
2.4.6. Жидкостная хроматография....215
2.4.6.1. Гель-фильтрация 215
2.4.6.2. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ)....216

2.4.7. Электрофорез белков 217
2.4.8. Органический синтез 218
2.4.9. Восстановление дисульфидных связей и алкилирование тиольных групп 218
2.4.10. Селективный гидролиз полипептидов 219
2.4.10.1. Расщепление по остаткам метионина с помощью бромциана 219
2.4.10.2. Кислотный гидролиз 219
2.4.10.3. Энзиматические методы 219
2.4.11. Секвенирование полипептидов 220
2.4.12. Химический синтез пептидов 221
2.4.13. Работа с нуклеиновыми кислотами 222
2.4.13.1. Очистка нуклеиновых кислот 222
2.4.13.2. Секвенирование ДНК 222
2.4.13.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле 222
2.4.13.4. Рестрикция 223
2.4.13.5. Лигирование 223
2.4.13.6. Полимеразная цепная реакция 223
2.4.13.7. Трансформация 224
2.4.13.8. Отбор трансформантов, несущих целевой ген 224
2.4.13.9. Синтез мРНК 224
2.4.13.10. Выделение нуклеиновых кислот из ядовитых желез 225
2.4.13.11. Амплификация и секвенирование кДНК и фрагментов геномной ДНК 225
2.4.14. Транскриптомика 225
2.4.15. Получение рекомбинантных полипептидов 226
2.4.15.1. Получение синтетических генов 226
2.4.15.2. Экспрессия трансгенов 228
2.4.15.3. Очистка гибридных белков 229
2.4.15.4. Расщепление гибридных белков и очистка искомых соединений 229
2.4.15.5. Получение образцов для крио-ЭМ 230
2.4.16. Липидные везикулы и сферопласты 231
2.4.16.1. Приготовление липосом 231
2.4.16.2. Соосаждение с липосомами 231
2.4.16.3. Изотермы адсорбции 231
2.4.16.4. Получение сферопластов 232
2.4.17. Экспрессия генов ионных каналов и АМП в клетках эукариот 232
2.4.17.1. Экспрессия в ооцитах *X. laevis* 232
2.4.17.2. Экспрессия в клетках линии CHO 232
2.4.17.3. Экспрессия в клетках линий Neuro-2a и HEK293 233
2.4.17.4. Экспрессия АМП в клетках линии HEK293 233

2.4.18. Препараты клеток и тканей животных....233
2.4.18.1. Нейроны головного мозга для изучения Ca^{2+} каналов....233
2.4.18.2. Нейроны головного мозга для изучения GluR....234
2.4.18.3. Чувствительные нейроны для пэтч-клампа....234
2.4.18.4. Культура нейронов спинальных ганглиев крыс для микроскопии....235
2.4.18.5. Срезы языка крысы....235
2.4.19. Электрофизиология....236
2.4.19.1. Метод двухэлектродной фиксации потенциала....236
2.4.19.2. Измерение ω-токов....239
2.4.19.3. Метод локальной фиксации потенциала....239
2.4.19.4. Светочувствительность эффектов на GluR....242
2.4.20. Флуоресцентная микроскопия....242
2.4.21. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия....243
2.4.21.1. Лизис бактерий....243
2.4.21.2. Количественный анализ связывания со сферопластами....243
2.4.22. Многопараметрический анализ чувствительных нейронов....244
2.4.22.1. Стимуляция выделенных нейронов....244
2.4.22.2. Иммунофлуоресцентное окрашивание....245
2.4.22.3. Количественная микроскопия....245
2.4.23. Криоэлектронная микроскопия....246
2.4.23.1. Подготовка образцов и сбор данных....246
2.4.23.2. Обработка изображений....246
2.4.23.3. Построение моделей....247
2.4.24. Радиолигандный анализ....247
2.4.25. Антимикробная активность....248
2.4.26. Активность против хламидий....248
2.4.27. Анализ цитотоксичности....249
2.4.28. Анализ токсичности на насекомых....250
2.4.29. Анализ токсичности на мышах....250
2.4.30. Болевые тесты....250
2.4.30.1. Тест отдергивания хвоста....250
2.4.30.2. ПАФ-тест....251
2.4.30.3. «Уксусные корчи»....251
2.4.30.4. Формалиновый тест....251
2.4.31. Модель остеоартрита....252
2.4.31.1. Тест на силу хвата....252
2.4.31.2. Тест на распределение веса в покое (двухвесовая проба)....252
2.4.31.3. Тест фон Фрея....252

2.4.32. Модель невралгии тройничного нерва....253
2.4.33. Биоэтика....254
2.4.34. Биоинформатика....254
2.4.34.1. Регулярные выражения....254
2.4.34.2. Филогенетические деревья....255
2.4.34.3. Молекулярная эволюция....255
2.4.35. Молекулярное моделирование....255
2.4.35.1. Моделирование по гомологии....256
2.4.35.2. Молекулярная динамика....256
2.4.35.3. Подвижность α-NaTx....257
2.4.35.4. Модели ионных каналов....257
2.4.35.5. Расчет энергии взаимодействия белков....258
2.4.35.6. Молекулярный гидрофобный потенциал....259
2.4.35.7. Картирование свойств полипептидов на молекулярной поверхности....259
2.4.35.8. Модели AlphaFold....260
2.4.36. Статистическая обработка результатов....260
3. Результаты и их обсуждение....261
3.1. Молекулярный состав яда паукообразных и методы разделения....261
3.2. Изучение структуры полипептидных компонентов яда....264
3.3. Получение рекомбинантных пептидов....266
3.4. Анализ активности токсинов в отношении ионных каналов....273
3.5. Токсины паукообразных, воздействующие на K^+ каналы....275
3.5.1. Kalium — база данных полипептидных лигандов K^+ каналов....275
3.5.2. Блокаторы K^+ каналов из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*....283
3.5.2.1. Анализ транскриптома ядовитых желез скорпиона *M. eupeus*....283
3.5.2.2. Использование аналитической системы на основе химеры KcsA-K_v1.1....290
3.5.2.3. Разделение яда и очистка индивидуальных KTx....291
3.5.2.4. Активность новых токсинов....294
3.5.3. Блокаторы K^+ каналов из яда скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*....297
3.5.3.1. Структурно-функциональные особенности токсина OSK3....299
3.5.4. Значение исследования природных блокаторов K^+ каналов....301
3.6. Создание искусственных лигандов K^+ каналов....302
3.6.1. Получение производных α-KTx с измененной активностью....302
3.6.1.1. Моделирование комплексов α-KTx с K_v....302
3.6.1.2. Получение рекомбинантных α-KTx....303
3.6.1.3. MeKTx13-3_AAAR, переключение селективности с K_v1.1 на K_v1.3....303
3.6.1.4. MeKTx13-3_RMRH, увеличение аффинности и селективности к K_v1.1....306
3.6.1.5. CTX_M29I, увеличение аффинности и селективности к K_v1.2....307

3.6.2. Получение блокаторов K^+ каналов на основе α-гарпининов 307
3.6.2.1. Сходство защитных пептидов растений с токсинами паукообразных 307
3.6.2.2. Tk-hefu-1 — пептид на основе α-гарпинина, блокирующий K^+ каналы 308
3.6.2.3. Tk-hefu-2 и 10 — улучшенные блокаторы $K_v1.3$ 312
3.6.2.4. Tk-hefu-11 — уникальный высокоаффинный блокатор $K_v1.6$ 317
3.6.3. Значение исследования искусственных лигандов K^+ каналов 320
3.7. Токсины паукообразных, воздействующие на Na^+ каналы 321
3.7.1. Токсины из яда паука *Heriaeus melloteei* 321
3.7.1.1. Выделение и первичная структура токсинов *H. melloteei*, воздействующих на Na_v 321
3.7.1.2. Получение рекомбинантного Hm-3 323
3.7.1.3. Пространственная структура Hm-3 324
3.7.1.4. Взаимодействие Hm-3 с липидными везикулами 325
3.7.1.5. Активность токсинов *H. melloteei* на Na_v 326
3.7.1.6. Механизм действия Hm-3 на Na_v 328
3.7.2. Токсин Hm-3 — основа для создания лекарства от периодического паралича 332
3.7.2.1. Свойства ω-токов, опосредуемых мутантными каналами $Na_v1.4$ 333
3.7.2.2. Hm-3 ингибирует ω-токи 334
3.7.2.3. Специфичность действия Hm-3 в отношении ПЧД I 336
3.7.2.4. Hm-3 связывается с мотивом весла ПЧД I 337
3.7.2.5. Модель комплекса Hm-3 с ПЧД I 338
3.7.2.6. ПЧД I Na_v как сайт связывания токсинов 340
3.7.2.7. Механизм действия Hm-3 341
3.7.2.8. Токсины как основа для разработки лекарств от гипоПП 344
3.7.3. Токсины из яда паука *Agelena orientalis* 344
3.7.3.1. Выделение и первичная структура токсинов *A. orientalis*, воздействующих на Na_v 344
3.7.3.2. Активность токсинов *A. orientalis* на Na_v 346
3.7.3.3. Механизм действия β/δ-агатоксинов 351
3.7.3.4. β/δ-Агатоксины как представители особого семейства пептидов 353
3.7.3.5. Структурно-функциональные отношения в β/δ-агатоксинах 354
3.7.3.6. Значение исследования β/δ-агатоксинов 356
3.7.4. α-Токсины скорпионов, ингибирующие инактивацию Na^+ каналов 358
3.7.4.1. Разнообразие α-NaTx 358
3.7.4.2. Молекулярная динамика предсказывает модульное строение α-NaTx 358
3.7.4.3. Оценка гидрофильности модуля специфичности α-NaTx 363
3.7.4.4. Предсказание активности α-NaTx 363
3.7.4.5. Получение рекомбинантных α-NaTx и их производных 366

3.7.4.6. Изучение активности BeM9 366
3.7.4.7. Модульное строение α-NaTx....366
3.7.4.8. Активность производных BeM9 369
3.7.4.9. Изучение пространственной структуры α-NaTx....371
3.7.4.10. Анализ структурных особенностей α-NaTx....372
3.7.4.11. Значение исследования α-NaTx 378
3.7.5. Воздействие α-NaTx на внутриклеточные сигнальные каскады 379
3.7.5.1. Скрининг коллекции ядов с помощью HCS 380
3.7.5.2. Очистка активатора PKA-II и ERK1/2 из яда *M. eupeus*....380
3.7.5.3. MeuNaTxα-1 вызывает тепловую гипералъгезию 382
3.7.5.4. MeuNaTxα-1 активирует сигнальные каскады, воздействуя на Na_v....382
3.7.5.5. Активация PKA-II под действием MeuNaTxα-1 требует входа Ca^{2+}....384
3.7.5.6. α-NaTx могут вызывать острую боль или повышать чувствительность ноцицепторов 384
3.8. ω-Lsp-IA — уникальный модулятор Ca^{2+} каналов....385
3.9. Пуротоксины — компоненты яда пауков, воздействующие на P2X рецепторы 390
3.9.1. Выделение и характеристика структуры пуротоксинов....391
3.9.1.1. Выделение пуротоксина-1 из яда паука *Alopecosa marikovskyi* 391
3.9.1.2. Семейство пуротоксина-1....392
3.9.1.3. Получение рекомбинантных пуротоксинов 392
3.9.1.4. Пространственная структура PT1 и PT6 393
3.9.1.5. Выделение и секвенирование пуротоксина-2....395
3.9.2. Молекулярный механизм действия пуротоксинов 396
3.9.2.1. Активность PT1 на чувствительных нейронах крысы....396
3.9.2.2. Активность пуротоксинов на рекомбинантных P2X3 рецепторах....398
3.9.2.3. Селективность действия пуротоксинов на пуриновые рецепторы....398
3.9.3. Биологическая активность пуротоксинов....401
3.9.4. Природная функция пуротоксинов. Перспективы использования пуротоксинов для разработки лекарственных препаратов....405
3.10. Слитные конструкты из нейротоксинов и флуоресцентных белков....409
3.10.1. Слитные конструкты FP-KTx....409
3.10.1.1. Получение химер eGFP-OSK1 и RFP-AgTx-2 409
3.10.1.2. Свойства eGFP-OSK1 и RFP-AgTx-2 411
3.10.2. Слитные конструкты FP-3FTx 414
3.10.2.1. Получение химеры eGFP-α-CbTx 414
3.10.2.2. Активность eGFP-α-CbTx....414
3.10.2.3. Использование eGFP-α-CbTx для мечения nAChR....415
3.10.3. Значение исследования слитных конструктов FP-Tx 416

3.11. Мембрано-активные токсины из яда пауков 417
3.11.1. Яд паука *Lachesana tarabaevi* — уникальный источник мембрано-активных токсинов 417
3.11.1.1. Выделение мембрано-активных токсинов из яда *L. tarabaevi* 419
3.11.1.2. Биологическая активность Rpe, MLys и CIT 420
3.11.1.3. Уникальный состав яда *L. tarabaevi* 420
3.11.2. Мембрано-активные токсины из яда паука *Oxyopes takobius* 423
3.11.2.1. Выделение и секвенирование новых мембрано-активных токсинов из яда *O. takobius* 423
3.11.2.2. Анализ транскриптома ядовитых желез паука *O. takobius* 425
3.11.2.3. Биологическая активность новых токсинов 426
3.11.2.4. Уникальная структура оксиопинина 4a 429
3.11.3. Мембрано-активные токсины из яда пауков подавляют развитие хламидий 433
3.11.4. Значение исследования цитолитических пептидов 436
3.12. Модульные токсины из яда паукообразных 437
3.12.1. Модульное строение цитоинсектотоксинов 437
3.12.1.1. Вторичная структура модулей CIT 1a 437
3.12.1.2. Биологическая активность модулей CIT 1a 438
3.12.1.3. Цитоинсектотоксины — уникальные модульные цитолитики 438
3.12.2. Латартоксины, модульные токсины из яда паука *L. tarabaevi* 439
3.12.2.1. Аминокислотная последовательность LtTx 440
3.12.2.2. Белки-предшественники LtTx 441
3.12.2.3. Модульное строение латартоксинов 441
3.12.2.4. Биологическая активность LtTx и LtTx 1a-C 442
3.12.2.5. Мембранная активность LtTx 1a и LtTx 1a-C 443
3.12.3. Пуротоксин-2 из яда *A. marikovskyi* 444
3.12.3.1. Синтез PT2, PT2-N и PT2-C 444
3.12.3.2. Вторичная структура PT2 и PT2-C 445
3.12.3.3. Пространственная структура PT2 446
3.12.3.4. Взаимодействие PT2 и PT2-C с липидными мембранами 446
3.12.4. Спайдерины, модульные токсины из яда *O. takobius* 449
3.12.4.1. Первичная структура OtTx 449
3.12.4.2. Последовательности кДНК и белков-предшественников OtTx 451
3.12.4.3. Спайдерины *Oxyopes lineatus* и их сравнение с OtTx 451
3.12.4.4. Структура генов OlTx 453
3.12.4.5. Получение полноразмерного OtTx 1a и его модулей 454
3.12.4.6. Вторичная структура OtTx 1a 455
3.12.4.7. Пространственная структура модулей OtTx 1a 455

3.12.4.8. Биологическая активность OtTx 1a и его модулей 458
3.12.4.9. Механизм антибактериальной активности OtTx 1a-AMP 459
3.12.4.10. Взаимодействие модулей OtTx 1a с липидными мембранами 459
3.12.4.11. Эволюция OtTx 460
3.12.5. Модульные токсины *Cheiracanthium punctorium* 462
3.12.5.1. Разделение яда *Ch. punctorium* и первичная структура двудоменных токсинов 463
3.12.5.2. Последовательности кДНК и белков-предшественников CpTx 467
3.12.5.3. Структура генов CpTx 469
3.12.5.4. Вторичная структура CpTx 469
3.12.5.5. Биологическая активность и механизм действия CpTx 470
3.12.5.6. Эволюция CpTx 473
3.12.6. Разнообразие двудоменных токсинов паукообразных 475
3.13. Ацилполиамины — инструменты изучения глутаматных рецепторов 477
3.13.1. Структура комплексов GluR с поровыми блокаторами 478
3.13.1.1. Активность блокаторов на GluA2Q-STZ 478
3.13.1.2. Общая структура комплексов 478
3.13.1.3. Детали взаимодействия поровых блокаторов с GluR 480
3.13.2. Получение светопереключаемых блокаторов GluR 481
3.13.2.1. ABSP-1 481
3.13.2.2. ABSP-6 482
3.13.3. Значение исследований блокаторов GluR 485
Заключение 487
Выводы 493
Список сокращений 495
Апробация работы, публикации, диссертации 498
Благодарности 505
Список литературы 509

Введение

По-видимому, даже раньше возникновения древнейших цивилизаций люди знали о существовании природных ядов и существ, производящих яд, — на это указывают наблюдения за человекообразными обезьянами, которые избегают контакта со змеями и крупными пауками. А древнейшие литературные памятники свидетельствуют в пользу раннего использования природных ядов человеком — зачастую по прямому назначению, т.е. для отравления неугодных. К примеру, в Древней Греции отравление болиголовом применялось в качестве исполнения смертельного приговора; считают, что именно им был отравлен Сократ. Известна богатая «традиция» отравлений правителей и сановников в Персии, Индии, Древнем Риме, Византии, Арабских халифатах. Сложно сказать, какие именно яды стали использоваться первыми и для каких именно целей. Вероятный сценарий подразумевает изготовление отравленных стрел древнейшими людьми для охоты. На это указывает этимология современного термина «токсин» (греч. τοξικόν — toxikon, стрелковый яд, происходит от греч. toxon, лук, персидск. taxa, стрела), а также широкое распространение подобной практики среди аборигенных племен по всему Земному шару: например, индейцы Центральной и Южной Америки используют растительный яд кураре или секрет кожи лягушек-древолазов, жители Восточной Африки берут сок акокантеры, а бушмены — гемолимфу жуков-диамфидий.

Здесь важно оговориться, что на современном этапе *ядом* называют непосредственную смесь биологического происхождения (секрет ядовитой железы), а *токсинами* — индивидуальные компоненты яда (причем почти любые, вне зависимости от установленной токсичности, — за исключением воды, солей и некоторых других просто устроенных низкомолекулярных компонентов или, напротив, полимерных компонентов слизи). В настоящее время растет число известных веществ, являющихся компонентами ядов, но функция которых не состоит в проявлении токсичности, и мы наблюдаем использование термина «токсин» и в более узком смысле. Важна и другая оговорка: в англоязычной литературе традиционно используются два разных термина: “venom” и “poison”, оба переводятся как «яд», но в первом случае имеют в виду вооруженных (активных) ядовитых животных, а во втором — невооруженных животных и других организмов, использующих яд главным образом в целях защиты. В настоящее время имеет место дискуссия по поводу точного значения и применимости этих терминов, предлагаются разные определения и дополнительные термины; как бы то ни было, яды, исследованные диссертантом, понимаются таковыми в узком, классическом смысле слова “venom”.

Использование ядовитых организмов и ядов в медицинских целях тоже имеет древнюю историю: пожалуй, в любых сводах так называемой «традиционной» медицины обнаруживаются рецепты с применением ядовитых растений или даже животных. А максима Па-

рацельса «всё есть яд, и всё есть лекарство — различие лишь в дозе» символизирует переход к эре научного исследования ядов и токсинов, современный период которой начался в конце XIX века и сопровождается изучением молекулярных основ ядовитости и молекулярного механизма действия токсинов. Сложилось крупное научное направление — токсикология, занимающаяся указанными направлениями. В последние десятилетия принято также выделять *токсинологию* — область знаний, посвященную всестороннему исследованию природных токсинов (их биосинтеза, структуры, механизма действия и эволюции, а также биологического значения и функции). Помимо любопытства, исследователями, работающими в этой области, движут три причины:

1) необходимость разработки эффективных противоядий — очевидно, что, разобравшись в механизме действия яда, создать противоядие проще;
2) возможность использования токсинов как молекулярных инструментов исследования их мишеней, прежде всего нейрорецепторов;
3) возможность создания на основе токсинов новых лекарств.

Актуальность темы исследования:

Порядку перечисления указанных выше причин свойственен историзм, хотя и не строгий: если в первой половине–середине XX века главной движущей силой в исследованиях ядов была именно потребность в противоядиях, то с 1970-х гг. фокус сместился в сторону применения токсинов для изучения молекулярной организации нервной системы. Пожалуй, главными вехами, послужившими смене приоритетов, стало использование α-бунгаротоксина (α-BgTx) для выделения никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR), а также тетродотоксина (TTX), сакситоксина (STX) и токсинов скорпионов — для характеристики потенциал-чувствительных натриевых (Na^+) каналов (Na_v). Наконец, в последние два десятилетия мы наблюдаем очередную смену приоритетов: теперь большинство ведущих исследовательских коллективов в области токсинологии так или иначе занимаются поиском и разработкой кандидатов в лекарственные препараты. Наиболее важным достижением в этом направлении стала разработка принципиально нового анальгетика на основе токсина морского моллюска и введении в рынок лекарственного препарата Prialt, который был разрешен к применению Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (Food and Drug Administration, FDA) в 2004 г. Таким образом, в настоящее время актуальность изучения ядов и токсинов обусловлена возможностью получения на их основе уникальных исследовательских инструментов и создания лекарств.

Степень разработанности темы исследования:

Яду паукообразных в токсинологии отводится особое место. Во-первых, укусы скорпионов занимают второе место (после змей) по числу смертей от отравления ядом животных. Во-вторых и в-главных, многие токсины паукообразных послужили наиболее известными молекулярными инструментами, используемыми учеными для изучения нервной системы. Выше уже упоминались токсины скорпионов, которые были использованы для выделения и характеристики Na^+ каналов. Ацилполиамины из яда пауков-«кругопрядов» применяют для изучения глутаматных рецепторов (GluR). α-Латротоксин (α-LTX) из яда каракурта был использован для раскрытия молекулярной организации синапсов и механизма секреции нейромедиаторов. Харибдотоксин из яда желтого палестинского скорпиона помог в исследованиях строения калиевых (K^+) каналов, а ханатоксин 1 из яда чилийского розового птицееда — в изучении механизма их активации. Наконец, современная номенклатура кальциевых (Ca^{2+}) каналов основана на использовании ω-агатоксина IV из яда американских воронковых пауков в качестве маркера одного из типов этих каналов.

В-третьих, яд паукообразных в настоящее время представляется наиболее богатым источником природных токсинов, ввиду беспрецедентного видового (свыше 50 тысяч видов, способных производить яд; по-видимому, больше видов насчитывают паразитоидные осы, яд которых почти не изучен) и молекулярного (десятки и сотни компонентов в одном яде) разнообразия. Даже с учетом результатов, полученных нами, только малая часть этого многообразия изучена (менее 1% видов и исчезающе малая доля индивидуальных токсинов).

Разнообразию токсинов соответствует разнообразие их мишеней в организме жертвы или агрессора. Прежде всего, это ионные каналы и нейрорецепторы, участвующие в передаче нервных импульсов, однако, как оказывается, и многие другие белки. В последнее время, в том числе нашими стараниями, получила распространение формула «к любому рецептору в нервной системе (или: к любому ионному каналу) найдется свой токсин», основанная исключительно на наблюдении природного разнообразия. И действительно, во множестве публикаций в настоящее время рассказывается о поиске токсинов из яда паукообразных, воздействующих на фармакологически важные мишени в организме человека — с целью дальнейшей разработки на их основе лекарственных препаратов. Логика использования именно этого биологического источника усматривается как раз в указанной эмпирической формуле.

Цель и задачи работы:

Представляемая работа посвящена исследованию молекулярного состава яда и изучению молекулярного механизма действия токсинов паукообразных, поиску и характеристике интересных с точки зрения фармакологии компонентов яда.

Цель работы — характеристика многообразия токсинов паукообразных.

Экспериментальные задачи:

1. Осуществить анализ пептидного состава яда пауков и скорпионов;
2. Провести исследование транскриптома ядовитых желез пауков и скорпионов;
3. Идентифицировать и выделить индивидуальные токсины из цельных ядов;
4. Установить первичную структуру веществ, воздействующих на потенциал-чувствительные и лиганд-активируемые ионные каналы;
5. Осуществить функциональную характеристику новых веществ;
6. Изучить нуклеотидную последовательность генов и аминокислотную последовательность предшественников токсинов;
7. Разработать системы гетерологичной экспрессии генов новых пептидных токсинов;
8. Оценить прикладной потенциал новых соединений с точки зрения создания новых молекулярных инструментов и разработки лекарственных препаратов.

Научная новизна исследования:

Изучен состав яда четырех видов пауков (*Alopecosa marikovskyi, Cheiracanthium punctorium, Heriaeus melloteei, Oxyopes takobius*) и двух видов скорпионов (*Mesobuthus eupeus, Orthochirus scrobiculosus*). Установлена аминокислотная последовательность нескольких сотен не изученных ранее токсинов паукообразных (по транслированным нуклеотидным последовательностям, нескольких десятков — по белку). Осуществлена характеристика биологической активности нескольких десятков не изученных ранее токсинов. Получено несколько десятков рекомбинантных токсинов и их аналогов, охарактеризована их биологическая активность, в том числе на молекулярных мишенях.

Открыто семейство защитных пептидов растений α-гарпининов, проявляющих структурное сходство с токсинами скорпионов. Получены селективные блокаторы всех чувствительных к токсинам изоформ K^+ каналов подсемейства K_v1. Впервые показано, что природные токсины способны ингибировать так называемые «ω-токи» в мутантных Na^+ каналах. Впервые получен лиганд потенциал-чувствительного домена I повтора Na^+ каналов. Охарактеризована новая группа селективных модуляторов Na^+ каналов насекомых с уникальными фармакологическими свойствами, что ставит под сомнение существующую классификацию лигандов Na^+ каналов в зависимости от сайтов связывания. Показано, что токсины скорпионов способны активировать внутриклеточные сигнальные каскады нейронов, воздействуя на Na^+ каналы. Получен уникальный «мягкий» ингибитор Ca^{2+} каналов P-типа, замедляющий их активацию. Открыты пуротоксины — первые в мире природные селективные ингибиторы рецепторов P2X3, которые показывают высокую анальгетическую активность в животных

моделях. Охарактеризовано разнообразие мембрано-активных токсинов из яда пауков, значительно превосходящее известные данные. Открыты модульные (двудоменные) токсины паукообразных со всеми возможными комбинациями дисульфид-богатых и/или линейных модулей.

Изучена пространственная структура девяти токсинов паукообразных, в том числе в условиях моделирования мембранного окружения, трех защитных пептидов растений и двух искусственных пептидов на их основе. Впервые изучена пространственная организация комплекса GluR с поровым блокатором — токсином паука.

Впервые получены генетически кодируемые флуоресцентные лиганды потенциал-чувствительных и лиганд-активируемых ионных каналов с различной селективностью и спектральными характеристиками. Впервые получены светоуправляемые поровые блокаторы GluR AMPA-типа.

Теоретическая и практическая значимость:

Существенно расширены круг известных токсинов и наши представления о составе яда паукообразных. Открыты новые семейства и классы токсинов с уникальными структурными и функциональными особенностями. Предложены механизмы возникновения и дальнейшей эволюции модульных (двудоменных) токсинов паукообразных.

Создана база данных Kalium, которая впервые предоставила исчерпывающую информацию обо всех известных полипептидных лигандах K^+ каналов. Селективные блокаторы различных изоформ K^+ каналов были получены путем (а) поиска и выделения из природного источника, (б) рационального изменения селективности токсинов с использованием молекулярного моделирования и сайт-направленного мутагенеза, (в) с помощью скаффолд-инженерии на основе неактивного шаблона. Показано модульное строение α-токсинов скорпионов, ингибирующих инактивацию Na^+ каналов, обнаружены особые структурные мотивы, определяющие укладку их «модуля специфичности». Предложены способы предсказания и изменения селективности α-токсинов.

Получены высокоаффинные и селективные лиганды ионных каналов и ионотропных рецепторов: $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$, $K_v1.6$, $Na_v1.4$, $DmNa_v1$, $BgNa_v1$, $Ca_v2.1$, GluR, P2X3. Эти соединения могут быть использованы как молекулярные инструменты для изучения структуры и функции перечисленных белков-рецепторов, их физиологической роли и участия в развитии заболеваний. Создан новый класс молекулярных исследовательских инструментов — слитные конструкты из нейротоксинов и флуоресцентных белков. Показана их применимость для визуализации потенциал-чувствительных и лиганд-активируемых ионных каналов и поиска новых лигандов. На основе полученных структурных данных создан другой новый

класс молекулярных исследовательских инструментов — светоуправляемые поровые блокаторы GluR AMPA-типа. Показана их применимость для управления функцией рецепторов на срезах мозга.

Помимо использования в фундаментальных исследованиях, у полученных соединений имеется потенциал с точки зрения применения в медицине. Блокаторы K_v1.1, 1.2 и 1.6 могут найти применение для создания лекарств от атаксии и эпилепсии. Блокаторы K_v1.3 в настоящее время разрабатываются для терапии различных аутоиммунных заболеваний. Селективный модулятор Ca_v2.1 может быть востребован в случае атаксии, мигрени, хронической боли и эпилепсии. Ингибитор ω-токов, обнаруженный нами, — надежда для разработки способов лечения периодических параличей. Блокаторы GluR изучаются как основа для терапии инсульта и эпилепсии. Обнаруженные и исследованные нами мембрано-активные пептиды могут стать новым поколением антибиотиков, в частности для контроля внутриклеточных паразитических бактерий. Наибольшее практическое значение имеют пуротоксины, в настоящее время на их основе ведется разработка препарата от воспалительной боли и хронического кашля. Наконец, открытые и созданные нами селективные инсектотоксины представляют немалый интерес для получения новых безопасных биоинсектицидов.

Методология и методы исследования:

В работе использовались современные методы биоорганической химии, молекулярной биологии и биохимии. Разнообразие токсинов паукообразных характеризовали с помощью подходов транскриптомики и протеомики (пептидомики). Яд паукообразных разделяли с помощью хроматографии. Аминокислотную последовательность полипептидов устанавливали с помощью комбинации аналитических методов, включавших секвенирование по Эдману и селективный протеолиз. Токсины получали также химическим синтезом или в бактериальной системе экспрессии. Индивидуальные соединения характеризовали с помощью масс-спектрометрии, спектроскопии кругового дихроизма. Пространственную структуру токсинов изучали методами спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР), комплекса с рецептором — с помощью криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ). Активность токсинов изучали на липидных везикулах, клеточных культурах и выделенных нейронах, препаратах тканей, использовали методы электрофизиологии, радиолигандного анализа и флуоресцентной микроскопии. Токсичность оценивали на насекомых и грызунах. На последних также ставили болевые тесты для оценки анальгетической активности. Анализ белковых и нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью биоинформатики. Структурные свойства токсинов и их взаимодействие с рецепторами оценивали с использованием молекулярного моделирования.

Положения, выносимые на защиту:

1. Создана общедоступная база данных Kalium, вобравшая в себя информацию обо всех известных полипептидных лигандах K^+ каналов. Создана база данных α-токсинов скорпионов, ингибирующих инактивацию Na^+ каналов.
2. Изучен состав яда шести видов пауков (*Alopecosa marikovskyi, Agelena orientalis, Cheiracanthium punctorium, Heriaeus melloteei, Lachesana tarabaevi, Oxyopes takobius*) и двух видов скорпионов (*Mesobuthus eupeus, Orthochirus scrobiculosus*).
3. Из яда скорпионов *M. eupeus* и *O. scrobiculosus* получены высокоаффинные пептидные блокаторы потенциал-чувствительных K^+ каналов.
4. Предложен и реализован подход рационального изменения селективности блокаторов K^+ каналов с использованием молекулярного моделирования комплексов и внесения аминокислотных замен для усиления или ослабления изоформ-специфичных контактов.
5. Открыто семейство защитных пептидов растений α-гарпининов. Их укладка, состоящая из двух антипараллельных α-спиралей, скрепленных двумя дисульфидными мостиками, использована как каркас в скаффолд-инженерии для создания селективных поровых блокаторов K^+ каналов.
6. Получены селективные высокоаффинные блокаторы изоформ K_v1.1, 1.2, 1.3 и 1.6.
7. Из яда паука *H. melloteei* получены ингибиторы потенциал-чувствительных Na^+ каналов. Токсин Hm-3 — ингибитор активации Na^+ каналов, воздействующий на потенциал-чувствительный домен I повтора.
8. Hm-3 угнетает ω-токи, возникающие у мутантных Na^+ каналов Na_v1.4 с заменами в сенсоре потенциала домена I.
9. Из яда паука *A. orientalis* получены селективные модуляторы потенциал-чувствительных Na^+ каналов насекомых, воздействующие на процессы их активации и инактивации.
10. α-Токсины скорпионов содержат консервативный и стабильный сердцевинный модуль и вариабельный и мобильный модуль специфичности, определяющий их селективность в отношении изоформ Na^+ каналов.
11. Предложен и реализован подход рационального изменения селективности α-токсинов скорпионов путем манипуляции структурой их модуля специфичности.
12. На основе α-подобного токсина получены селективный млекотоксин и инсектотоксин.
13. α-Токсины скорпионов способны активировать внутриклеточные сигнальные каскады чувствительных нейронов.
14. Из яда паука *A. marikovskyi* получен селективный модулятор потенциал-чувствительных Ca^{2+} каналов P-типа (Ca_v2.1), замедляющий процесс их активации.

15. Из яда пауков получены пуротоксины — селективные ингибиторы пуринергических рецепторов млекопитающих P2X3, проявляющие высокую антиноцицептивную активность в болевых моделях на животных.

16. Получены слитные конструкты, состоящие из флуоресцентных белков и нейротоксинов, селективно связывающиеся с потенциал-чувствительными K^+ каналами и никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами и пригодные для их визуализации в клетках и тканях.

17. Из яда пауков получены мембрано-активные пептиды с антимикробной активностью.

18. Цитолитические токсины пауков угнетают развитие внутриклеточных паразитических бактерий.

19. Из яда пауков получены модульные или двудоменные токсины со всеми возможными сочетаниями дисульфид-богатых и линейных модулей.

20. Ацилполиамины из яда пауков блокируют пору Ca^{2+}-проницаемых глутаматных рецепторов, связываясь с открытым состоянием и внедряя свой хвост в селективный фильтр.

21. Получены высокоаффинные и селективные светоуправляемые блокаторы Ca^{2+}-проницаемых глутаматных рецепторов AMPA-типа.

Степень достоверности и апробация результатов:

Степень достоверности полученных результатов представляется высокой, поскольку в исследованиях мы руководствовались общепринятым экспериментальным подходом и использовали известные в области методики, а для оценки достоверности применяли адекватные статистические критерии. Результаты работы верифицируемы и могут быть воспроизведены независимо. Более того, многие результаты так и были проверены и подтверждены другими исследователями, о чем можно узнать по спискам цитирования соответствующих публикаций. Некоторые результаты находят практическую реализацию. Выдвинутые нами гипотезы, в целом, благоприятно восприняты научным сообществом.

По результатам работы опубликовано 80 работ, включая 77 статей в рецензируемых научных журналах, и 5 патентных заявок (см. список в специальном разделе, стр. 497). Результаты докладывались на множестве российских и международных конференций.

Основная часть

1. Обзор литературы

1.1. Ядовитые паукообразные

Среди членистоногих особое место занимает класс паукообразные (Arachnida), в составе которого объединяют восьминогих существ, не имеющих усиков или крыльев, со слившейся головогрудью и брюшком. Представители трех отрядов паукообразных — пауков (Araneae, свыше 45 тысяч видов) (1), скорпионов (Scorpiones, около двух тысяч видов) (2) и ложноскорпионов (Pseudoscorpiones, более трех тысяч видов) (3) — способны выделять яд и вводить его в тело жертвы посредством специального аппарата, т.е. являются вооруженными (активными) ядовитыми животными. Удивительно при этом, что ядовитость развилась у этих таксонов независимо, и их ядовитые органы не гомологичны друг другу. Ядовитые железы пауков лежат в хелицерах и головогруди, а их протоки открываются на когтевидных члениках. У ложноскорпионов ядовитые железы располагаются в клешнях педипальп, открываясь протоками на их кончиках. Ядовитые железы скорпионов располагаются в тельсоне, увенчанном жалом, где открываются парные выносные протоки.

Несмотря на большое число описанных видов, яд ложноскорпионов практически не исследован, ему посвящено только несколько публикаций. Что касается индивидуальных токсинов, то известна антимикробная, цитолитическая и инсектицидная активность одного пептида из яда книжного ложноскорпиона *Chelifer cancroides* (4).

Представители отряда телифоны (Thelyphonida, «уксусные скорпионы») в целях защиты способны распылять едкую жидкость из специализированных желез пигидия (5), чем напоминают жуков-бомбардиров (6). Кроме того, многие авторы рассматривают секрет паразитических клещей (подкласс Acari), который те вводят в тело хозяина, как разновидность яда, а содержащиеся в секрете токсины могут приводить к параличу и даже смерти (7-11). Однако подавляющее большинство публикаций посвящено исследованию яда пауков и скорпионов, которые являются потому одними из наиболее изученных ядовитых животных.

С точки зрения видового разнообразия отряд пауки — бесспорный лидер среди всех ядовитых животных. Из более чем 45 тысяч известных видов представители только 2–3 сотен вторично лишились ядовитых желез (12), считающихся плезиоморфным признаком отряда, а все остальные способны синтезировать яд, который — за редкими исключениями (13) — вводится в жертву с помощью прокалывания когтевидными члениками хелицер. Яду и токсинам пауков посвящено свыше 3900 публикаций (поиск в PubMed по запросу "(spider venom) OR spider toxin" 25 сентября 2024 г.), при этом охарактеризовано порядка 1560 индивидуальных пептидных или белковых токсинов (поиск в UniProt по запросу

"(taxonomy_id:6893) AND (cc_tissue_specificity:venom)" 25 сентября 2024 г.) из 141 вида 24 семейств (по данным Tox-Prot, специализированной части UniProt, посвященной токсинам (14), и проекта VenomZone: https://venomzone.expasy.org/). С учетом низкомолекулярных соединений различной химической природы в настоящее время изучено менее 200 видов (меньше 0,5% природного разнообразия) из чуть более 30 семейств (≈30%) (15). Так что несмотря на то, что яд пауков представляется хорошо изученным в сравнении со многими другими животными — по числу публикаций, ему посвященных, и по объему накопленных данных, — стоит признать, что наши знания об этом объекте весьма ограничены.

Яд скорпионов изучен не хуже, его активности, молекулярному составу и токсинам посвящено свыше 5800 публикаций [поиск в PubMed по запросу "(scorpion venom) OR scorpion toxin" 25 сентября 2024 г.], охарактеризовано порядка 1060 индивидуальных пептидных или белковых компонентов яда [поиск в UniProt по запросу "(taxonomy_id:6855) AND (cc_tissue_specificity:venom)" 25 сентября 2024 г.] из 96 видов (меньше 5% природного разнообразия) 9 семейств (из 13; по данным VenomZone).

1.2. Медицинское значение яда паукообразных

Пауки и скорпионы традиционно воспринимаются как одни из наиболее опасных для человека животных. Действительно, укус некоторых из них может доставить большие неприятности и даже быть смертельным (таблица 1). Однако в целом медицинское значение этих существ в массовом сознании сильно преувеличено. К примеру, до конца XVII века в Европе считалось, что укусы пауков рода *Lycosa* вызывают симптомы «тарантизма», а к середине XIX века было выяснено, что одним из главных факторов этого синдрома являлась истерия (16). За всё время систематического учета в XX веке от укусов пауков погибло не более 100 человек (17), а из более 45 тысяч видов реальную угрозу здоровью человека, согласно современным источникам, представляют особи лишь порядка 200 из нескольких родов (18, 19) (основные примеры собраны в таблице 1). Что касается скорпионов, то их укусы — сравнительно бóльшая проблема для здравоохранения, ежегодно жертвами становятся около миллиона человек, имеет место порядка 3000 смертельных исходов (20). Для сравнения: от укусов змей каждый год страдают миллионы, а погибают около 100 тысяч человек (21).

Клиническая картина отравления ядом паукообразных различается в зависимости от вида животного, его индивидуальных особенностей (пола, размера и других), дозы введенного яда, места укуса и индивидуальных особенностей пострадавшего (иммунологического статуса, переносимых заболеваний, приема медикаментов, алкогольного опьянения и т.д.). Наибольшую опасность для жизни человека представляют американские «странствующие» пауки семейства Ctenidae (род *Phoneutria*), австралийские «воронковые» пауки семейства Atracidae (ранее Hexathelidae, роды *Atrax* и *Hadronyche*) и скорпионы семейства Buthidae (например, роды *Androctonus* и *Leiurus*; на территории бывшего СССР распространены два вида: малый азиатский желтый скорпион *Mesobuthus eupeus* и черный скорпион *Orthochirus scrobiculosus*). Интересно, что, по-видимому, во всех трех случаях непосредственно летальными токсинами яда служат активаторы Na_v (подробнее см. ниже в разделе «Токсины, воздействующие на Na^+ каналы») (22-24), при этом, по крайней мере, у пауков и скорпионов такие токсины возникли независимо. Ввиду сходного молекулярного механизма действия основных токсичных компонентов яда указанных паукообразных, сходна и клиническая картина отравления, проявляющаяся в типичных симптомах нейротоксичности и нервного возбуждения, связанного с неконтролируемым выбросом нейромедиаторов (так называемая «катехоламиновая буря») (25, 26). В особо тяжелых случаях смерть наступает в результате остановки дыхания от спазма дыхательной мускулатуры, легочного отека или сердечно-сосудистого коллапса. В последнее время исследователи отводят важную роль реакциям со

стороны иммунной системы, в частности системному воспалительному ответу при отравлении ядом скорпионов (27).

Тем не менее, среди пауков наибольшее медицинское значение имеют два других рода, что связано с их распространением и частотой встреч с человеком. Это пауки-«вдовы» (род *Latrodectus*) семейства Theridiidae (пауки-тенетники), распространенные на всех континентах, за исключением Антарктиды (в России и других странах на территории бывшего СССР распространен каракурт *Latrodectus tredecimguttatus*), и пауки-«отшельники» семейства Sicariidae (род *Loxosceles*), встречающиеся в теплых областях по всему Земному шару, но наиболее характерные для Нового Света (от юга США до Бразилии). В обоих случаях действующим началом яда служит белковый токсин, однако на этом сходства заканчиваются. У пауков рода *Latrodectus* в яде содержится мощный нейротоксин α-LTX, вызывающий непроизвольный выброс нейромедиаторов из нервных окончаний (подробнее см. ниже в разделе «Латротоксины») (28). Множественные симптомы отравления («латродектизм», см. таблицу 1) связывают с действием именно этого нейротоксина. При укусах «ложных вдов» (рода *Steatoda* того же семейства Theridiidae) развивается «стеатодизм» — легкая форма латродектизма (29).

Главный активный компонент яда пауков рода *Loxosceles* — фермент фосфолипаза D (PLD; часто в литературе обозначается как «сфингомиелиназа D» из-за селективной активности в отношении сфингомиелина; подробнее см. ниже в разделе «Некротоксины из яда *Loxosceles*»), обладающий цитотоксическими свойствами, но также выступающий в роли мощного индуктора воспаления (30, 31). Сами укусы в данном случае почти безболезненны, однако впоследствии развиваются кожные язвы различной степени тяжести, а в ≈10% случаев имеют место системные эффекты вплоть до летального исхода. Данный арахноз носит название «локсосцелизм» или некротический арахноз / «арахнидизм». Пауки родов *Hexophthalma* и *Sicarius* того же семейства Sicariidae производят похожий на представителей рода *Loxosceles* яд с PLD, однако случаи укусов ими людей малочисленны и плохо документированы ввиду обитания этих пауков в малонаселенных районах, например в пустынях (32, 33).

Несколько особняком стоят отравления при укусах клещей. Среди разнообразных токсикозов, вызываемых клещами, особое место принадлежит паралитическому акаризму, в этом случае можно говорить об активной ядовитости клещей, впрыскивающих в составе слюны в тело жертвы нейротоксин (9). Молекулярная природа ядовитости в данном случае плохо изучена, по-видимому, действующим началом секрета австралийских паралитических клещей *Ixodes holocyclus* служат пептидные нейротоксины, ингибирующие потенциалчувствительные Ca^{2+} каналы (Ca_v) (34).

Таблица 1. Паукообразные, имеющие медицинское значение.

Систематическое положение	Картина отравления	Действующее начало яда	Литература
Австралийские воронковые пауки родов *Atrax* и *Hadronyche* (Atracidae)	Местная боль, подергивание мышц, мышечный спазм, парестезия, общее возбуждение, повышение давления, нарушение сердечного ритма, тошнота, рвота, потоотделение, слезотечение, слюноотделение, отек легких, кома. Возможен летальный исход.	Пептиды робустоксин, версутоксин (δ-атракотоксины), активаторы Na_v	(23, 25, 35)
Американские странствующие пауки рода *Phoneutria* (Ctenidae)	Местная боль, обильное слюно- и потоотделение, гипотермия, тошнота, рвота, головокружение, нарушение зрения, приапизм у мужчин, тахикардия, гипертония, отек легких, шок, с угрозой для жизни.	Пептидный токсин PnTx2-6, активатор Na_v	(24, 36)
Пауки-вдовы рода *Latrodectus* (Theridiidae)	Латродектизм: местная, регионарная или генерализованная боль, мышечный спазм и судороги, парестезия, слюно- и потоотделение, пилоэрекция, тошнота, рвота, тревожность, вялость, гипертония, тремор. Возможен смертельный исход.	Белковый нейротоксин α-LTX, необратимый стимулятор выброса нейромедиаторов	(28, 37)
Пауки-отшельники рода *Loxosceles* (Sicariidae)	Локсосцелизм (некротический арахноз / арахнидизм): местный дермонекроз различной тяжести, иногда сопровождающийся системными эффектами: лихорадкой, лейкоцитозом, тошнотой, рвотой, тромбоцитопенией, гемолизом, диссеминированным внутрисосудистым свертыванием, острой почечной недостаточностью, шоком, комой — и смертью.	Белок фосфолипаза D, цитотоксин, дермотоксин, некротоксин, провоспалительный агент	(30, 31, 38)
Скорпионы родов *Androctonus*, *Centruroides*, *Leiurus*, *Tityus* и других (Buthidae)	Сильная и продолжительная боль, возбуждение, лихорадка, потоотделение, чередование гипертонии и гипотонии, тошнота, рвота, диарея, приапизм, брадикардия, обструкция и отек легких, бронхоспазм, цианоз, гипертермия, сердечная аритмия, признаки ишемии миокарда, шок. Возможен смертельный исход.	Пептидные α- или β-токсины, активаторы Na_v	(20, 39-41)
Клещи родов *Ixodes*, *Dermacentor* и других (Ixodidae)	Паралитический акаризм: восходящая вялая тетраплегия с возможным смертельным исходом в результате дыхательной недостаточности.	По-видимому, пептидные блокаторы Ca_v	(9, 34)

1.2.1. Лечение отравлений и противоядия

Терапия укусов паукообразных в большинстве случаев традиционно имеет симптоматический характер. При этом в истории развития методов лечения укусов наблюдаются общие тенденции: достаточно быстрое распространение практики применения определенных препаратов, вызванное публикацией успешных результатов лечения, и внезапная смена своеобразной «моды» на их использование вслед за публикацией отрицательных результатов и объявлением более высокой эффективности другого препарата. Так, например, в случае латродектизма на протяжении почти всего XX века эффективным средством против укусов черной вдовы считалось внутривенное (i.v.) введение солей кальция, например глюконата кальция. В 1990-е гг. появились убедительные свидетельства о его малой эффективности, и «мода» сменилась на использование мышечных релаксантов (например, бензодиазепинов) и опиатов или опиоидных анальгетиков (например, морфина), при этом противоядиям на основе сывороток отводилась роль препаратов для тяжелых случаев. Затем по мере накопления результатов нерандомизированных клинических исследований в 2000-е гг. сложилось представление о сыворотках как основном препарате выбора при латродектизме. Наконец, в последнее время активно обсуждаются результаты рандомизированных плацебо-контролируемых исследований, указывающих на недостаточную эффективность сывороток в отношении тяжелой и персистирующей боли, главного симптома отравлений, и ставится вопрос о поиске других решений (42).

В последние десятилетия главным препаратом для терапии отравлений стали противоядия, являющиеся сывороткой крови лошадей, иммунизированных ядом паукообразных (18, 41, 43-47). В настоящее время на мировом рынке представлено порядка 20 препаратов сывороток от укуса скорпионов и порядка 10 — для лечения укусов пауков (48). Первые примеры получения сывороток для этих целей относятся к началу XX века, вслед за сыворотками от укуса змей (49-51), а лидерами в их разработке и производстве являются Мексика и Бразилия, страны, где не только сравнительно велико число случаев отравлений, но и традиционно сильны научно-исследовательские коллективы в области токсинологии. На территории бывшего СССР производится сыворотка против яда паука каракурта (ООО «UZBIOPHARM»; http://uzbiopharm.uz/), разработанная в Ташкентском научно-исследовательском институте вакцин и сывороток (1950–70-е гг.).

Действующее начало сыворотки — антитела, которые могут нейтрализовать действие токсинов, содержащихся в яде, за счет образования с ними комплексов по нескольким механизмам: (а) блокировать активный центр токсина, необходимый для проявления токсичности, (б) стерически препятствовать связыванию токсина с мишенью, (в) мешать его распространению в теле жертвы или (г) способствовать выведению из организма. При этом исполь-

зование таких противоядий в некоторых случаях вызывает побочные эффекты, прежде всего связанные с иммунной (аллергической) реакцией на белки сыворотки, которая может привести к анафилактическому шоку (52-54). Вероятность побочных реакций по-разному оценивается исследователями, однако во многих случаях оказывается сильно преувеличенной, в результате использование сывороток оказывается ограниченным из-за неверно оцениваемых рисков врачами (55).

Еще одна общая тенденция наблюдается в публикации данных клинических исследований методов терапии укусов, а именно: постепенное вытеснение нерандомизированных исследований рандомизированными, всё более частое сравнение с эффектом плацебо и увеличение размеров выборки. Интересно отметить при этом, что в крупных рандомизированных плацебо-контролируемых исследованиях иногда выявляется недостаточная эффективность сывороточной терапии в отношении основных клинических симптомов отравления, например боли при латродектизме (56).

Очевидный недостаток современных сывороток заключается в том, что они получаются иммунизацией цельным ядом, содержащим множество компонентов, помимо непосредственно опасных токсинов. В результате лишь небольшая доля антител сыворотки обладает искомым терапевтическим эффектом. Кроме того, из-за индивидуальных особенностей иммунизируемых животных могут наблюдаться различия между разными партиями лекарства. Наконец, сама процедура получения яда в необходимых для иммунизации количествах может представлять трудную задачу, особенно для пауков небольшого размера (48).

Указанные недостатки сывороток стимулируют развитие новых подходов к созданию противоядий. Один из подходов основан на том обстоятельстве, что из множества компонентов, входящих в состав яда, реально значимой токсичностью обладают, как правило, лишь некоторые. Количественно сравнивать токсичность компонентов яда можно, например, с применением параметра Toxicity Score, учитывающим среднюю летальную дозу ($ЛД_{50}$) и содержание токсина в яде (57), что было сделано для скорпионов рода *Centruroides* (Buthidae) (58). Тогда разумным кажется проводить иммунизацию лишь наиболее опасными (летальными) токсинами. Альтернативой иммунизации природными токсинами служит использование их синтетических аналогов или пептидных фрагментов. Например, с использованием SPOT-синтеза были картированы наиболее эффективные эпитопы токсичных компонентов яда бразильского желтого скорпиона *Tityus serrulatus* (Buthidae), и соответствующие пептиды были использованы для получения нейтрализующих антител (59).

Альтернативой сывороточной терапии служит использование моноклональных антител. Ввиду моноспецифичности их применение ограничено как раз случаями, когда медицинским значением характеризуются лишь немногие компоненты яда, или же сходство меж-

ду такими компонентами достаточно высоко для проявления антителами кросс-реактивности. Реалистичность такого подхода была продемонстрирована, например, на яде сахарского скорпиона *Androctonus australis* (Buthidae): с помощью гибридом были получены моноклональные антитела к токсинам Aah II и Aah I и III, являющимся его основными действующими компонентами и относящимся к двум иммунологическим группам (все три — α-токсины, активаторы Na_v). Введение таких антител опытным животным нейтрализовало десятки $ЛД_{50}$ яда, а их совместное применение увеличивало эффективность противоядия (60, 61). Следующим шагом оптимизации является получение рекомбинантных антител, уже без использования гибридом. Для тех же Aah I и II в *Escherichia coli* были получены рекомбинантные одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv) моноклональных антител, упомянутых выше, показана их эффективность в купировании отравления соответствующими токсинами (62, 63). Технология направленной эволюции с применением фагового дисплея была использована для увеличения аффинности фрагмента моноклонального антитела в отношении токсина Cn2 из яда мексиканского скорпиона *Centruroides noxius*, являющегося его главным действующим началом (β-токсин, активатор Na_v). Полученный в целях увеличения авидности димерный конструкт этого оптимизированного фрагмента оказался высокоэффективен для нейтрализации действия токсина (64). Наконец, против тех же Aah I и II были получены «нанотела» (вариабельные фрагменты антител верблюдовых, состоящих только из тяжелых цепей), а биспецифичный димерный конструкт на их основе оказался эффективным для нейтрализации пяти $ЛД_{50}$ цельного яда (65, 66).

Следующим важным этапом оптимизации терапевтических антител является их «гуманизация», т.е. придание им свойств собственных антител человека в целях избегания побочных эффектов, вызванных реакцией на чужеродный белок. Например, были получены химерные антитела против упомянутого токсина Cn2 с константными областями иммуноглобулинов человека (67). Современные возможности получения рекомбинантных фрагментов антител человека и их оптимизации с помощью фагового дисплея были использованы, например, для создания scFv, нейтрализующих действие токсина Cn2, а также его гомологов из яда родственных *C. noxius* скорпионов (58, 68, 69); был также получен димерный конструкт (70). А в работе с нашим участием впервые были представлены моноклональные антитела человека против α-LTX (71).

В историческом аспекте интересным явлением представляется митридатизм (от имени понтийского правителя, по свидетельствам практиковавшим данный подход) — профилактика отравления многократным введением в свой организм сублетальных увеличивающихся доз (72). Устойчивость к яду в случае белковых токсинов развивается вследствие иммунного ответа так же, как происходит при получении сывороток. Митридатизм не рекомендуется

медицинским сообществом, поскольку сопряжен с рисками заражения крови, анафилактического шока и летального исхода. Особенно опасно его распространение среди натуралистов-любителей, хоть в некоторых случаях и приводит к известности, в том числе в научных кругах (73).

Таким образом, анализ современного состояния разработки противоядий от укусов паукообразных выявляет две главные тенденции: (1) представление о сывороточной терапии как центральном подходе при отравлении и (2) развитие подходов к получению рекомбинантных фрагментов антител, нейтрализующих летальные токсины, как главной альтернативы (74).

1.2.2. Природная устойчивость к яду

Отдельного упоминания заслуживают случаи устойчивости к яду паукообразных, обнаруженной у различных видов животных. Дело в том, что новые подходы к созданию противоядий могут быть заимствованы у самой природы. Стоит отметить при этом, что большая часть исследований природной устойчивости посвящена яду змей; кроме того, достаточно активно исследовался феномен устойчивости подвязочных змей к тетродотоксину из тритонов, на которых те охотятся (75), а также Колумбийских лягушек к содержащимся в их коже батрахотоксину (76) и эпибатидину (77). Что касается паукообразных, то хорошо известна дифференциальная чувствительность различных организмов к их яду. К примеру, если морские свинки и кролики чувствительны к яду пауков-отшельников как люди, то мыши и крысы оказываются сравнительно устойчивыми и не развивают кожных язв (30). Причины различий чувствительности изучены плохо, однако в большинстве случаев считают, что дело в различиях структуры рецепторов, служащих мишенями токсинов из яда. Наконец, известны специальные случаи устойчивости к яду скорпионов.

Так, хорошо известно, что сами скорпионы оказываются устойчивы к действию их яда (78). Данный феномен исследовался на примере китайского скорпиона *Mesobuthus martensii*. При сравнении с чувствительными видами членистоногих оказалось, что в последовательности потенциал-чувствительных K^+ каналов (K_v) и Na_v этого скорпиона содержатся аминокислотные замены, обуславливающие невосприимчивость каналов к соответствующим токсинам (79, 80).

Пример совсем иного порядка — кузнечиковые хомячки, охотящиеся на скорпионов рода *Centruroides*. В прямых экспериментах было показано, что эти животные устойчивы к действию яда *C. sculpturatus* даже при множественных укусах (81, 82). Кроме того, они устойчивы к многократным летальным дозам для домашних мышей Cn2, основного токсина из яда *C. noxius* (данные предоставлены Э. Роу, Университет Оклахомы, США). Молекулярная

природа устойчивости здесь, по-видимому, так же кроется в изменении структуры рецепторов токсинов (прежде всего Na_v, являющихся мишенью Cn2). Вдобавок к устойчивости к действию летальных токсинов кузнечиковые хомячки не развивают обычной болевой реакции на укус скорпионов. Оказалось, что яд способен активировать $Na_v1.7$, характерные для чувствительных нейронов, так же как у других животных. Однако при этом наблюдался еще и блок $Na_v1.8$, других каналов чувствительных нейронов, в результате чего проведение болевых сигналов останавливалось (82). Интересно при этом, что Cn2 связывается с каналом не в том же месте, где полагается β-токсинам [потенциал-чувствительный домен (ПЧД) II и петли порового домена (ПД) из повтора III, см. ниже раздел «β-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы»], а взаимодействует с петлей ПД из повтора IV и, по-видимому, ПЧД I (данные предоставлены Э. Роу).

1.3. Молекулярный состав яда паукообразных

Не будет преувеличением сказать, что о составе и механизме действия яда ложноскорпионов ничего не известно: ему посвящены лишь две публикации (на август 2019 г.). В одной утверждается, что яд *Paratemnus elongatus* (семейство Atemnidae) дифференциально влияет на обратный захват глутамата и γ-аминомасляной кислоты (ГАМК) в синаптосомах крыс (83). В другой представлен анализ результатов секвенирования транскриптома клешней педипальп *Synsphyronus apimelus* (семейство Garypidae), обнаружены последовательности, проявляющие сходство с известными токсинами животных, например фосфолипазами, пептидами с мотивом «цистинового узла» (англ. inhibitor cystine knot, ICK, см. подробней ниже) или укладкой Кунитца (84).

Немногим лучше ситуация с ядом паралитических клещей: в настоящее время с высокой степенью достоверности можно говорить лишь об одном небольшом семействе токсинов из слюны клещей, проявляющих паралитический эффект. Это холоциклотоксины из *I. holocyclus* [50–51 аминокислотный остаток (а.о.), 4 S-S, ICK], блокирующие нервно-мышечные синапсы за счет ингибирования выброса нейромедиатора (11, 34, 85). Молекулярная мишень этих токсинов неизвестна, возможно, это Ca_v пресинаптической мембраны. Попытки выделения паралитического токсина предпринимались для целого ряда других видов клещей, например *Argas walkerae, Hyalomma truncatum, Ornithodoros savignyi, Rhipicephalus evertsi evertsi*, однако не увенчались успехом (9, 86). Интересно также наблюдение, что среди транскриптов из слюнных желез *Ixodes scapularis* найден такой, что кодирует структурно сходный с нейротоксинами пауков пептид ISTX-I (46 а.о., 3 S-S, предположительно ICK). Этот пептид был получен гетерологически в *E. coli*, и оказалось, что он селективно блокирует потенциал-чувствительные Na^+ каналы $Na_v1.7$, не оказывая значимого действия на другие изоформы Na_v (87). Значение ISTX-I для биологии клещей дискуссионно, поскольку неизвестно даже, синтезируется ли соответствующий белковый продукт в слюнных железах, однако сам пептид может быть использован для создания на его основе селективных высокоаффинных блокаторов $Na_v1.7$, возможного подхода к получению новых анальгетиков.

Яд пауков и скорпионов изучен значительно лучше; как отмечалось выше, этому объекту посвящены несколько тысяч научных статей. Анализ информации, доступной нам сегодня, позволяет сделать несколько заключений общего характера. Прежде всего, как уже тоже отмечалось, хотя бы какие-то исследования проводились для яда лишь небольшой доли видового разнообразия (менее 0,5% пауков и 5% скорпионов), поэтому наши представления о его составе и функциях далеки от завершенности. Вместе с тем было бы неверным утверждать, что на основании уже установленных фактов нельзя выдвинуть каких-либо обобще-

ний сравнительно высокой достоверности: действительно, если счет вести по семействам, то доля изученных таксонов окажется значительно выше (30% пауков и 60% скорпионов), а накопленные данные свидетельствуют о том, что состав яда гораздо менее вариабелен внутри родов или семейств. Так что вполне уверенно можно сделать два, казалось бы, противоположных утверждения: (1) исследователей еще ждет достаточно сюрпризов в отношении разнообразия молекулярного состава яда паукообразных, и (2) в настоящее время мы неплохо понимаем характерные для яда пауков и скорпионов свойства и состав.

Природные яды принято объединять в группы в зависимости от выполняемой функции — это может быть защита от хищников, нападение на жертву, воздействие на физиологию хозяина (для паразитических видов). Большинство пауков и скорпионов используют яд в целях нападения, это его главная функция, соответственно в его составе мы ожидаем обнаружить компоненты, приводящие к быстрому обездвиживанию жертвы. Вместе с тем, нередки случаи, когда эти животные используют яд для защиты от более крупных агрессоров, и, по-видимому, в ходе эволюции в составе их яда значительное место заняли компоненты, позволяющие отпугнуть обидчика, например вызвав сильную болевую реакцию. По характеру действия обычно выделяют две большие группы ядов: нейротоксические и цитолитические (некротические), хотя соответствующие симптомы могут проявляться одновременно и не исчерпывают всех возможных эффектов от введения яда.

По-видимому, паукообразные научились экономно расходовать яд. Считается, что это дорогое удовольствие, расходы энергии на его производство («метаболические затраты», англ. metabolic costs) весьма значительны (88-91), хотя работы по оценке таких расходов редки, а их методология и выводы спорны. К примеру, некоторые исследования показывают, что пауки рассчитывают дозировку в зависимости от размеров жертвы и ее устойчивости к яду, а если их запасы недостаточны, то яд не используется (88, 92).

Яды паукообразных представляют собой весьма сложные смеси. Общая концентрация растворенных компонентов составляет около 200 мг/мл; pH обычно слабокислый, близок к нейтральному (93, 94). Традиционно выделяют три основные группы соединений, обнаруживаемых в яде: низкомолекулярные соединения разнообразного строения (от неорганических солей до сложно устроенных ацилполиаминов или модифицированных олигосахаридов), пептиды и белки. При этом в состав яда часто входят также слизеобразующие компоненты, представляющие собой полисахариды или муциноподобные гликопротеины. В последнее время появляются данные о симбиотических бактериях, населяющих ядовитые железы паукообразных (95, 96), однако рассуждать об их роли преждевременно.

Химическая природа основных активных компонентов яда может быть различной, при этом можно выделить две тенденции (таблица 2): (1) для скорпионов и большинства

изученных пауков наиболее характерным является использование пептидных нейротоксинов (15, 97); (2) в других случаях предпочтение всё равно обычно отдается какой-то одной группе соединений. Этими исключениями являются, в частности: (а) пауки-кругопряды (семейство Araneidae), в яде которых главное место занимают низкомолекулярные соединения ацилполиамины (98); (б) пауки-отшельники из рода *Loxosceles,* для их яда характерно преобладание фосфолипаз (30); (в) пауки-вдовы из рода *Latrodectus,* в их яде основную роль играют крупные белковые нейротоксины (28); (г) исследованные нами пауки-«муравьеды» *Lachesana tarabaevi* (семейство Zodariidae), для которых также характерны пептиды, однако проявляющие главным образом цитолитическую активность (99). Наконец, встречаются исключения и из этого правила; известно, что в яде некоторых пауков высоки содержание и функциональная значимость как низкомолекулярных, так и пептидных нейротоксинов: таковы американские воронковые пауки (семейство Agelenidae) (100). А в яде тарантулов и их родственников (пауков-волков, семейство Lycosidae) всегда обнаруживают цитолитики, хотя, по всей видимости, главную роль здесь всё же играют пептидные нейротоксины (101, 102). Интересно, что если все три варианта мажорных компонентов (белки, пептиды или низкомолекулярные вещества) встречаются в ядах с нейротоксическим действием, то для цитолитических (некротических) ядов характерны полипептиды как главный компонент. Во втором случае цитолитические свойства проявляют линейные (не содержащие дисульфидов) катионные пептиды или ферменты с фосфолипазной активностью. При этом у некоторых дисульфид-содержащих пептидов тоже обнаружены цитолитические свойства.

Короче говоря, мы имеем дело с биологическим объектом значительной сложности. Яды паукообразных демонстрируют определенные закономерности, в частности, их состава, но также высокий уровень вариабельности.

Таблица 2. Основные компоненты яда паукообразных.

Тип основного компонента яда		Пример
Низкомолекулярные вещества	Ацилполиамины	Семейство Araneidae, пауки-кругопряды, см. раздел «Ацилполиамины»
Пептиды	Цитолитики	Семейство Zodariidae, пауки-муравьеды, см. разделы «Цитолитические и антимикробные пептиды» и «Цитоинсектотоксины»
	Нейротоксины	Большинство изученных пауков и скорпионов, см. раздел «Разнообразие дисульфид-содержащих пептидов из яда паукообразных» и следующие за ним
Белки	Ферменты	Семейство Sicariidae, в том числе пауки-отшельники, см. раздел «Некротоксины из яда *Loxosceles*»
	Нейротоксины	Семейство Theridiidae, в том числе пауки-вдовы, см. раздел «Латротоксины»

Наиболее разнообразными компонентами яда паукообразных обычно выступают пептиды, в одном яде можно обнаружить несколько десятков, сотен, даже свыше тысячи различных пептидов. Это разнообразие вначале исследовали доступными методами хроматографии (103-106), а с развитием современной протеомики (и пептидомики) традиционным является использование методов масс-спектрометрии (МС) (107-117). Ситуация несколько сходна с характеристикой протеома или пептидома других объектов, например плазмы крови (118): чем более чувствительный метод анализа используется, тем больше обнаруживается компонентов. Обычная оценка — не более пары сотен пептидов, однако встречаются работы, где заявляется обнаружение тысячи и более компонентов. Важно понимать при этом, что, во-первых, многим «протеомным» работам в области токсинологии (и не только в ней) свойственно низкое качество анализа результатов МС и, как следствие, попросту ложная идентификация пептидов и искусственное завышение их числа. А во-вторых, компоненты с чрезвычайно низким содержанием вряд ли обладают какой-либо биологической функцией (их концентрация слишком мала для образования комплекса с мишенью), и их наличие в яде есть результат случайного протеолиза компонентов с высоким содержанием или попадания туда из клеток ядовитой железы и выводящих протоков (как естественным путем, так и в процессе пробоподготовки). Весьма популярный в области подход «одна масса — один пептид» очевидно является ущербным. В любом образце будут содержаться фрагменты и другие случайные производные основных компонентов; кроме того, при таком подходе не учитывается содержание пептидов, а обнаружение мельчайшей примеси фрагмента едва ли является биологически значимым. Дело усугубляется слабой профессиональной подготовкой исследователей ядов в МС, получаемые спектры часто вообще не проходят элементарных процедур проверки качества. В результате литература, к сожалению, полна артефактами и недостоверными данными. К примеру, десятки статей исследователей из Мексики содержат попросту списки значений идентифицированных масс в образцах фракций яда скорпионов. С учетом низкой точности измерений (ошибка может составлять 10 Да при массе ≈ 5 кДа) и соображений, высказанных выше, ценность этих статей невысока.

В разных работах железистому эпителию ядовитых желез пауков или скорпионов приписывают как мерокриновый (без разрушения клеток), так и апокриновый (с частичным разрушением секреторных клеток) и даже голокриновый (с полным разрушением клеток) тип секреции. Современные работы описывают апо- или голокриновый тип (119-122), так что, по всей видимости, секреция происходит именно с разрушением клеток. Вероятно, этим же обстоятельством объясняется недавнее обнаружение в яде паука внеклеточных везикул (123). По этой причине в составе яда неизбежно присутствуют обычные внутриклеточные компоненты, о специальных функциях которых в яде говорить сложно. Эти биологические

особенности важно помнить при анализе результатов протеомных работ, когда приводятся длиннющие списки обнаруженных в яде белков: многие, если не большинство из них — это попросту обычные внутриклеточные компоненты.

Другой распространенный способ оценки числа пептидных компонентов яда — секвенирование транскриптома ядовитых желез и подсчет кодирующих токсины последовательностей мРНК. Традиционный метод секвенирования по Сэнгеру (110, 124) используется и сегодня (125, 126), однако вытесняется современными методами высокопроизводительного секвенирования нового поколения (84, 127-129). Аналогично протеомным подходам, чем более масштабный анализ проводится (чем больше секвенируется последовательностей библиотеки / чем более велико число прочтений), тем больше обнаруживается уникальных мРНК. Консервативные оценки, как и в случае белковых методов, лежат в пределах пары сотен, однако имеются публикации, указывающие на бóльшие числа. Здесь сложилась аналогичная протеомике ситуация: статьи, посвященные транскриптому ядовитых желез, грешат низким качеством анализа полученных данных, за уникальные мРНК зачастую выдаются последовательности, полученные вследствие ошибок пробоподготовки, амплификации или секвенирования. Известны случаи, когда подобные ошибки приводили к построению интересных гипотез (130), впоследствии опровергнутых (131), однако с тех пор широко распространившихся в литературе. Одно время было ощущение своеобразной гонки, в которой особенно отличились австралийские, китайские и французские исследователи: «кто больше?» — сообщит обнаруженных компонентов яда паука (110, 111, 127, 132). Стоит признать, что такие статьи-рекордсмены требуют большой осторожности в интерпретации, а говоря по-хорошему — повторения экспериментов с тщательными процедурами контроля качества и переоценки.

Так или иначе в настоящее время охарактеризовано около 2,5 тысяч полипептидных соединений из яда паукообразных (≈1500 из пауков и ≈1000 из скорпионов): имеется в виду характеристика именно на уровне белка, а если учитывать данные секвенирования транскриптомов, то это число существенно больше (свыше 10 тысяч). Общее же природное разнообразие пептидов из яда скорпионов, по-видимому, составляет около 200 тысяч (100 пептидов в одном яде × 2000 видов), для пауков это число может быть порядка 4,5 миллионов (аналогичный расчет для 45 тысяч видов). Т.е. пока охарактеризовано только около 0,5% общего разнообразия пептидных компонентов яда скорпионов и исчезающе малые 0,03% разнообразия пептидов из яда пауков. Здесь важно оговориться однако, что, как и в случае наших знаний о яде паукообразных вообще, подобные оценки не должны вводить в заблуждение: некоторые надежные обобщения касаемо структуры и функции нейротоксинов паукообразных вполне возможны и на данном этапе.

Структура пептидных нейротоксинов — главного компонента яда паукообразных — может быть различной, однако подавляющее большинство пептидов из яда пауков или скорпионов формируют один тип укладки (фолд) (133). Для пауков это цистиновый узел (ICK), в структуре таких пептидов (их также называют «ноттинами», англ. knottin) выделяют три консервативные дисульфидные связи, одна из которых пронизывает кольцо, образованное двумя другими и атомами соединяющей их основной цепи (134, 135). Для скорпионов характерна укладка «цистеин-стабилизированных α-спирали/β-слоя» (CSα/β), в которой α-спираль фиксируется на одном из β-тяжей двумя консервативными дисульфидными связями (136, 137). Подробнее о пространственной организации нейротоксинов см. ниже (раздел «Пространственная структура дисульфид-содержащих пептидов»). Подобная ситуация наблюдается и для других ядовитых животных: к примеру, змеи, выражаясь образно, «выбрали» другой тип укладки, так называемую «трехпетельную структуру» (в англоязычной литературе распространен другой термин, «трехпальцевые» токсины, three-finger toxins, 3FTx) (138). В этом смысле несколько особняком стоят улитки конусы: в их яде обнаруживаются пептиды (конопептиды) разнообразных укладок (139). Если описывать разнообразие фолдов нейротоксинов животных точнее, то окажется, что пауки и скорпионы занимают один полюс (чрезвычайное преобладание токсинов с укладкой одного типа), а конусы — противоположный (большая вариабельность), змеи в этом отношении ближе к паукообразным (140), а морские анемоны — к конусам (141).

Общепризнанным является представление о яде паукообразных — и природных ядах вообще — как о комбинаторных библиотеках; см. развернутый комментарий ниже (в разделе «Яд как комбинаторная библиотека токсинов») (142-144). В узком смысле имеется в виду сходство с искусственными комбинаторными библиотеками, синтезируемыми химиками: токсины объединяются в группы родственных соединений, для каждой характерно наличие общего скелета и разнообразных модификаций в индивидуальных компонентах. Так, например, общий скелет ацилполиаминов представлен полиаминной цепочкой, модифицированной остатком ароматической карбоновой кислоты, при этом полиамин может состоять из различных звеньев, ароматический остаток может быть разным, соединения могут дополнительно модифицироваться а.о., метильными группами и т.д. (145) (см. подробнее в разделе «Ацилполиамины»). А общий скелет большинства нейротоксинов токсинов пауков сформирован консервативными остатками цистеина, образующими мотив цистинового узла, модификации же представлены вариабельными а.о. (см. пример в разделе «Яд как комбинаторная библиотека токсинов») (110, 124, 146). В более широком смысле подразумевают, что имеет место некое более точное подобие искусственных комбинаторных библиотек, а именно, особый механизм, вносящий модификации и сохраняющий общий вид скелета (например, мож-

но заметить сходство разнообразия токсинов с иммуноглобулинами высших позвоночных). При этом сам термин относят как к токсинам, синтезируемым одним видом животных, так и к некому семейству токсинов и даже к совокупности токсинов одного типа укладки вообще (143, 146). Важно оговориться, что такой механизм до сих пор является лишь гипотезой, а имеющиеся «комбинаторные библиотеки» токсинов, вероятно, лишь внешне напоминают искусственные, но не повторяют способ их формирования. Скорей всего мы имеем дело с крупными мультигенными семействами, дивергенция внутри которых привела к наблюдаемому эффекту комбинаторики (147). Похожая ситуация характерна и для других ядовитых животных — змей (148), анемон (149), конусов (150). Наиболее близки к гипотетическому комбинаторному механизму предположенные для конусов специальные полимеразы (как, например, ДНК-полимераза V), характеризующиеся повышенной частотой ошибок и специально привлекаемые к репликации локусов с генами токсинов (151).

Другой важный вопрос касается вариабельности состава яда. Дело в том, что он не является неизменным; напротив, было показано, что состав яда паукообразных варьирует в зависимости от целого ряда параметров: возраста и пола животного, сезона, ареала и диеты и может различаться даже у одной и той же особи (152-155). Сравнительный анализ индивидуальных заборов яда показывает, что в состав яда входят несколько типов компонентов: «конститутивные», присутствующие всегда, и «вариабельные». При этом содержание как конститутивных, так и вариабельных компонентов может существенно варьировать. Причины такой вариации в общем случае не установлены, равно как и зависимость присутствия определенных компонентов от перечисленных выше параметров. Исключение составляет яд австралийских воронковых пауков родов *Atrax* и *Hadronyche*: убедительно показано, что яд мужских особей гораздо более токсичен для позвоночных из-за существенно большего содержания δ-атракотоксинов (δ-АСТХ); а поскольку мужские особи покидают свои норки в поисках женских и в это время мало питаются, выдвинута гипотеза о защитной роли δ-АСТХ, функция которых в таком случае состоит в провоцировании болевых сигналов у агрессора за счет активации Na^+ каналов (подробнее об этих токсинах см. раздел «Ингибиторы инактивации Na_v из яда пауков») (156).

1.3.1. Номенклатура токсинов

Отдельный вопрос касается номенклатуры токсинов. Разумеется, велико число токсинов, известных под своими традиционными названиями. В этом случае какой-то системы нет, а мы наблюдаем полет фантазии исследователей. Например, самый известный блокатор K^+ каналов был назван харибдотоксином, из яда того же скорпиона получен и сциллатоксин. А самый известный ингибитор активации K^+ каналов ханатоксин получил свое название в

честь дочери открывателя. Надо сказать, что при всех попытках предложить единую систематику ученые продолжают давать вновь открываемым токсинам несистематические названия, ведь придумывать имена так здорово.

Ввиду огромного и всё возрастающего числа изученных токсинов очевидна необходимость упорядочивания номенклатуры. Аналогичной ИЮПАК организации, которая вырабатывает единую для токсинов номенклатуру и признается большинством токсинологов, не существует — нет и такой номенклатуры. Эту функцию могло бы взять на себя Международное общество по токсинологии (International Society on Toxinology, IST). И такая попытка предпринималась, однако ввиду ряда причин (нарочитая самоуверенность предлагавших общую систему, нежелание авторов расставаться с любимыми названиями) не удалась. Другой кандидат — UniProt, однако эта организация не хочет брать вожжи. В результате мы имеем некоторый ансамбль предложенных номенклатур, с разным охватом используемых специалистами.

Неоспорима тенденция использования в названиях токсинов греческих символов и имен животных-продуцентов. Греческая буква перед названием токсина, как правило (но не всегда!), указывает на основную мишень его действия. Отметим наиболее часто встречающиеся символы в названиях токсинов: α — мишенью служат хемовозбудимые ионотропные рецепторы постсинаптической мембраны (nAChR и GluR), κ — K^+ каналы, μ — Na^+ каналы (в новейшей номенклатуре символ μ используется только для поровых блокаторов, для модуляторов этих каналов используется символ δ), ω — Ca^{2+} каналы.

Хорошо проработанная и принятая всеми специалистами в области номенклатура создана для блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов (см. подробней ниже в разделе «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов») (157). В качестве критериев для разделения на семейства она использует структурные (тип укладки) и функциональные (какие каналы служат мишенью) свойства токсинов. А для разделения на подсемейства используется критерий сходства последовательностей. Для пептидных токсинов пауков С.А. Козловым предложен принцип классификации по типу мотивов первичной структуры (см. ниже раздел «Разнообразие дисульфид-содержащих пептидов из яда паукообразных»), который базируется на анализе аминокислотных последовательностей с использованием специального алгоритма и не учитывает фармакологические свойства молекул (158). Наконец, Г. Кингом (Университет Квинсленда, Австралия) и коллегами предложенная «глобальная» номенклатура животных токсинов, в которой совмещены показатели их фармакологических свойств и данные о систематическом положении животных-продуцентов (159). Это та самая «не прошедшая в IST» всеобщая номенклатура. В настоящее время она рекомендована UniProt к использованию для токсинов пауков (распределение по семействам при этом проводится в соответствии с реко-

мендациями швейцарских ученых, см. ниже), в других областях не применяется. В ней каждому токсину приписывается название типа:

$\kappa_{1.3}$-stichotoxin-Sh1a,

где κ — префикс, обозначающий группу рецепторов; 1.3 — нижний индекс в префиксе, обозначающий конкретную мишень (изоформу канала); “stichotoxin” — название, включающее часть латинского названия семейства, к которому относится вид ядовитого животного, производящего токсин; Sh — первые буквы латинского названия рода и вида ядовитого животного; 1 — число для обозначения разных токсинов с похожей фармакологией; a — буква для обозначения паралогов (изоформ) токсина.

Очевидный недостаток этой системы — это привязка к латинским названиям животных. Они часто меняются, систематика животных сама по себе сложный мир, и держать номенклатуру токсинов заложницей не зависящих от сообщества токсинологов факторов не лучший выбор. Результат мы наблюдаем как раз в случае токсинов, исследованных авторами этой системы: уследить за постоянными переименованиями сложно (см. об этом ниже в соответствующих разделах). Другой важный недостаток — отсутствие зависимости наименования токсина от его структурных характеристик. Родственные по структуре токсины, производимые животными из разных семейств, а тем более действующие на разные мишени, будут иметь сильно различающиеся названия. Наконец, практически полностью игнорируется сходство аминокислотных последовательностей токсинов, а вопрос объединения в семейства не решается. В итоге порядковые номера назначаются «как придется», и логика номенклатуры полностью утрачивается.

Итак, в настоящее время нет единой общепринятой номенклатуры токсинов паукообразных. Один и тот же токсин может иметь много имен — в зависимости от используемых систем и договоренностей. Например, тот же харибдотоксин в номенклатуре блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов будет обозначен α-KTx 1.1, а в номенклатуре Кинга — λ-Buthitoxin-Lqh1a. Для избежания путаницы мы будем обозначать регистрационные номера базы данных UniProt (UniProt IDs), а также использовать общепринятые традиционные названия, распространенные в литературе, и наиболее общепринятые систематические обозначения (например, для блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов).

Ниже мы подробнее остановимся на различных группах соединений, обнаруженных в составе яда пауков и скорпионов.

1.4. Низкомолекулярные компоненты яда паукообразных

С точки зрения химического строения это самая гетерогенная группа соединений, обнаруживаемых в составе яда; в настоящее время в яде различных паукообразных обнаружены: неорганические соли, органические кислоты, амины и полиамины, ацилполиамины, аминокислоты, моно- и олигосахариды, моно- и олигонуклеотиды, а также их разнообразные модификации. Зачастую функция обнаруженных соединений не известна, не исследована и не обсуждается, однако в некоторых случаях именно низкомолекулярные компоненты служат главным оружием ядовитых животных. Близкий к исчерпывающему анализ предшествовавшей литературы, посвященной компонентам яда пауков, был выполнен Л. Кун-Нентвиг и В. Нентвигом в 2011 г. (15), а в 2020 г. заработала специализированная база данных venoMS (https://www.venoms.ch/) (160); литература, посвященная низкомолекулярным компонентам яда скорпионов, значительно беднее.

Исследовался солевой состав, в частности, яда североамериканского паука *Cupiennius salei* (Trechaleidae). Оказалось, что в нем сравнительно высока концентрация ионов калия (≈210 мМ) и, напротив, концентрация ионов натрия низкая (≈10 мМ) (161, 162); обратная ситуация наблюдается в гемолимфе пауков: ≈180 мМ Na^+ и ≈10 мМ K^+ (163) — и большинства насекомых (164). По всей видимости, высокая концентрация K^+ в яде вызывает так называемую «калиевую деполяризацию», которая может приводить к параличу. Кроме того, при деполяризации активируются мишени пептидных токсинов яда — ионные каналы. По-видимому, это обстоятельство лежит в основе обнаруженной синергии токсического действия пептидных компонентов яда с солями калия, в частности, это было показано для паука *C. salei* (смертность плодовых мушек *Drosophila melanogaster* от инъекции пептидных нейротоксинов в дозе, близкой к $ЛД_{50}$, возрастала на ≈20% при совместном введении с раствором KCl) (165) и южноафриканского скорпиона *Parabuthus transvaalicus* (Buthidae) (166).

В яде членистоногих находят соли кислот; традиционно отмечаются высокие концентрации цитрата (до 8% сухого веса, т.е. до ≈100 мМ, если считать содержание растворенных компонентов яда ≈20%) (167), соли других кислот либо реже присутствуют, либо хуже исследованы. Показано, что присутствие цитрата в яде пчел снижает активность фосфолипазы A_2 (PLA_2), которая зависит от ионов Ca^{2+}; аналогичный эффект характерен для яда змей (168). Предполагается, что цитрат служит ингибитором активности токсинов-ферментов, для функции которых необходимы ионы двухвалентных металлов, за счет хелатирования последних (169). При введении яда в тело мишени происходит его разбавление, и ингибирующий эффект хелатора снижается, в том числе из-за присутствия Ca^{2+} в физиологических жидкостях. Для яда паукообразных такая связь в настоящее время является лишь предположением.

В яде паукообразных находят биогенные амины, например серотонин, гистамин, норадреналин, и аминокислоты, такие как глутамат, таурин или ГАМК, а также ацетилхолин, иногда с высоким содержанием (161, 170-180). Исследования, показывающие наличие подобных соединений в природных ядах, были особенно распространены до 1990-х гг., позже интерес к этим компонентам со стороны научного сообщества снизился, а в настоящее время многие специалисты ожидают «ренессанс». Стоит иметь в виду при этом, что многие, если не все, исследования прежних времен нуждаются в тщательной проверке с привлечением современного уровня техники. К примеру, поучительна история изучения низкомолекулярных компонентов яда южноамериканского социального паука *Parawixia bistriata* (семейство Araneidae, пауки-кругопряды) бразильскими учеными под руководством В. Феррейра душ Сантуша (W. Ferreira dos Santos). Дело в том, что долгое время ими публиковались статьи об эффектах фракции яда FrPbAII или Parawixin2 (Pwx2) и соответствующего индивидуального соединения как ингибитора захвата ГАМК и глицина (181-183), была предложена необычная структура 2-амино-5-уреидопентанамида (184). В итоге этим соединением оказался аргинин, который не проявляет заявленных свойств, равно как и синтетически полученное заявленное соединение (179). А фракция, названная вначале PbTx1.2.3 (185), а затем Parawixin1 (Pwx1) (186), и соответствующий ей мажорный компонент, усиливавшие захват глутамата транспортером EAAT2 и отмеченные хвалебной редакторской заметкой журнала Molecular Pharmacology (187), — вообще не были обнаружены при независимом анализе (179).

Так или иначе, перечисленным в предыдущем абзаце соединениям обычно приписывают нейротропное действие на насекомых, поскольку для многих из них показана или предполагается функция нейромедиаторов или нейромодуляторов в нервной системе насекомых (15, 188). Например, глутамат служит возбуждающим нейромедиатором в нервно-мышечных синапсах насекомых; в яде пауков-кругопрядов он встречается в высокой концентрации (≈0,2–0,4 М у *Araneus gemma*) и вызывает быструю активацию GluR мышц при попадании яда в тело жертвы (189). Кроме того, важная роль этих веществ может заключаться в потенцировании других компонентов яда. К примеру, важнейшими токсинами яда кругопрядов являются ацилполиамины (см. раздел ниже), которые блокируют GluR, воздействуя на их открытое состояние — по-видимому, для их активации и нужен глутамат в составе яда. А для паука *C. salei* показана синергия действия гистамина и основного пептидного токсина CSTX-1 (161, 165).

В этом смысле яд паукообразных не является исключением. К примеру, в составе яда паразитоидной осы *Ampulex compressa* обнаружено высокое содержание ГАМК (≈10–30 мМ), а также β-аланина и таурина (сопоставимые концентрации, потенцируют действие ГАМК). Убедительно продемонстрировано, что эти соединения используются для достижения крат-

ковременного паралича передних ног американского таракана *Periplaneta americana* при укусе осой в область проторакального ганглия — за счет активации $GABA_{A/C}$ рецепторов и подавления синаптической передачи между чувствительными и гигантскими интернейронами (190); во время паралича оса может беспрепятственно нанести следующий укус в область мозга.

Поскольку эти же соединения зачастую служат сигнальными соединениями у позвоночных, в некоторых случаях им приписывают соответствующую функцию. Так, гистамин может выполнять функции: (а) защитную — провоцировать болевую реакцию; (б) вспомогательную — способствовать распространению других компонентов яда за счет индукции местного отека и увеличения проницаемости сосудов. Он найден в яде *Loxosceles intermedia* с высоким содержанием (≈150 мМ), предполагают, что в яде пауков-отшельников его роль заключается в способствовании распространению некротоксинов (191).

Для некоторых соединений, даже найденных с высоким содержанием, не выяснено функциональное значение. Например, производное аргинина N,N'-бис(4-гуанидинобутил)оксаламид (Plt-I; PubChem CID: 3025845; рисунок 1, **2**) было идентифицировано как мажорный компонент яда североамериканского паука *Plectreurys tristis* (Plectreuridae); его функция не установлена: оно не показало активности при инъекции в дозе 150 мкг/г гусеницам табачного бражника *Manduca sexta* или взрослым комнатным мухам *Musca domestica* (192). А в яде скорпиона *Megacormus gertschi* (Euscorpiidae) одним из мажорных компонентов является производное тирозина и гистидина (рисунок 1, **3**) (193), которое не показало активности при инъекции сверчкам (к сожалению, методические подробности не приводятся, указана лишь доза 50 мкг на животное; надо полагать, использовали домовых сверчков, тогда доза составила ≈150 мкг/г).

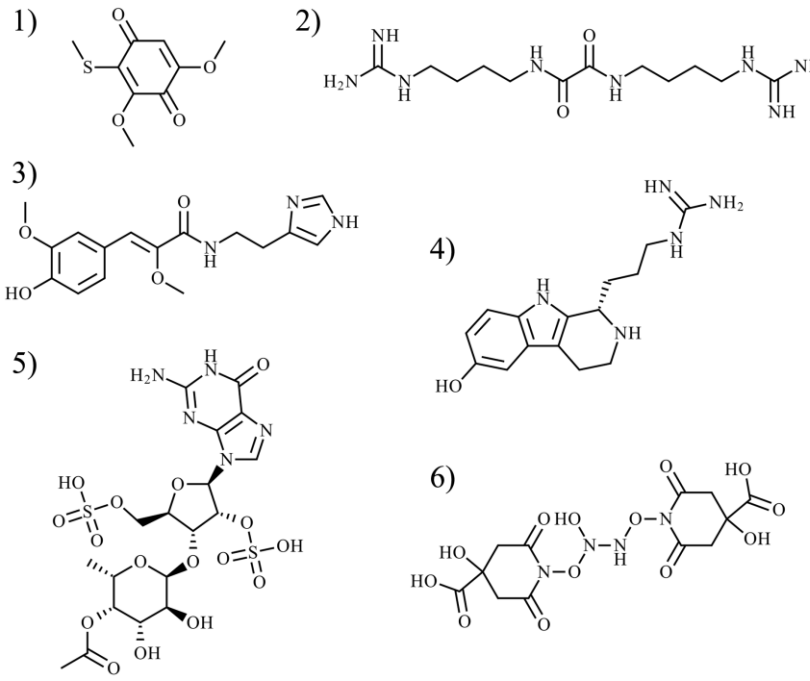
В яде паукообразных находят свободные азотистые основания, нуклеозиды, нуклеотиды, а также их разнообразные производные (179, 194-197). Предполагается, что те же нуклеозиды способствуют гипотензивному действию яда змей (198); аналогичная функция этих соединений в яде паукообразных возможна — в случае отравления млекопитающих. Особый интерес у исследователей вызвали сульфатированные нуклеозиды, обнаруженные в яде пауков: так, в яде американского воронкового паука *Hololena curta* (Agelenidae) было найдено соединение HF-7 (135438001; рисунок 1, **5**), которое обладало ингибирующим эффектом в отношении каинатных рецепторов (199). Похоже, что эти соединения распространены в ядах, они могут являться мажорными компонентами, однако их функция остается невыясненной (177).

Окраска яда мексиканского скорпиона *Diplocentrus melici* (Diplocentridae) после выдерживания на воздухе с белого меняется на красный, что обусловлено появлением в его со-

ставе серосодержащего бензохинона (147470691; рисунок 1, **1**) (200). Интересно, что это и родственное соединение с синей окраской, выделенное из того же яда, обладают антимикробной активностью; биологическая функция этих соединений или их предшественников остается загадкой.

Сообщается, что в яде бразильского странствующего паука *Phoneutria nigriventer* (Ctenidae) обнаружен интересный аддукт лимонной кислоты нигривентрин, окси-гидразил-диоксопиперидин (123327714; рисунок 1, **6**). Отмечается, что при введении нигривентрина в дозе 100 нг/кг (i.v.) у крыс наблюдались судороги (201); молекулярный механизм действия этого токсина неизвестен.

Рисунок 1. Структурные формулы низкомолекулярных соединений, обнаруженных в яде паукообразных. Цифрами обозначены: 1, красный бензохинон из *D. melici*; 2, Plt-I из *P. tristis*; 3, производное тирозина и гистидина из *M. gertschi*; 4, PwTx-I из *P. bistriata*; 5, HF-7 из *H. curta*; 6, нигривентрин из *Ph. nigriventer*. Ионизируемые группы показаны в незаряженном состоянии. Подробности в тексте.



Интересно также обнаружение в яде *P. bistriata* гидрокситрипаргина (PwTx-I; 92032775; рисунок 1, **4**) и его аналога PwTx-II (в базе данных PubChem указан как CID: 91606689, приводится неверная формула), содержащих индольную и гуанидиновую группы, по-видимому, являющих производными триптофана и аргинина (202, 203). Эти соединения обладают сильным паралитическим и летальным эффектом в отношении пчел при инъекции в переднеспинку: $ЛД_{50} \approx 8$ и 12 нг/г для PwTx-I и II, соответственно (в статье о PwTx-II, по всей видимости, ошибка на три порядка, поскольку дозы из литературы указаны с той же

ошибкой). Похожее соединение было найдено при анализе химического состава ловчих сетей американского кругопряда *Trichonephila clavipes* (Araneidae) (204). А трипаргин был ранее обнаружен в коже африканской лягушки *Kassina senegalensis* (205), так что подобные соединения не уникальны для пауков. О механизме токсичности PwTx-I и II известно мало; показано, что в микромолярных концентрациях PwTx-I угнетает активность рекомбинантных моноаминоксидаз человека, при этом более активным оказался (R)-энантиомер, хотя природным, по-видимому, является (S)-энантиомер; аналогичным образом (R)-энантиомер более активен (почти на порядок) в тесте на пчелах (206). Стоит отметить, что в исследовании независимой группой PwTx-I и II в яде *P. bistriata* обнаружены не были (179).

В яде Вьетнамского лесного скорпиона *Heterometrus laoticus* (Scorpionidae) были обнаружены дипептиды LW и IW, которые в высокой концентрации (0,1–1 мМ) показали антикоагулянтные свойства в тестах на мышах (207); однако указанные соединения являются минорными компонентами яда, и их концентрация при укусе на несколько порядков ниже.

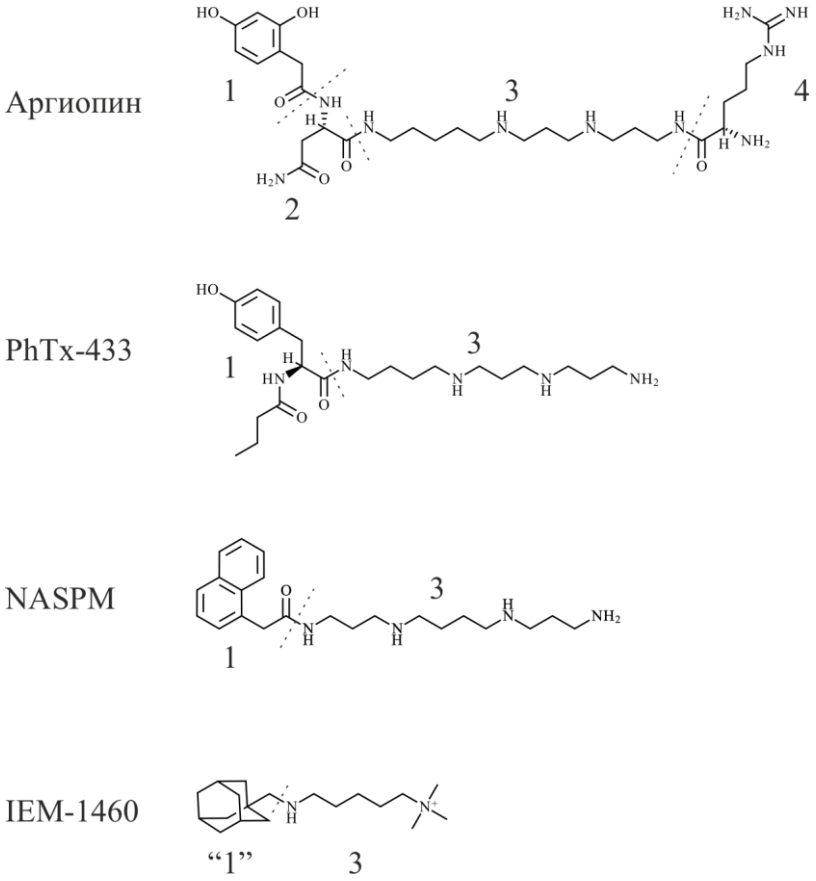
1.4.1. Ацилполиамины

Особое место среди низкомолекулярных компонентов яда многих пауков занимают ацилполиамины (или просто «полиамины») — как следует из названия, это соединения, состоящие из ацильной группы, присоединенной к полиамину. Впервые структура ацилполиамина — аргиопина (известен также под названием аргиотоксин-636, ArgTx-636; PubChem CID: 122294; рисунок 2) из яда аргиопы дольчатой *Argiope lobata* (Araneidae) — была расшифрована в 1986 г. под руководством Е.В. Гришина (208). С тех пор из яда различных представителей кругопрядов, в частности азиатских пауков «золотопрядов» *Nephila pilipes* (NSTX-3; 184814) (209) и *Trichonephila clavata* (паук «дзёро»; JSTX-3; 119582) (210), а также агеленовых (семейство Agelenidae), в частности *Agelenopsis aperta* (α-агатоксины) (211), были охарактеризованы свыше ста сходных по строению веществ. В их структуре можно выделить несколько составных блоков: (1) ацильная группа («головка»), (2) промежуточный а.о., (3) полиаминная цепочка, состоящая из диаминных звеньев («хвост»), (4) терминальный а.о. (рисунок 2).

Несмотря на общий план строения, наблюдается большое разнообразие, причем не только межвидовое, но и внутривидовое: в составе одного яда могут присутствовать десятки различных ацилполиаминов (179, 212, 213), в данном случае мы имеем дело с природной комбинаторной библиотекой химических соединений. Каждый из составных блоков может варьировать, а некоторые — даже отсутствовать. К примеру, в качестве ацильной группы может выступать остаток 2,4-диоксифенилуксусной кислоты или индолилуксусной кислоты; в качестве промежуточного а.о. — аспарагин или N^{ε}-метиллизин (может отсутствовать);

диаминами могут выступать кадаверин, путресцин и 1,3-диаминопропан, их число и порядок могут быть различными; терминальным а.о. — аргинин (может отсутствовать; по данным Г. Кинга здесь может присутствовать ароматическая группировка, а такие ацилполиамины можно назвать «двухголовыми»). В структуру ацилполиаминов могут дополнительно вноситься другие модификации, например метилирование и гидроксилирование. В результате среди ацилполиаминов находят соединения с молекулярной массой (Мм) ~350–1000 Да. Наконец, в яде пауков обнаружены разнообразные полиамины (без ацильной группировки), по-видимому, промежуточные соединения биосинтеза зрелых ацилированных токсинов (179, 214). Интересно, что похожие по строению соединения были обнаружены в яде ос, в частности пчелиного волка *Philanthus triangulum* (филантотоксин-433, PhTx-433; 115201; рисунок 2) (215); вероятно, это пример конвергентной эволюции токсинов.

Рисунок 2. Структурные формулы природных ацилполиаминов и их искусственных аналогов. Цифрами обозначены фрагменты, разделенные на рисунке пунктирными линями: 1, ацильная группа (“1”, алкильная группа); 2, промежуточный а.о.; 3, цепочка из диаминных звеньев; 4, терминальный а.о. Ионизируемые группы показаны в незаряженном состоянии.



В настоящее время общепризнанной является точка зрения, что природной мишенью ацилполиаминов служат постсинаптические GluR в нервно-мышечных синапсах насекомых (для этих животных характерна глутаматергическая передача между нейронами и миоцита-

ми). Ацилполиамины являются поровыми блокаторами этих ионных каналов, при этом для реализации их действия необходима первоначальная активация GluR (216, 217). В связи с этим важно отметить, что в яде кругопрядов обнаружен глутамат в высоких концентрациях (≈0,2–0,4 М; см. выше) (189), а в яде агеленовых пауков его место в функциональном смысле занимают пептидные активаторы Na^+ каналов (μ-агатоксины, см. ниже раздел «Инсектотоксины из яда воронковых пауков, потенцирующие Na_v»): они провоцируют возникновение потенциалов действия в мотонейронах, которые секретируют глутамат (100); таким образом, между различными компонентами яда наблюдается синергизм действия.

Интересно, что, помимо рецепторов насекомых, ацилполиамины эффективно блокируют GluR позвоночных (218) и в частности млекопитающих (219). Кроме того, они способны воздействовать на достаточно широкий круг мишеней, включая Ca^{2+}, K^+ и Na^+ каналы, TRP и другие ионотропные рецепторы, причем не во всех случаях они выступают поровыми блокаторами (220-224); в отношении GluR активность часто проявляется в наномолярных концентрациях, а для блокирования иных ионных каналов обычно необходимы более высокие концентрации. При этом содержание ацилполиаминов в яде может быть высоко: например, концентрация мажорного компонента яда *A. aperta* составляет ≈70 мМ (225). В этой связи интересно сообщение о высокой эффективности (и наномолярной аффинности) ацилполиамина из яда *P. bistriata* как аллостерического модулятора, потенцирующего активность глутаматных транспортеров EAAT1 и 2, характерных для глиальных клеток человека (179); отметим однако, что недавнее исследование опровергает эти данные (226).

Были проведены развернутые исследования структурно-функциональных отношений у ацилполиаминов, спроектированы и синтезированы их искусственные производные, обладающие высокой эффективностью и избирательностью действия в отношении различных нейрорецепторов (227, 228). Некоторые искусственные соединения, напоминающие по своему строению природные ацилполиамины и спроектированные по их подобию, например 1-триметиламмонио-5-(1-адамантан-метиламмонио)пентан (IEM-1460; 11957560) (229) и 1-нафтилацетилспермин (NASPM; 129695; рисунок 2) (230), стали традиционными молекулярными инструментами исследования структуры и функции GluR.

Среди GluR млекопитающих ацилполиамины лучше воздействуют на Ca^{2+}-проводящие рецепторы NMDA-типа и разновидности рецепторов AMPA-типа [от сокращения названий селективных агонистов этих рецепторов: англ. N-methyl-D-aspartate (N-метил-D-аспартат) и α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота)] (217). Во втором случае устойчивость к действию ацилполиаминов коррелирует как с кальциевой проводимостью, так и с посттранскрипционным редактированием мРНК (дезаминированием аденина в инозин), приводящим к замене

остатка глутамина на аргинин в поре канала (данный участок получил название Q/R сайта); при этом у взрослых организмов ≈95% рецепторов соответствуют редактированному варианту (с остатком аргинина и низкой проницаемостью для Ca^{2+}) (231-233). Исследование пространственной организации GluR млекопитающих, сайт-направленный мутагенез, сопряженный с тестированием активности природных ацилполиаминов и их искусственных аналогов на мутантных рецепторах, и применение методов молекулярного моделирования позволило предложить структурную модель комплекса рецепторов с токсином, соответствующую накопленным экспериментальным данным (234, 235). Предполагается, что токсин взаимодействует с селективным фильтром канала, расположенным с внутриклеточной стороны поры, куда он может проникнуть только в случае открытия внеклеточных ворот при активации рецептора. При этом «голова» токсина (ацильная группа) располагается во внутренней полости канала, а «хвост» (полиамин) непосредственно взаимодействует с селективным фильтром, препятствуя току ионов. Стоит отметить, что в данном случае важен положительный заряд полиаминной цепочки, он позволяет эффективно блокировать катион-селективные каналы, выстилка поры которых отличается повышенным отрицательным зарядом. Имеет место также некоторое сходство с внутриклеточными полиаминами (например, спермидином и спермином), которые блокируют GluR с внутриклеточной стороны (236).

Способность блокировать рецепторы глутамата, главного возбуждающего нейромедиатора центральной нервной системы (ЦНС) человека, послужила поводом рассматривать ацилполиамины в качестве возможной основы для создания лекарственных препаратов для лечения разнообразных состояний, связанных с перевозбуждением и так называемой «эксайтотоксичностью» — гибелью нейронов при их избыточной активности. К примеру, аргиопин снижал внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} и предотвращал гибель выделенных нейронов мозжечка крысы, вызванную агонистами GluR (237); а при интратекальном введении аргиопина крысам наблюдались расслабление мышц и анестезия (238).

1.5. Цитолитические и антимикробные пептиды

По своему эффекту яд животных может быть нейротоксичным — в том случае, если содержащиеся в яде токсины поражают главным образом нейроны или мышцы — или цитотоксичным, если мишенью служат клетки различных тканей без ярко выраженной селективности действия. Такое деление не абсолютно, поскольку известны разнообразные токсины, проявляющие селективность в отношении не нейрональных и не мышечных тканей, однако оказывается очень удобным. К примеру, яд черной мамбы проявляет ярко выраженную нейротоксичность, его основные компоненты — это нейротоксины, селективно воздействующие на мишени в нервной системе и мышцах (239). А вот яд пчелы, напротив, проявляет в основном цитотоксичность, его главные компоненты — это цитотоксины (240).

Подавляющее большинство изученных ядов паукообразных оказывают нейротоксический эффект, однако известны важные исключения. Одно из таких — яд опасных пауков-отшельников рода *Loxosceles*, укус которых провоцирует возникновение кожных язв. PLD, являющиеся главным компонентом яда отшельников, обладают цитотоксичностью, обусловленной разрушением липидных мембран (см. ниже, раздел «Некротоксины из яда *Loxosceles*») (30, 31). Другое исключение — исследованный нами яд паука-муравьеда *L. tarabaevi*, который состоит главным образом из полипептидных цитотоксинов (99). Оказалось также, что для многих ядов пауков и скорпионов характерно проявление обоих типов активности. При этом цитолитический эффект, как правило, является следствием наличия в составе яда пептидных цитотоксинов, вследствие своих свойств называемых цитолитическими и антимикробными пептидами (АМП).

По-видимому, первыми АМП из яда паукообразных с изученной аминокислотной последовательностью стали ликотоксины I и II из яда паука-волка *Lycosa carolinensis* (101). С тех пор токсины с похожими свойствами были обнаружены в яде порядка 20 видов паукообразных, включая единственный изученный токсин из яда ложноскорпиона (см. примеры в таблице 3). Между пептидами из видов, не относящихся к одному или близким родам, редко обнаруживается значимое сходство последовательностей. Тем не менее, для подавляющего большинства цитолитических и антимикробных пептидов из яда паукообразных характерны следующие общие свойства: (1) длина ~15–50 а.о., (2) отсутствие остатков цистеина, (3) большой положительный заряд (как правило, от +3 до +8 при pH 7), (4) способность формировать амфифильные α-спирали (см. ниже), (5) эффективное взаимодействие с липидными мембранами, (6) цитолитический эффект в микромолярных концентрациях. Указанные значения не являются обязательными, поскольку известны исключения. Например, длина многих АМП из яда скорпионов всего 13 а.о., а заряд IsCT при pH 7 только +2 (см. таблицу 3).

Таблица 3. Цитолитические и антимикробные пептиды из яда паукообразных.

Источник	Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.	Заряд при pH 7	Литература
			1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 48			
Lycosa carolinensis	ликотоксин I	P61507	IWLTALKFLGKHAAKHLAKQQLSKL-NH_2	25	+6	(101)
	ликотоксин II	P61508	KIKWFKTMKSIAKFIAKEQMKKHLGGE	27	+6	
Lycosa singoriensis	ликозин-I	–	RKGWFKAMKSIAKFIAKEKLKEHL	24	+6	(241)
	ликоцитин-1	P0C2U6	GKLQAFLAKMKEIAAQTL-NH_2	18	+3	(242)
Cupiennius salei	купиеннин-1a	P83619	GFGALFKFLAKKVAKTVAKQAAKQGAKYVVNKQME-NH_2	35	+8	(243)
	купиеннин-2a	B3EWT6	GFGTILKALAKIAGKVVKKLATKPGATYMLKENLK-NH_2	35	+8	(244)
Oxyopes takobius	оксиопинин-1	P83247	FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKALAKSMADENAIRQQNQ	48	+10	(245)
	оксиопинин-2a	P83248	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDLDKNQ	37	+8	
Opisthacanthus madagascariensis	IsCT	Q8MMJ7	ILGKIWEGIKSLF-NH_2	13	+2	(246)
Mesobuthus martensii	BmKn2*	Q6JQN2	FIGAIANLLSKIF-NH_2	13	+2	(247)
	BmKb1*	Q718F4	FLFSLIPSAISGLISAFK-NH_2	18	+2	
Mesobuthus eupeus	меуцин-22	E4VP50	FFGHLFKLATKIIPSLFQRKKE	22	+4	(248)
	меуцин-24*	P0CH57	GRGREFMSNLKEKLSGVKEKMKNS	24	+4	(249)
	меуцин-25*	P0CH58	VKLIQIRIWIQYVTVLQMFSMKTKQ	25	+4	
Hoffmannihadrurus aztecus	гадрурин	P82656	GILDTIKSIASKVWNSKTVQDLKRKGINWVANKLGVSPQAA	41	+6	(250)
Pandinus imperator	пандинин-1	P83239	GKVWDWIKSAAKKIWSSEPVSQLKGQVLNAAKNYVAEKIGATPT	44	+4	(251)
	пандинин-2	P83240	FWGALAKGALKLIPSLFSSFSKKD	24	+3	
Parabuthus schlechteri	парабутопорин	P83312	FKLGSFLKKAWKSKLAKKLRAKGKEMLKDYAKGLLEGGSEEVPGQ	45	+7	(252)
Vaejovis mexicanus	вейовин	F1AWB0	GIWSSIKNLASKAWNSDIGQSLRNKAAGAINKFVADKIGVTPSQAAS	47	+4	(253)
Chelifer cancroides	хекацин-1	–	FFGAIAKLAMKFLPAIYKQIQKKRK-NH_2	25	+8	(4)

Остатки окрашены в соответствии с их свойствами: положительно заряженные синим, отрицательно заряженные — красным, гидрофобные — зеленым, гидрофильные незаряженные — малиновым. -NH_2, С-концевое амидирование. *Пептиды, последовательность которых была выведена из анализа кДНК ядовитых желез.

Стоит также отметить, что аналогичные общие свойства характерны для цитолитических и антимикробных пептидов из других источников, например токсинов из яда насекомых (таких как мелиттин из яда пчелы *Apis mellifera*) (254), защитных пептидов (ЗП) из кожи амфибий (например, магайнины) (255) или лейкоцитов млекопитающих (например, некоторые кателицидины) (256). Сколько-нибудь значимых структурно-функциональных отношений, выходящих за рамки приведенных общих признаков, обнаружить не удалось, несмотря на несколько десятилетий исследований. По сей день предсказать селективность действия АМП по аминокислотной последовательности не представляется возможным, можно лишь ожидать «обычной» мало селективной цитолитической активности в микромолярных концентрациях — при условии наличия упомянутых структурных признаков.

Интересно, что, как правило, в яде присутствует не один, а целый набор разнообразных цитолитических пептидов. К примеру, если вначале в яде *C. salei* было описано одно семейство АМП, состоящее из четырех представителей, которые различаются точечными заменами (купиеннины 1a–d) (243), то впоследствии оказалось, что в этом яде присутствует несколько десятков пептидов, похожих по свойствам и составляющих несколько семейств (244).

Как и в случае других кодируемых в геноме токсинов, помимо выделения пептидов из яда значительное распространение получила альтернативная стратегия, заключающаяся в анализе кДНК ядовитых желез и синтезе пептидов-кандидатов с предполагаемыми антимикробными свойствами (247, 249, 257-261). В этом случае исследователи используют ряд подходов: (а) поиск новых пептидов с последовательностями, близкими уже известным соединениям; (б) выявление новых зрелых последовательностей с использованием знаний о процессинге предшественников токсинов (см. ниже раздел «Биосинтез токсинов паукообразных»); (в) предсказание антимикробных свойств у новых пептидов на основании общих свойств, перечисленных выше. Некоторые из выведенных с помощью такой стратегии пептидов стали одними из наиболее исследованных в области. К примеру, пептид BmKn2, предсказанный в результате анализа библиотеки кДНК ядовитых желез китайского скорпиона *M. martensii*, был синтезирован, у него была обнаружена антимикробная активность (247), на его основе были получены многочисленные производные, в том числе, с улучшенными свойствами, например сниженной гемолитической активностью или высокой активностью в отношении биопленок (262-264).

Стоит отметить, что применение альтернативной стратегии поиска АМП по транскриптому не гарантирует, что полученные пептиды присутствуют в яде. Кроме того, возможны ошибки, характерные для предсказания белков по нуклеотидным последовательностям. Например, в библиотеке кДНК ядовитых желез скорпиона *Heterometrus spinifer* была

обнаружена нуклеотидная последовательность, предположительно кодирующая АМП, который назвали HsAp (259). Для этого пептида характерны общие свойства АМП, он был синтезирован и показал антимикробную активность в микромолярных концентрациях. Однако в его составе имеется один остаток цистеина, причем авторы никак не комментируют эту особенность и не приводят никаких первичных данных анализа структуры синтезированного соединения. Представляется маловероятным, что HsAp содержится в яде скорпиона в немодифицированном виде, по всей видимости, имеет место окисление тиольной группы с образованием либо межмолекулярной дисульфидной связи, либо сульфокислоты.

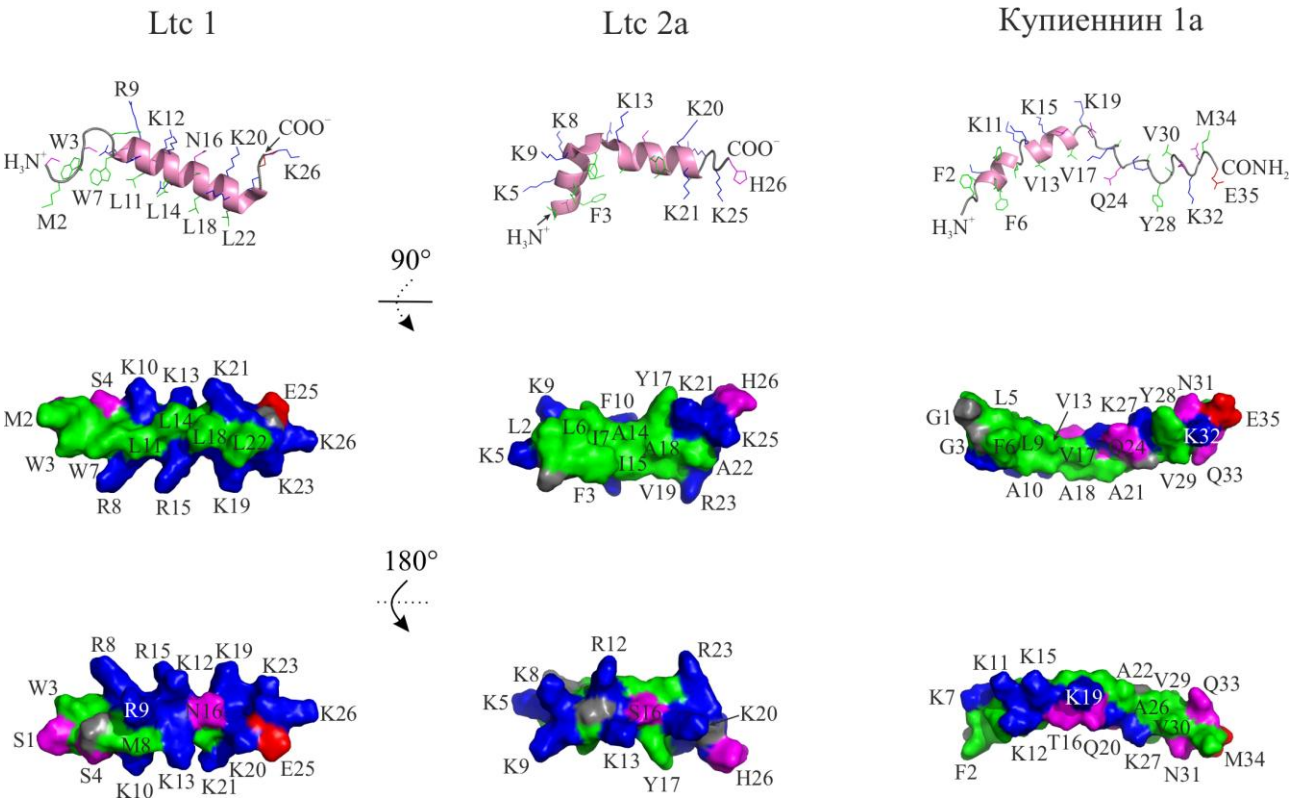
Помимо аминокислотных последовательностей, в настоящее время известна пространственная структура нескольких цитолитических токсинов из яда паукообразных в различных средах, имитирующих мембрану (в водном растворе эти пептиды, как правило, не упорядочены). Так, структура купиеннина 1a и меуцина-24 была изучена в растворе 50% трифторэтанола [ТФЭ; идентификатор в базе данных Protein Data Bank (PDB), PDB ID: 2K38, 2KFE) (265), а структура латарцинов 1 и 2a (Ltc 1 и 2a) из яда паука *L. tarabaevi* и IsCT — в суспензии мицелл детергента [додецилсульфата натрия (ДСН); PDB ID: 2PCO, 2G9P, 1T51] (266-268). Во всех случаях наблюдается формирование амфифильных α-спиралей с выраженными кластерами гидрофобных и гидрофильных остатков с противоположных сторон спиральных цилиндров (рисунок 3). Очевидно при этом, что раствор ТФЭ является неудачным выбором среды для моделирования мембраны в силу его изотропии, мицеллы детергентов лучше подходят для этой задачи, однако обладают существенной кривизной поверхности и высоким уровнем экспонирования гидрофобных групп. Лучшими средами для моделирования биологических мембран служат бицеллы, липосомы и нанодиски; эти среды были использованы для изучения структуры ряда мембранных белков, оказалось, что их структура зачастую весьма чувствительна в отношении мембранного окружения (269). Таким образом, наши представления об организации цитолитических токсинов из яда паукообразных ограничены и, вообще говоря, не соответствуют реальной структуре при реализации их функции.

Наиболее характерное свойство структуры АМП из яда паукообразных — именно амфифильность. При этом она может проявляться на уровне первичной (см. регулярное чередование гидрофильных и гидрофобных а.о. в последовательностях; таблица 3), вторичной (например, у Ltc 2a в α-спиральной конформации гидрофильные и гидрофобные а.о. расположены четко на противоположных сторонах молекулы; рисунок 3) или пространственной структуры (в случае купиеннина 1a наблюдается гидрофобный тяж; рисунок 3).

Изученные цитолитические и антимикробные пептиды из яда паукообразных воздействуют на биологические мембраны рецептор-независимым способом, т.е. для их активности нет необходимости в присутствии каких-либо белков. Для описания механизма их действия в

настоящее время было предложено несколько возможностей (270, 271), чаще всего цитируются три модели: «доска-бочка» (англ. barrel-stave; пептидные молекулы образуют трансмембранные каналообразующие олигомеры), «тороидальная пора» (англ. toroidal pore; образуется как пептидами, так и липидами, соединяющими монослои) и «ковер» (англ. carpet; глобальная дестабилизация мембран подобно действию детергентов). Первая из них, вероятно, наименее распространена и встречается лишь в нескольких случаях (272, 273), тогда как две других, как полагают, преобладают в случае α-спиральных АМП и линейных цитолитических пептидов из яда членистоногих; к примеру, считается, что мелиттин действует именно таким образом (274, 275). Кроме того, один и тот же пептид, по-видимому, может функционировать по разным механизмам — в зависимости от концентрации и липидного состава мембраны.

Рисунок 3. Пространственная структура цитолитических токсинов из яда пауков. Показаны структуры Ltc 1 и 2a в суспензии мицелл ДСН (PDB ID: 2PCO, 2G9P) и купиеннина 1a в 50% ТФЭ (2K38). В верхнем ряду ленточные представления, указаны N- и C-концы цепей, спиральные участки показаны розовым, петлевые участки — серым. В среднем и нижнем ряду показаны молекулярные поверхности пептидов, раскрашенные в соответствии со свойствами а.о. как в таблице 3.



Во всех моделях первым этапом служит взаимодействие пептидов с мембранами. Положительно заряженные а.о. пептидов притягиваются к отрицательно заряженным остаткам фосфорной кислоты фосфолипидов. Пептиды приобретают α-спиральную конформацию, а

их амфифильные свойства позволяют буквально встраиваться в липидный бислой — так, что гидрофобные кластеры погружаются в область хвостов липидов, а гидрофильные взаимодействуют с полярными головками и водной фазой. Адсорбированные на мембране пептиды располагаются в интерфазе так, что наблюдается соответствие между их свойствами и локальными свойствами мембраны (276). Численно это соответствие можно описать как выравнивание векторов гидрофобного момента, рассчитанного с использованием любой выбранной шкалы гидропатии.

Эффективность адсорбции АМП и других мембрано-активных пептидов на мембранах можно характеризовать по-разному, например с помощью коэффициента распределения K_p, представляющего собой отношение концентрации связанного с мембранной фазой пептида, нормированного на концентрацию доступных липидов, и свободного пептида в растворе:

$$K_p = \frac{(\mathrm{C_b} \div \mathrm{L^*})}{\mathrm{C_f}} \quad (1),$$

где $\mathrm{C_b}$ и $\mathrm{C_f}$ — концентрация соответственно связанного и свободного пептида, L* — концентрация доступных для связывания пептида липидов.

Можно также использовать значения свободной энергии распределения, рассчитанные по формуле:

$$\Delta \mathrm{G} = -RT \ln\left(K_p \times W\right) \quad (2),$$

где W — концентрация воды (≈55,5 М).

К примеру, для мелиттина $K_p \approx 7{\times}10^3$ $\mathrm{M^{-1}}$, $\Delta \mathrm{G} \approx -7{,}5$ ккал/моль в случае больших липидных везикул (липосом с диаметром ≈ 100 нм; в иностранной литературе чаще обозначаются “LUV”, англ. large unilamellar vesicles, т.е. большие моноламеллярные везикулы), состоящих из 1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ПОФХ) (277).

Чуть более сложная модель подразумевает насыщение, т.е. ограниченное число сайтов связывания пептида на мембране, и участие в образовании такого сайта определенного числа молекул липида. В этом случае адсорбцию характеризуют с помощью изотермы Ленгмюра:

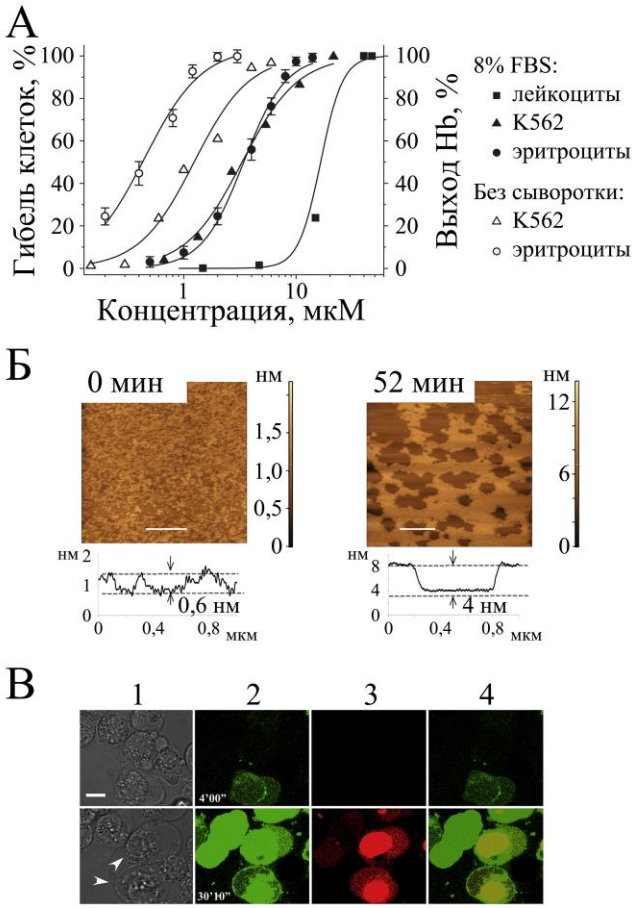
$$K_l = \frac{\mathrm{C_f} \times (\mathrm{L^*} - \mathrm{NC_b})}{\mathrm{NC_b}} \quad (3),$$

где K_l — константа диссоциации пептида от участка мембраны, образованного N молекулами липида.

К примеру, для магайнина-1 из кожи лягушки $K_l \approx 2{,}5$ мкМ, $\mathrm{N} \approx 10$ в случае малых липидных везикул (липосом с диаметром ≈ 15–50 нм; SUV, small unilamellar vesicles, малых моноламеллярных везикул), состоящих из 1,2-диацил-sn-глицеро-3-фосфо-L-серина (278).

Рисунок 4 иллюстрирует типичные эффекты цитолитических пептидов, в качестве примера выбран Ltc 2a (107). В микромолярных концентрациях пептид проявляет неселективную цитолитическую активность, которая зависит от состава среды (рисунок 4А) (279). Связывание пептида с липидными мембранами приводит к образованию дефектов в их структуре, которые можно наблюдать с помощью атомно-силовой микроскопии (рисунок 4Б) (280). Накопление связанного с клеточными мембранами пептида приводит к увеличению их проницаемости, например для йодида пропидия (PI), что удается визуализировать с помощью флуоресцентной микроскопии, например с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ; рисунок 4В).

Рисунок 4. Цитолитическая активность Ltc 2a. (А) Концентрационная зависимость цитолитических эффектов Ltc 2a. Клетки инкубировали с пептидом в течение 3 ч. Левая и правая оси ординат представляют цитотоксический и гемолитический эффекты. Кривые соответствуют аппроксимации экспериментальных данных по уравнению Хилла (см. Методы, уравнение 25). Умершие и живые клетки подсчитывали по окрашиванию PI и Hoechst 33342. Гемолиз оценивали по выходу гемоглобина (Hb) из эритроцитов, за 100% принимали результат лизиса в результате осмотического шока в дистиллированной воде. Цитолитическую активность на клетках линии K562 и гемолиз оценивали как в среде без сыворотки, так и в присутствии эмбриональной бычьей сыворотки (FBS). Рисунки на панелях А и В адаптированы из (279) с любезного разрешения А.В. Феофанова; лицензия Elsevier № 5170270363902.



(Б) Изображения липидных бислоев [5 × 5 мкм^2; состав: 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин (ДОФХ) : сфингомиелин, 1 : 1] до и после добавления Ltc 2a (0,6 мкМ), полученные с помощью атомно-силового микроскопа. Высоты показаны цветовой шкалой. Области, насыщенные сфингомиелином (фаза с большей высотой), слипаются и солюбилизируются. Высоты вдоль светлых отрезков приведены на диаграммах внизу. Рисунок адаптирован из (280) с любезного разрешения А. Януля; лицензия Elsevier № 5176010520784.

(В) Анализ взаимодействия Ltc 2a, меченного 5-карбоксифлуоресцеином, с клетками K562. Столбец 1 — изображения клеток в проходящем свете. Светлый отрезок составляет 10 мкм. Стрелки показывают мешкообразные клетки, у которых органеллы отделились от прозрачной цитоплазмы. 2 и 3 — конфокальные флуоресцентные изображения, показывающие распределение меченого Ltc 2a (2 мкМ, столбец 2) и накопление PI в клетках с увеличенной проницаемостью мембран (4 мкМ, столбец 3). Указано время после добавления пептида. 4 — это наложение изображений из столбцов 2 и 3.

Эффективность действия цитолитических токсинов зависит от множества факторов: свойств самих токсинов (длины цепи, заряда, гидрофобности, гидрофобного момента, конформационной подвижности и т.п.), мембраны (липидного состава, кривизны, заряда, толщины, свойств поверхности и т.п.) и других условий (температуры, состава водной среды, мембранного потенциала, наличия клеточной стенки, секреции клеткой протеаз и т.п.). Соответственно селективность действия токсинов будет зависеть от всех вышеперечисленных факторов.

Однако поскольку мишенью α-спиральных цитолитических и антимикробных пептидов служит сам липидный бислой, а не какой-то специфичный рецептор, их селективность невысока, и они могут рассматриваться как цитотоксины широкого спектра действия. При этом часто наблюдается сравнительно более высокая активность в отношении клеток бактерий: например, купиеннины 1 показывают антимикробную активность в концентрации 0,1–5 мкМ, в то время как гемолитическая активность проявляется в концентрации 15–25 мкМ (243). Такую селективность обычно объясняют большим отрицательным зарядом бактериальных мембран, содержащих во внешнем монослое отрицательно заряженные липиды. У клеток эукариот во внешнем монослое в основном содержатся цвиттерионные липиды, с которыми катионные цитотоксины взаимодействуют слабее.

Если функция мелиттина как мажорного цитолитического компонента яда пчелы кажется очевидной, то назначение АМП в яде паукообразных — во многих случаях открытый вопрос. По всей видимости, функция латарцинов и цитоинсектотоксинов, составляющих бóльшую часть исследованного нами цитотоксичного яда паука *L. tarabaevi* (107, 281), аналогична мелиттину, т.е. эти компоненты являются главным токсическим оружием паука. Различия с мелиттином в том, что если яд пчелы достаточно беден с точки зрения разнообразия компонентов, то в яде паука *L. tarabaevi* имеет место широкий набор компонентов сходной структуры. Аналогичная ситуация наблюдается в случае яда некоторых других паукообразных, где цитолитические компоненты превалируют или составляют большую часть, например *C. salei* (244) или *Oxyopes takobius* (Oxyopidae) (245).

Описанные нами цитолитические и антимикробные пептиды обычно рассматривают как частный случай линейных (т.е. не содержащих дисульфидных мостиков) α-спиральных АМП, охарактеризованных из множества источников. Их, в свою очередь, обычно полагают частным случаем ЗП, среди которых помимо α-спиральных выделяют дисульфид-содержащие (часто β-структурные) и пептиды с необычной структурой, например с высоким содержанием глицина или пролина (282). Этим пептидам в широком смысле приписывают защитную функцию (283); считают, что они играют роль эффекторного звена врожденного иммунитета многоклеточных организмов, непосредственно убивая микроорганизмы и гриб-

ные патогены. В этой связи одна из возможных функций цитотоксинов в яде защитная: они могу служить как для защиты самих ядовитых желез, так и для обеззараживания и консервации пищи, поскольку попадают в жертву при укусе. Действительно, даже не самые представленные в яде компоненты в пересчете на объем тела жертвы (в наиболее распространенном случае небольшого насекомого) достигнут микромолярных концентраций. К примеру, было измерено, что в мясных мух *Protophormia* sp. паук *C. salei* впрыскивает ≈3 нл/мг яда (92), а концентрация купиеннина 1a в яде составляет 1,2 мМ, т.е. его концентрация в теле жертвы достигает, по крайней мере, ≈3,6 мкМ, что близко или выше измеренных минимальных ингибирующих концентраций (МИК) для этого пептида в отношении бактерий (243).

Наконец, аналогично мелиттину и PLA_2 из яда пчелы (284), в ряде случаев показана синергия действия между цитолитическими пептидами и другими компонентами яда паукообразных (165, 245). Так, для паука *C. salei* смертность *D. melanogaster* от инъекции пептидных нейротоксинов в дозе, близкой к $ЛД_{50}$, возрастала на ≈40–60% при совместном введении с купиеннином 1a в дозе, не вызывавшей летальности (165). Молекулярная природа такой синергии не выяснена, традиционно предполагают, что цитолитические компоненты служат своеобразным фактором распространения других токсинов за счет разрушения клеточных барьеров.

Помимо рассмотренных выше линейных АМП, в яде паукообразных найдены дисульфид-содержащие полипептиды с цитолитическими свойствами. Наиболее важный пример такого сорта — двудоменные полипептиды из яда скорпионов, содержащие N-концевой линейный сегмент, похожий на линейные АМП, и С-концевой домен с S-S-мостиками, похожий на блокатор K^+ каналов. Эти компоненты относят к т.н. “β-KTx”, подробнее см. ниже раздел «Двудоменные токсины скорпионов». Цитолитические свойства были обнаружены и у других дисульфид-содержащих токсинов: у некоторых блокаторов K^+ каналов, активаторов Na^+ каналов, ингибиторов механорецепторов (285-287). Стоит отметить, однако, что во всех случаях у этих токсинов либо показана, либо предполагается высокоаффинная белковая мишень. Их мембранотропные свойства есть попросту следствие амфифильной структуры или наличия гидрофобных кластеров на поверхности молекул, а биологическая значимость цитолитической активности не доказана.

1.6. Линейные пептиды из яда паукообразных, не относящиеся к АМП

Помимо рассмотренных выше АМП, в яде паукообразных встречаются линейные пептиды, у которых цитолитическая активность не обнаружена и/или не ожидается. Важно оговориться, что оценить активность на всех типах клеток в принципе невозможно, а для многих пептидов она не исследовалась вовсе. Речь идет о том, что такие пептиды не проявляют структурных признаков АМП, поэтому у них предполагают другие свойства.

Так, к нейропептидам можно отнести обнаруженные в яде паука *Ph. nigriventer* сравнительно короткие молекулы PnlTkP (7–14 а.о.), которые по последовательности похожи на тахикинины (примеры см. в таблице 4) (288). Предполагается, что эти пептиды обусловливают сократительную активность яда на гладкой мускулатуре млекопитающих и могут вносить вклад в гипералъгезию и отечность — вследствие воздействия на тахикининовые рецепторы. Поскольку тахикинин-подобные пептиды играют важную роль в нервной системе беспозвоночных (289), можно предполагать, что в яде паука они нужны для парализации жертвы, сродни похожим пептидам, обнаруженным в яде паразитоидной осы *A. compressa* (290).

А к аутокоидам (локально действующим сигнальным соединениям), в свою очередь, можно причислить найденные в яде некоторых пауков и скорпионов брадикинин-потенцирующие пептиды (БПП) (291-293). В частности, из яда скорпиона *T. serrulatus* получены гипотензины (TsHpt; 24–25 а.о., см. пример в таблице 5), которые снижали артериальное давление, усиливали эффект брадикинина при инъекции крысам (i.v.) и приводили к вазорелаксации (293). Интересно, что TsHpt содержат два характерных остатка пролина в С-концевой области, которые встречаются в структуре многих БПП из яда змей (294). Механизм действия последних хорошо изучен и состоит в ингибировании ангиотензинпревращающего фермента. Аналогичный механизм предполагается для пептидов K12, а также 7.2 и T (несмотря на отсутствие сходства структуры) из яда скорпионов (см. таблицу 5) (295-297). А вот TsHpt не угнетают ангиотензинпревращающий фермент, их механизм действия, по-видимому, состоит в активации брадикининовых рецепторов B_2 и тем самым стимуляции синтеза NO (298).

Таблица 4. Сравнение тахикининов и тахикинин-подобных пептидов.

Источник	Название пептида	UniProt ID	Последовательность
Phoneutria nigriventer	PnlTkP-XIII	P86310	ZKKDKKDRFYGLM-NH_2
Aedes aegypti	Сиалокинин I	P42634	---NTGDKFYGLM-NH_2
Homo sapiens	Нейрокинин-А	P20366	---HKTDSFVGLM-NH_2
	Субстанция Р		--RPKPQQFFGLM-NH_2

Прочерки добавлены для удобства сравнения. Серым выделены отличающиеся а.о. Z, остаток пироглутаминовой кислоты; -NH_2, С-концевое амидирование.

Таблица 5. Брадикинин-потенцирующие пептиды.

Источник	Название пептида	UniProt ID	Последовательность
Tityus serrulatus	Пептид 7.2	A0A218QX07	RLRSKG
	Пептид T	Q9TWR4	KKDGYPVEYDRAY
	Гипотензин-1	P84189	AEIDFSGIPEDIIKQIKETNAK**PP**A
Buthus occitanus	K12	Q9TWD3	LRDYANRVINGGPVEAAG**PP**A
Bothrops jararaca	BPP-9a	P85162	ZWPRPQI**PP**

Характерные остатки пролина в С-концевой области выделены полужирным. Z, остаток пироглутаминовой кислоты.

Сообщается также об обнаружении брадикинина и БПП при анализе химического состава ловчих сетей кругопряда *T. clavipes* (299). Предполагается, что, поскольку они проявляют токсичность на насекомых, их функция состоит в содействии поимке и парализации жертвы пауков.

В яде ряда скорпионов найдены пептиды с повышенным содержанием остатков дикарбоновых аминокислот, т.н. «анионные пептиды» (примеры в таблице 6) (300-302); их функция остается загадкой. В этом контексте стоит заметить, что анионные пептиды из яда скорпионов напоминают пропоследовательности предшественников токсинов пауков (см. ниже раздел «Биосинтез токсинов паукообразных»). В настоящее время совершенно очевидно, что эти пропоследовательности отщепляются специализированным ферментом (т.н. «PQM-протеазой»), однако, несмотря на определенные старания, соответствующие анионные пептиды в яде паков обнаружены не были.

Стоит отметить, что пептидомные исследования показывают наличие в составе ядов множества коротких (менее 20 а.о.) пептидов с невыясненной функцией (115, 303). При этом многие, а часто попросту большинство из надежно идентифицированных коротких пептидов представляют собой фрагменты бóльших полипептидов. Вполне возможно, что их обнаружение — это артефакт пробоподготовки или результат случайного, а не целевого протеолиза в ходе биосинтеза и созревания компонентов яда.

Таблица 6. Анионные пептиды из яда скорпионов.

Источник	Название пептида	UniProt ID	Последовательность
Tityus pachyurus	Tpa3	P0DL22	ADDDLEGFSEEDLKAIKEHRAGLAA
Tityus stigmurus	Pape	P0C8W6	KQLLKEALAPEPAPKPAPEPAPEPAPEPAPEAA PEPAAAAPEAAPE

А.о. раскрашены в соответствии со свойствами (как в таблице 3).

1.7. Разнообразие дисульфид-содержащих пептидов из яда паукообразных

Наибольший интерес у исследователей вызывают именно дисульфид-содержащие пептиды из яда паукообразных: дело в том, что среди них находят наиболее специфичные и высокоаффинные лиганды нейрорецепторов и ионных каналов. Кроме того, именно такие вещества превалируют в составе яда большинства исследованных видов — и с точки зрения числа различных соединений, и по функциональной нагрузке (именно они служат главным оружием ядовитых животных), и просто по массовой доле. Разнообразие дисульфид-содержащих пептидов можно охарактеризовать как структурно, так и функционально.

С точки зрения структуры возможны различные подходы: (1) объединение пептидов в семейства по сходству аминокислотных последовательностей, (2) выделение групп по характерному расположению остатков цистеина и S-S-мостиков или (3) по типу пространственной укладки (фолду). Что касается первого подхода, а именно он лежит в основе классификации, представленной в UniProt (VenomZone), то число семейств будет зависеть от способа их определения. В большинстве случаев понятие белкового семейства обусловлено контекстом и может сильно различаться в зависимости от области исследования. В UniProt используют классификацию белковых семейств InterPro (http://www.ebi.ac.uk/interpro/), которая в свою очередь объединяет результаты использования нескольких инструментов и информации из других баз данных, например Pfam (http://pfam.xfam.org/) и PROSITE (https://prosite.expasy.org/). Кроме того, для наиболее изученных групп токсинов с развитой номенклатурой (см. развернутый комментарий выше) используется принятая в литературе классификация: это касается токсинов скорпионов, воздействующих на K_v и кальций-активируемые K^+ каналы (K_{Ca}) (157, 304) или Na_v (305), а также PLD из яда пауков-отшельников (306, 307).

Аннотация семейств токсинов пауков с помощью InterPro была существенно улучшена швейцарскими учеными, предложившими универсальный подход к классификации пептидов в семейства с использованием скрытых марковских моделей (308). Были предложены универсальные классификаторы для объединения известных токсинов в семейства, основанные на: (а) распределении остатков цистеина в последовательности, (б) длине участков последовательности между консервативными остатками цистеина, (в) свойстве а.о. (заряд, гидрофобность, размер).

Важно, что аннотация токсинов в UniProt проходит ручную проверку. Решение о включении каждого токсина в какое-то семейство принимается специалистом с учетом применения подходов, перечисленных выше, а также множественного выравнивания с другими токсинами. В случае отсутствия значимого сходства новый токсин помечают как не классифицированный в семейство. При появлении 2–3 похожих последовательностей их выделяют

в новое семейство. По состоянию на март 2021 г. в UniProt токсины пауков объединяют в >120 семейств, а скорпионов — в ≈90 семейств, при этом свыше 100 токсинов не классифицированы в семейства.

Второй подход лежит в основе общепринятой классификации конотоксинов (139), для токсинов паукообразных его используют редко. Для начала стоит оценить, сколько вообще дисульфидных связей встречается в токсинах и как часто. Оказывается, что число S-S-мостиков варьирует в пределах от одного (у описанного нами оксиопинина 4a, см. раздел «Уникальная структура оксиопинина 4a» Результатов) до, по крайней мере, восьми (у описанного нами «двудоменного» токсина CpTx 1, см. раздел «Модульные токсины *Cheiracanthium punctorium*» Результатов).

На следующем этапе необходимо отыскать характерные мотивы расположения цистеиновых остатков в аминокислотных последовательностях токсинов. Исчерпывающий анализ такого рода не выполнен, однако некоторые закономерности известны. Например, ряд токсинов скорпионов, содержащих четыре остатка цистеина, имеет два мотива CX_3C, где C — цистеин, а X — любой а.о. Большинство токсинов скорпионов содержит 3–4 дисульфидных мостика и может быть отнесено к одной из двух групп: короткие (~25–40 а.о.) или длинные (~60–75 а.о.), при этом у них остатки цистеина расположены похожим образом, а также имеются характерные мотивы CX_3C (в средней части последовательности) и CXC (ближе к C-концу). Помимо этих «базовых» мотивов, у различных групп коротких и длинных токсинов наблюдается характерное для них расположение «дополнительных» остатков цистеина.

В 2005 г. С.А. Козлов (ИБХ РАН), проанализировав известные в то время последовательности предшественников пептидных токсинов пауков, а также данные секвенирования транскриптомов ядовитых желез десятка видов, пришел к выводу о наличии особых мотивов первичной структуры (158). Мотив PSM (англ. principal structural motif, «основной структурный мотив») локализован в N-концевой части молекул и содержит два остатка цистеина, разделенные шестью другими, и расположенный далее по последовательности дублет остатков цистеина: CX_6CX_nCC, где n = 5–10. У почти половины токсинов с PSM вдобавок к нему находят мотив ESM (англ. extra structural motif, «дополнительный структурный мотив»), представляющий собой пару мотивов CXC, расположенных ближе к C-концу.

В настоящее время очевидно, что большинство токсинов пауков относятся к ноттинам, т.е. содержат мотив цистинового узла (ICK). В расширенной форме он записывается формулой: $CX_{1–7}CX_{2–10}CX_{0–6}CX_{1–16}CX_{1–18}C$, которая меняется (интервалы расширяются) по мере накопления данных и обнаружения новых пептидов (см. базу данных KNOTTIN:

https://www.dsimb.inserm.fr/KNOTTIN/index.php) (309). В пространстве ноттины формируют характерную укладку (отсюда названия), которая рассматривается в следующем разделе.

Наконец, наиболее востребованный подход — это объединение пептидов в группы в соответствии с общностью пространственного строения (см. следующий раздел). Важно иметь в виду обычный в случае белковых структур комментарий: для подавляющего большинства пептидов пространственная структура не исследовалась, однако тип их укладки предполагается на основании сходства аминокислотных последовательностей и цистеиновых мотивов с уже изученными пептидами.

Разнообразие дисульфид-содержащих пептидов из яда паукообразных не ограничивается простыми однодоменными структурами; оказалось, что в яде могут присутствовать токсины, состоящие из двух доменов или модулей (см. ниже раздел «Двудоменные токсины из яда паукообразных»). Более того, наше исследование показывает, что встречаются всевозможные комбинации модулей (см. соответствующие разделы Результатов).

Что касается функционального разнообразия, то здесь возможно еще больше подходов к характеристике известного многообразия токсинов: по (а) оказываемому эффекту, (б) молекулярной мишени действия, (в) таксономической или (г) молекулярной специфичности, (д) механизму действия. Токсины могут быть в разной степени представлены в ядах (быть мажорным или минорным компонентом), иметь бóльшее или мéньшее функциональное значение (быть основным действующим началом или вспомогательным компонентом). Кроме того, между токсинами с разными функциональными особенностями может иметь место взаимодействие (синергия), они могут формировать своеобразные «группы заговорщиков» — эффективные в совместном действии ансамбли.

Среди S-S-содержащих пептидов из яда паукообразных прежде всего известны лиганды ионных каналов: K_v и K_{Ca}, Na_v и Ca_v. Это неудивительно: эти мишени являются ключевыми компонентами передачи нервного сигнала, и воздействие на них может приводить к параличу. В яде хорошо изученных скорпионов (семейство Buthidae) бóльшую часть занимают разнообразные блокаторы K_v и K_{Ca} и модуляторы (активаторы) Na_v. Яды хорошо изученных пауков тоже, как правило, богаты пептидными лигандами ионных каналов, в этом случае наблюдается более широкое разнообразие. К примеру, в яде пауков-птицеедов (Theraphosidae) всегда находят ингибиторы активации различных каналов. В яде американских воронковых пауков (Agelenidae) высоко содержание ингибиторов Ca_v и активаторов Na_v. А в яде австралийских воронковых пауков (Atracidae) встречается значительное содержание ингибиторов K_{Ca} и Ca_v, а также активаторов Na_v (однако см. ниже комментарии по поводу пересмотра фармакологии этих токсинов в соответствующих разделах).

В последние 15 лет большое внимание уделяется также токсинам, приводящим к болевой реакции. Наибольшее разнообразие таких соединений опять представлено S-S-содержащими пептидами. Оказывается, что болевой ответ (как и паралич) может возникать при воздействии токсинов на K_v или Na_v, однако в состав яда могут входить и специфические лиганды болевых рецепторов, причем среди них встречаются не только активаторы, но и ингибиторы.

Разнообразие токсинов не ограничивается воздействующими на перечисленные ионные каналы. Например, в настоящее время накапливаются свидетельства о большом разнообразии лигандов nAChR в яде паукообразных. Такие токсины свойственны другим изученным ядовитым животным — змеям и конусам. nAChR представляют собой очевидную мишень для паралитических токсинов против позвоночных, но они также хорошо известные мишени инсектицидов, поэтому нахождение воздействующих на них токсинов в яде паукообразных не удивительно. В яде скорпионов находят токсины, способные проникать через плазматическую мембрану и воздействовать на внутриклеточные мишени, в частности на рианодиновые рецепторы. В разделах ниже мы рассмотрим разнообразие мишеней токсинов паукообразных.

Отдельного внимания заслуживает специфичность токсинов. Скажем вначале о таксономической специфичности. Дело в том, что токсины воздействуют не просто на тип молекулярной мишени, а на молекулярную мишень определенных животных, например не на «ионные каналы» вообще, а на каналы определенных животных, которые могут значительно отличаться по структуре между собой. Среди лигандов ионных каналов поэтому можно встретить такие, что проявляют различный спектр специфичности. Его можно характеризовать как по действию токсинов на соответствующих животных, так и по действию на молекулярные мишени различного происхождения. В случае S-S-содержащих пептидов наблюдаются различные варианты: бывают токсины с ультравысокой селективностью, а бывают — крайне не селективные. Например, среди главного оружия скорпионов, активаторов Na_v, находят как те, которые показывают высокую селективность в отношении каналов млекопитающих или насекомых, так и те, что воздействуют на эти каналы «без разбора». А встречаются и вовсе вопиющие случаи, когда мишень действия у разных организмов разная. Таковы короткие инсектотоксины из яда скорпионов: они убивают насекомых, а у млекопитающих воздействуют на опухолевые клетки (см. соответствующий раздел ниже).

Более того, чаще всего у животного имеется несколько вариантов молекулярной мишени определенного типа, например изоформ ионного канала. Токсины могут проявлять как высокую селективность в отношении определенных изоформ, так и воздействовать на множество изоформ без существенных различий. Например, опять же среди активаторов Na_v из

яда скорпионов находят такие, что преимущественно воздействуют на конкретные изоформы, так и с весьма широким спектром.

Молекулярный механизм действия на мишень может тоже существенно различаться. Так, среди токсинов из яда паукообразных, воздействующих на Na_v, находят поровые блокаторы и различные модуляторы воротных механизмов: ингибиторы и потенциаторы активации, а также ингибиторы инактивации; более того, некоторые токсины обладают способностью связываться не с одним, а разными сайтами в канале и использовать различные механизмы действия. Различаются токсины и способом связывания с мишенью: это может быть взаимодействие напрямую с образованием комплекса «канал–токсин», а в некоторых случаях важную роль играет также мембрана и/или слагающие ее липиды, и тогда может образовываться тройной комплекс «канал–токсин–мембрана» или «канал–токсин–липиды». Или же для взаимодействия с каналом токсин должен вначале связаться с мембраной, а уже затем в результате латеральной диффузии ассоциирует с каналом. В таком случае говорят о механизме «мембранного доступа» (англ. membrane access) или «мембранного катализа».

В разделах ниже мы более подробно рассмотрим известное сегодня разнообразие дисульфид-содержащих пептидов из яда паукообразных — по группам токсинов, их мишеней и механизмам действия.

1.8. Пространственная структура дисульфид-содержащих пептидов

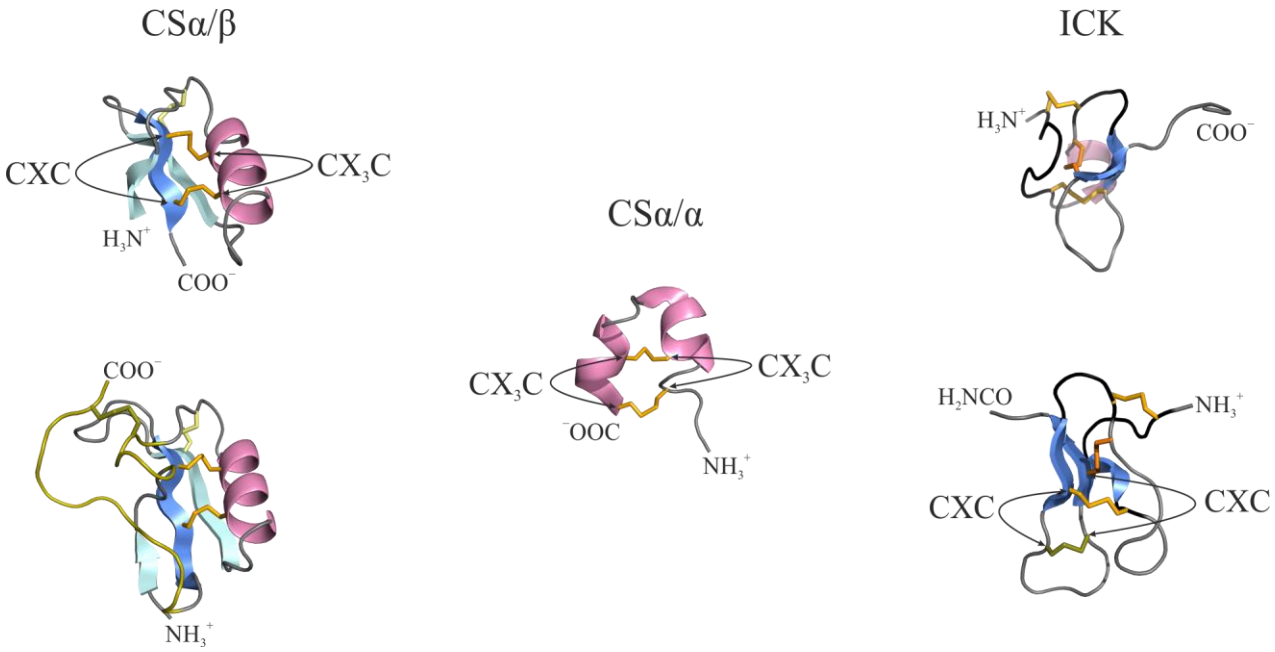
Как мы говорили выше, для пептидных токсинов пауков и скорпионов характерны определенные типы укладки и структурные мотивы. Наиболее часто встречаемые мотивы первичной структуры (расположение остатков цистеина) рассмотрены нами в предыдущем разделе. Здесь мы остановимся на особенностях пространственной структуры токсинов паукообразных.

Большинство токсинов скорпионов формируют укладку цистеин-стабилизированных α-спирали/β-слоя (CSα/β) и содержат в своем составе соответствующий мотив первичной структуры. Укладка CSα/β относится к структурному классу “α/β” (белки, содержащие регулярно чередующиеся вдоль полипептидной цепи элементы вторичной структуры) и представлена одним β-листом из двух или трех антипараллельных β-тяжей, два последних из которых формируют β-шпильку, и одной α-спиралью. В базе данных CATH (https://www.cathdb.info) (310) эта укладка обозначена как дефензин А-подобная (CATH ID: 3.30.30), ее формируют также дефензины беспозвоночных и растений.

В пространстве получается так, что имеющаяся у этих токсинов α-спираль крепится на одном из β-тяжей двумя S-S-мостиками. При этом очевидно 1D–2D–3D соответствие: дело в том, что в β-структуре боковые цепи ориентируются по одну сторону β-листа, когда а.о. расположены через один в аминокислотной последовательности — это структурный смысл мотива CXC. Аналогично в α-спирали наиболее близко по одну сторону цилиндра расположены боковые цепи а.о., лежащих через три в аминокислотной последовательности — в этом значение мотива CX_3C. Итак, в близко расположенных участках α-спирали и β-тяжа остатки цистеина мотивов CX_3C и CXC оказываются попарно сближены и формируют дисульфидные связи (см. рисунок 5). Точно так же ясен смысл наличия двух мотивов CX_3C у токсинов с укладкой типа CSα/α: здесь попарно сближены остатки цистеина в двух α-спиралях, разделенных петлей (рисунок 5).

Структурный смысл мотивов PSM и ICK, характерных для подавляющего большинства токсинов пауков, иной: в этом случае остатки цистеина расположены так, что в пространстве одна дисульфидная пронизывает кольцо, образованное двумя другими дисульфидами и соединяющими их частями основной цепи — и получается ноттиновая (ICK) укладка (см. рисунок 5). Она относится к структурному классу “β” (белки, содержащие только β-структуру) и представлена одним β-листом из двух или трех антипараллельных β-тяжей, два последних из которых формируют β-шпильку. Ноттины очень распространены в природе: это не только токсины пауков, но также конусов и других ядовитых животных, циклотиды, ингибиторы протеаз из растений, АМП из разных источников, гурмарин и даже агути-подобный пептид человека (см. базу данных KNOTTIN) (309).

Рисунок 5. Типы укладок, характерные для дисульфид-содержащих пептидных токсинов паукообразных. Показаны структуры: харибдотоксина (PDB ID: 2CRD) — типичного токсина скорпиона с укладкой CSα/β и тремя дисульфидными мостиками (слева вверху); Aah II (1PTX) — CSα/β с четырьмя S-S-мостиками (слева внизу); κ-хефутоксина-1 (1HP9) с укладкой CSα/α (в центре); ханатоксина 1 (1D1H) и δ-палутоксина 2 (1V91) — типичных токсинов пауков с укладкой ICK и тремя или четырьмя S-S-связями соответственно (справа вверху и внизу). Все структуры в ленточном представлении, указаны N- и C-концы цепей (амидирование в соответствии с аннотацией PDB), дисульфидные мостики показаны оттенками желтого или зеленого, спиральные участки — розовым, β-тяжи — оттенками голубого, петлевые участки — серым или черным. В структурах с укладкой CSα/β два дисульфидных мостика желтые, они скрепляют α-спираль с β-тяжом, окрашенным голубым. Другие β-тяжи светло-голубые, третья консервативная дисульфидная связь светло-желтая. У харибдотоксина отмечены мотивы CXC и CX_3C. Дополнительные элементы структуры Aah II, скрепленные четвертым дисульфидным мостиком, окрашены оливковым. У κ-хефутоксина-1 отмечены два мотива CX_3C. В структурах с укладкой ICK две дисульфидные связи желтые; петлевые участки, расположенные между соответствующими остатками цистеина и формирующие вместе с ними кольцо, черные. Третья дисульфидная связь, пронизывающая кольцо, выделена оранжевым. Четвертый S-S-мостик у δ-палутоксина 2, стабилизирующий β-шпильку, оливковый. Здесь отмечены два мотива CXC, составляющие ESM.



В базе данных SCOP (https://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/) (311) небольшие белки (пептиды) выделены в самостоятельный структурный класс (“Small proteins”), и упомянутые наиболее распространенные укладки CSα/β и ICK объединены в один фолд “Knottins” (SCOP ID: 2000181). А поиск токсинов пауков с ноттиновой укладкой в CATH приводит к противоречивому результату с аннотацией близких структур не только в различные типы укладок, но даже структурные классы. Эта ситуация отражает то, что используемые в указанных базах данных алгоритмы не оптимальны для небольших дисульфид-богатых белков.

Описанные выше структурные мотивы CSα/β и ICK являются «базовыми». Структура многих токсинов может быть описана просто ими: так, классические блокаторы K^+ каналов

из яда скорпионов (см. раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов») — типичные пептиды с укладкой CSα/β, а около трети известных дисульфид-содержащих токсинов пауков — типичные простейшие ноттины.

В настоящее время известно большое число «надстроек» или модификаций этих базовых типов укладки. Так, среди блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов находят различные варианты расположения дисульфидов, у некоторых пептидов может даже отсутствовать собственно мотив закрепленных α-спирали и β-тяжа. Токсины скорпионов, воздействующие на Na_v (см. разделы про α и β-токсины), в структурном отношении представляют собой базовую укладку CSα/β, как у блокаторов K^+ каналов, с удлиненными N- и C-концевыми областями, которые стабилизируются дополнительной (четвертой) дисульфидной связью (см. рисунок 5).

Похожим образом в яде пауков находят разнообразные по длине полипептиды, которые при сохранении базовой ноттиновой укладки различаются расположением дополнительных дисульфидов. Наиболее часто встречается вариант с четырьмя дисульфидами (один дополнительный мостик вдобавок к трем базовым ноттиновым), когда в аминокислотной последовательности имеется мотив ESM. Его смысл становится очевиден при рассмотрении пространственной структуры этих токсинов: дополнительная S-S-связь стабилизирует β-шпильку, расположение остатков цистеина в последовательности через один опять обусловлено необходимостью локализоваться по одну сторону β-листа, как в случае CSα/β (см. рисунок 5).

Более подробно особенности структуры различных дисульфид-содержащих пептидов из яда паукообразных обсуждаются в разделах ниже — по группам токсинов и их мишеней.

1.9. Токсины, воздействующие на K^+ каналы

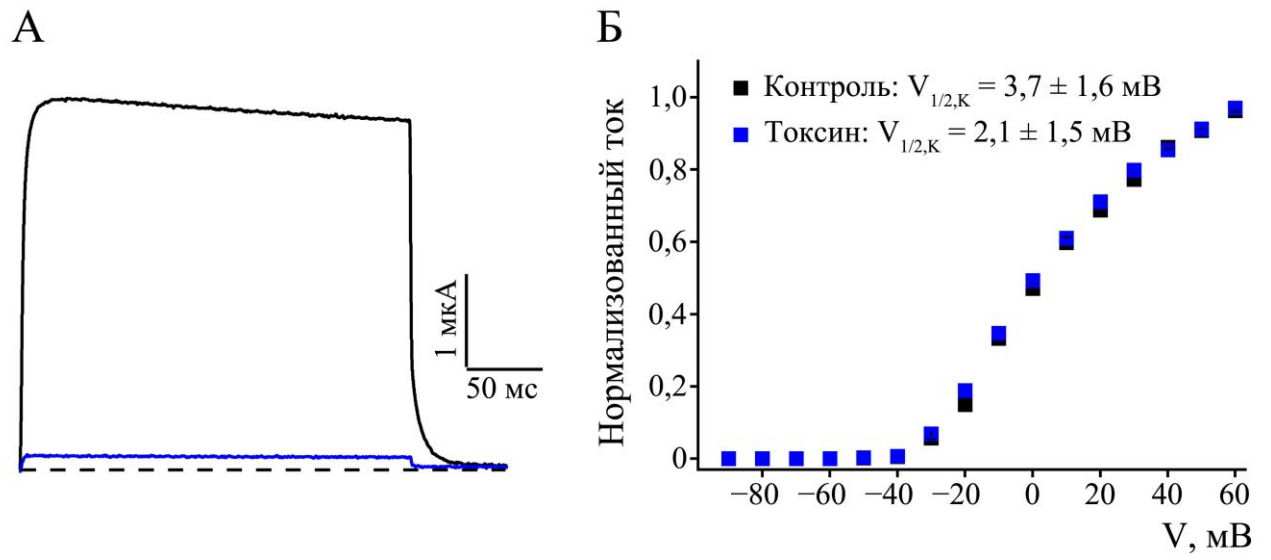
Такие токсины распространены в животных ядах. К примеру, летальные компоненты яда смертельно опасной черной мамбы *Dendroaspis polylepis*, дендротоксины (57–59 а.о., 3 S-S, укладка Кунитца), являются высокоаффинными блокаторами K_v1.1 и 1.2 (312). Похожие по структуре соединения обнаруживаются в яде морских анемон (313). Среди компонентов яда медоносной пчелы находят апамин (P01500; 18 а.о., 2 S-S), селективно воздействующий на Ca^{2+}-активируемые K^+ каналы малой проводимости (SK_{Ca} или $K_{Ca}2$), которые часто так и называют «апамин-чувствительными каналами» (314, 315).

По механизму действия среди токсинов, воздействующих на K^+ каналы, выделяют две большие группы: поровые блокаторы, непосредственно взаимодействующие с ПД и препятствующие току ионов, и модуляторы активации, ингибирующие конформационный переход каналов в активированное состояние. Интересно, что если в яде скорпионов находят почти исключительно поровые блокаторы, то для яда пауков характерны модуляторы активации. В яде пауков обнаружены также слабые поровые блокаторы K^+ каналов с укладкой Кунитца (аналогичны δ-КТх из яда скорпионов, см. ниже), однако, по-видимому, они сравнительно мало распространены. Здесь стоит отметить, что полипептиды с укладкой Кунитца очень часто находят в составе яда животных: это и упомянутые нами дендротоксины, и распространенные токсины морских анемон, и поровые блокаторы K^+ каналов из яда пауков, и δ-КТх из яда скорпионов. Чаще всего им свойственна активность в отношении K^+ каналов и способность ингибировать сериновые протеазы; бычий панкреатический ингибитор трипсина, BPTI, является наиболее известным белком с той же укладкой (316). По-видимому, это пример конвергентного «рекрутинга»: разные группы ядовитых животных независимо приобрели способность использовать указанные соединения как токсины (подробнее см. в разделе «Происхождение токсинов»).

1.9.1. Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов

Пожалуй, наиболее знаменитые лиганды K^+ каналов — это пептиды из яда скорпионов (КТх), относящиеся к поровым блокаторам; в настоящее время известно более 170 КТх (это более половины всех известных пептидных лигандов K^+ каналов), этим токсинам посвящено свыше тысячи публикаций. На рисунке 6 приведена иллюстрация типичного действия токсина-блокатора поры K^+ каналов: приложение токсина вызывает снижение амплитуды калиевого тока и не влияет на воротные механизмы (процессы активации и/или инактивации). По сходству аминокислотных последовательностей, пространственной организации и функциональным особенностям КТх объединяют в семь семейств (см. примеры в таблице 7), для которых характерно пять типов укладки (рисунок 7).

Рисунок 6. Эффект поровых блокаторов K^+ каналов. (А) Типичные записи токов через потенциал-чувствительные калиевые каналы $K_v1.1$ крысы в контроле (черная кривая) и после приложения 50 нМ порового блокатора MeKTx13-3 (синяя кривая; см. подробности в Результатах, раздел «Блокаторы K^+ каналов из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*»). (Б) Отсутствие изменений вольт-амперной характеристики каналов (за исключением уменьшения амплитуды) при действии токсина указывает на отсутствие воздействия на воротные механизмы. Указаны расчетные значения потенциала полумаксимальной активации каналов ($V_{1/2,K}$; см. Методы, уравнение 18).



В 1999 г. ведущие исследователи в области предложили объединенную номенклатуру KTx, которая с определенными модификациями актуальна и сегодня (157). Согласно этой номенклатуре, каждому индивидуальному токсину приписывают имя формата χ-KTx a.b, где χ — греческий символ, обозначающий семейство, a — арабское число, обозначающее подсемейство, b — арабское число, обозначающее индивидуального представителя подсемейства. К примеру, харибдотоксин (CTX; P13487; 37 a.o., 3 S-S; таблица 7) из яда желтого палестинского скорпиона *Leiurus quinquestriatus* (подвид *hebraeus*) в данной номенклатуре обозначается α-KTx 1.1 (семейство α-KTx, подсемейство 1, первый представитель). По мере открытия новых KTx номера подсемейств и индивидуальных представителей присваиваются в хронологическом порядке.

α-KTx (свыше 130 пептидов, объединяемых по сходству последовательностей в более 25 подсемейств) состоят из ~25–40 a.o. (3–4 S-S; CSα/β), это наиболее типичные KTx (157). β-KTx (более 15 представителей, 3 подсемейства) отличаются от α-KTx большей длиной (~50–75 a.o., 3 S-S; CSα/β) вследствие наличия удлиненного N-концевого линейного участка; подробнее об этих токсинах см. раздел «Двудоменные токсины скорпионов». Наконец, γ-KTx (≈10 токсинов; ~35–45 a.o.; 3–4 S-S) в структурном отношении аналогичны α-KTx, их выделяют на основании активности против K_v11 (ERG) (317, 318). Интересно, что несмотря

на формирование всеми указанными КТх укладки CSα/β (рисунок 7), наблюдается разнообразие расположения дисульфидных связей (наиболее частый вариант: C^1–C^4, C^2–C^5 и C^3–C^6), и у некоторых пептидов может даже отсутствовать собственно мотив закрепленных α-спирали и β-тяжа.

Среди пептидов, относящихся к семейству κ-КТх, выделяют две группы — по числу S-S-мостиков (примеры в таблице 7). κ-КТх с двумя S-S-связями (≈10 представителей; ~20–25 а.о.) — это слабые блокаторы K^+ каналов, обнаруженные в яде представителей семейств Scorpionidae и Hemiscorpiidae. В их аминокислотной последовательности находят два мотива CX_3C, где X — любой а.о., а расположение S-S-связей у них: C^1–C^4, C^2–C^3. В пространстве эти токсины формируют две короткие антипараллельные α-спирали, скрепленные дисульфидами [CSα/α, вариант 2(S-S); рисунок 7] (319, 320). κ-КТх с тремя S-S-связями (~30 а.о.) по сходству последовательностей по-прежнему относят к α-КТх (подсемейство α-КТх 20), однако расположение S-S-связей у них отличается: C^1–C^5, C^2–C^4 и C^3–C^6, а в пространстве они образуют две антипараллельные α-спирали, скрепленные дисульфидами (укладку CSα/α, вариант 3(S-S); рисунок 7) (321). В настоящее время такие κ-КТх являются редкостью и обнаружены только в яде родственных скорпионов *T. serrulatus* и *Tityus trivittatus*.

δ-КТх объединяет блокаторы K^+ каналов (менее 10 представителей; ~60–70 а.о., 3–4 S-S), формирующие укладку Кунитца (два антипараллельных β-тяжа и один, реже два, спиральных участка; рисунок 7) (322). Практически все они в субмикромолярных концентрациях ингибируют сериновые протеазы, например трипсин, и являются, таким образом, бифункциональными соединениями (323).

Малочисленное семейство λ-КТх объединяет пептиды (37–39 а.о., 3 S-S) с укладкой ICK (рисунок 7); в нем пока только два представителя: ImKTx1 из яда *Isometrus maculatus* (324) и λ-MeuKTx-1 из яда *M. eupeus* (325). Наконец, у ε-КТх (пока тоже только два представителя: Ts11 и 12 из яда *T. serrulatus*, 29 а.о., 4 S-S) не обнаружено стабильных элементов вторичной структуры. Их укладка не похожа на ICK и характеризуется отличным расположением дисульфидных связей: C^1–C^4, C^2–C^8, C^3–C^6 и C^5–C^7 (рисунок 7) (326).

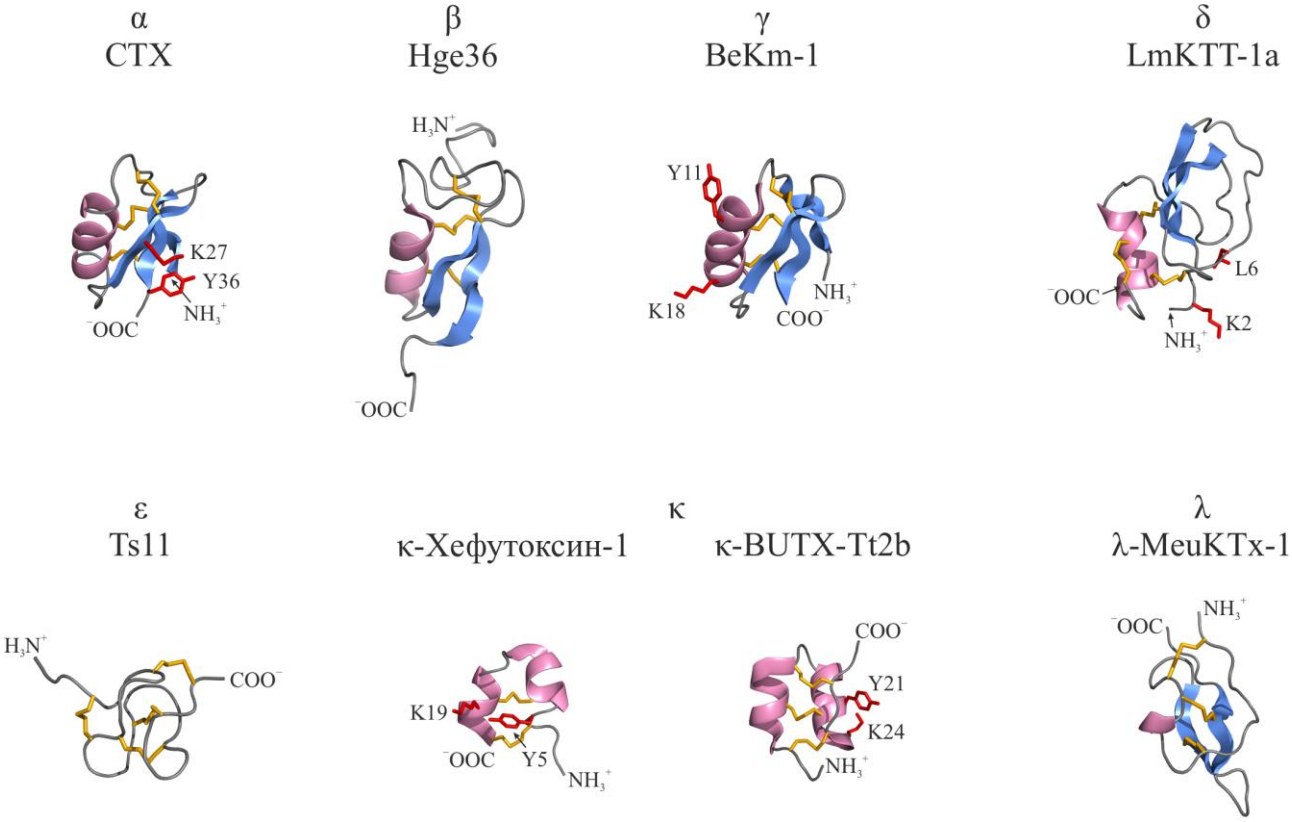
Первым исследованным КТх стал ноксиустоксин (NTx; P08815; α-КТх 2.1; 39 а.о., 3 S-S; таблица 7) из яда *C. noxius*, блокировавший K^+ ток в гигантском аксоне кальмара и изученный Л. Поссани (Национальный автономный университет Мексики) и др. (327, 328). Однако наибольшую известность снискал СТХ, исследованный лабораторией К. Миллера (Университет Брендайса, США) и группой Г. Качаровского с М. Гарсией («Мерк энд Ко», США) (329, 330).

Таблица 7. Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов.

Источник	Название		UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.	Литература
	Традиционное	Систематическое				
Leiurus quinquestriatus hebraeus	Харибдотоксин (CTX)	α-KTx 1.1	P13487	ZFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTS-RGKCMNKKCRCYS	37	(329, 330)
Centruroides noxius	Ноксиустоксин (NTx)	α-KTx 2.1	P08815	TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN-NH_2	39	(327, 328)
Androctonus mauritanicus	Калиотоксин (KTX)	α-KTx 3.1	P24662	GVEINVKCSGSPQCLKPCKDAG--MRFGKCMNRKCHCTPK-NH_2	38	(331)
L. q. hebraeus	Агитоксин-2 (AgTx-2)	α-KTx 3.2	P46111	GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAG--MRFGKCMNRKCHCTPK	38	(332)
Orthochirus scrobiculosus	OSK1	α-KTx 3.7	P55896	GVIINVKCKISRQCLEPCKKAG--MRFGKCMNGKCHCTPK	38	(333)
Hoffmannihadrurus gertschi	HgeScplp1 (Hge-скорпин)	β-KTx 3.2	Q0GY40	GWMSEKKVQGILDKKLPEGIIRNAAKAIVHKMAKN QFGCFANVDVKGDCKRHCKAED---KEGICHGTKCKCGVPISYL	76	(334)
Mesobuthus eupeus	BeKm-1	γ-KTx 2.1	Q9BKB7	RPTDIKCSESYQCFPVCKSRFGKT-NGRCVNGFCDCF	36	(318)
C. noxius	Эргтоксин (ErgTx)	γ-KTx 1.1	Q86QT3	DRDSCVDKSRCAKYGYYQECQDCCKNAGHNGGTCMFFKCKCA	42	(317)
Lychas mucronatus	LmKTT-1a	δ-KTx 2.1	P0DJ46	KKKCQLPSDVGKGKASFTRYYYNEESGKCETFIYGGVGGNSNNF LTKEDCCRECAQGSC	59	(323)
Tityus serrulatus	Ts11	ε-KTx 1.1	P0C174	KPKCGLCRYRCCSGGCSSGKCVNGACDCS	29	(326)
Heterometrus fulvipes	κ-Хефутоксин-1	κ-KTx 1.1	P82851	GHACYRNCWREGNDEETCKERC-NH_2	22	(319)
Tityus trivittatus	κ-BUTX-Tt2b	α-KTx 20.3	B3A0L5	GCMPEYCAGQCRGKVSQDYCLKNCRCIR	28	(321)
M. eupeus	λ-MeuKTx-1	λ-KTx 2.1	P86399	GCNRLNKKCNSDADCCRYGERCISTGVNYYCRPDFGP	37	(325)

В последовательности α, β и γ-KTx внесены разрывы для удобства сравнения. Остатки цистеина окрашены в соответствии с расположением S-S-мостиков. Функционально важные а.о., показанные на рисунке 6, окрашены красным. Z, остаток пироглутаминовой кислоты; -NH_2, С-концевое амидирование.

Рисунок 7. Пространственная укладка поровых блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов. Показаны структуры: CTX (PDB ID: 2CRD), Hge36 (C-концевая часть HgeScplp1; 5IPO), BeKm-1 (1LGL), LmKKT-1a (2M01), Ts11 (2MSF), κ-хефутоксина-1 (1HP9), κ-BUTX-Tt2b (2LI3) и λ-MeuKTx-1 (данные предоставлены Ш. Джу, Институт зоологии Китайской академии наук) — в ленточном представлении. Указаны N- и C-концы цепей, дисульфидные мостики показаны желтым, спиральные участки — розовым, β-тяжи — голубым, петлевые участки — серым. Боковые заместители а.о., составляющих экспериментально выявленную или предполагаемую «функциональную диаду», показаны красным.

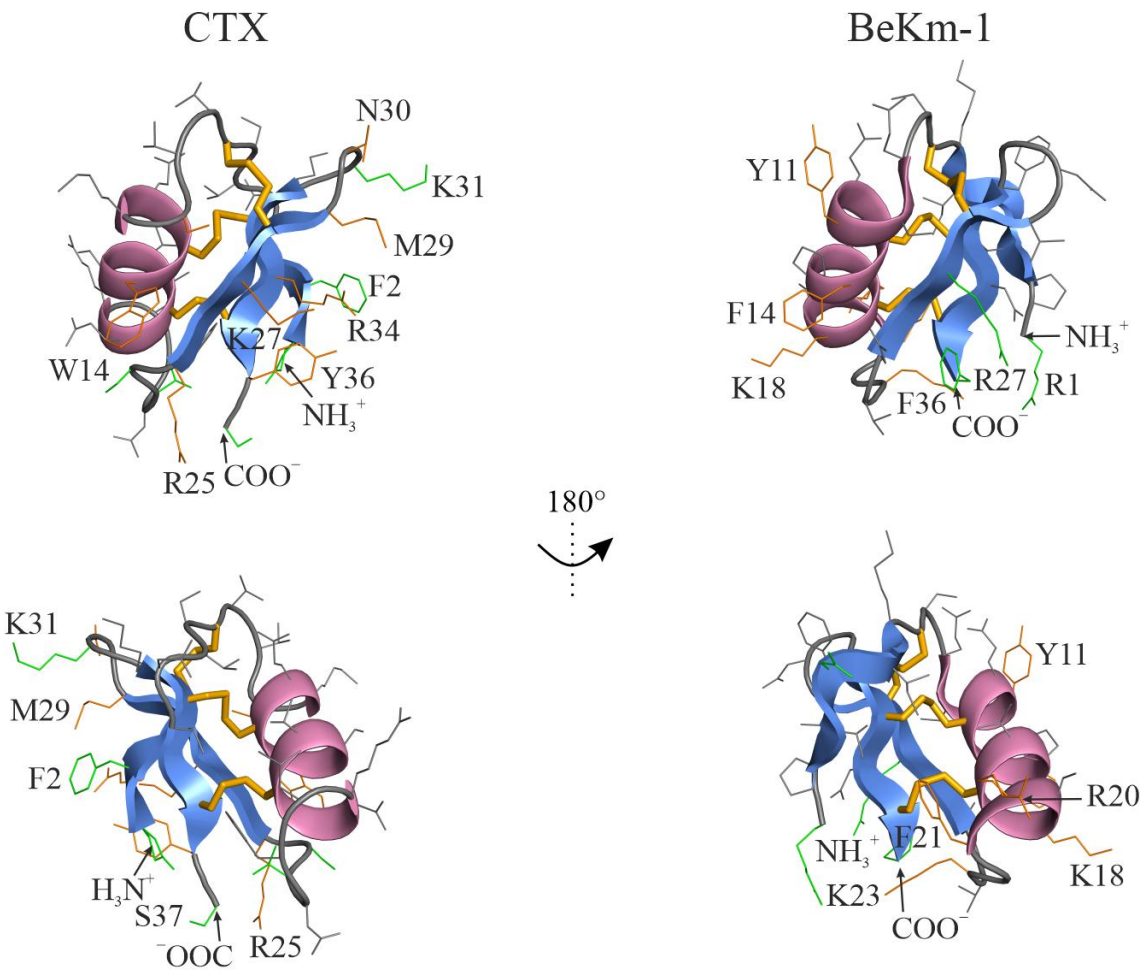


С использованием бислойных липидных мембран (БЛМ) со встроенными одиночными Ca^{2+}-активируемыми K^+ каналами большой проводимости (ВК или $K_{Ca}1.1$) из скелетных мышц крысы было продемонстрировано, что CTX связывается с ними в соотношении 1 : 1 и только со внеклеточной стороны. Кроме того, сила его связывания зависит от концентрации ионов калия и от мембранного потенциала — в том случае, если измерения проводятся в среде с ионами, которые способны проникать через K^+ каналы. Эти наблюдения позволили предположить, что CTX связывается со внеклеточной стороной поры канала и блокирует его как пробка горлышко бутылки (335, 336). Здесь он конкурирует за внеклеточный сайт связывания тетраэтиламмония (ТЭА), классического лиганда K^+ каналов (337).

Была проведена подробная характеристика структурно-функциональных отношений для CTX. В частности, был проведен сканирующий мутагенез: все а.о. с боковыми цепями, за исключением остатков цистеина, были заменены по одному, и активность полученных мутантов (всего порядка ста производных) сравнена с исходным токсином на K^+ каналах (изме-

рения проводили на $K_{Ca}1.1$ в БЛМ и модифицированном K_v дрозофилы Shaker в ооцитах *Xenopus laevis*) (338-340). Критически важными для активности токсина оказались остатки S10, W14, R25, K27, M29, N30, R34 и Y36 — все они локализованы с одной стороны молекулы CTX (см. рисунок 8). При этом 16 а.о. оказались неважными с функциональной точки зрения: их замена на а.о. с сильно отличающимися свойствами не приводила к значимому изменению активности токсина; эти а.о. локализованы с противоположной стороны молекулы. Замена еще 6 а.о. приводила к среднему падению активности CTX, в структуре токсина они окружают критически важные а.о. и отделяют их от неважных.

Рисунок 8. Локализация функционально важных остатков поровых блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов. Показаны структуры CTX (PDB ID: 2CRD) и BeKm-1 (1LGL) в ленточном представлении, указаны N- и C-концы цепей, дисульфидные мостики показаны желтым, спиральные участки — розовым, β-тяжи — голубым, петлевые участки — серым. Боковые заместители показаны линиями и раскрашены: критически важные для активности токсинов а.о. оранжевым, средней важности — зеленым, неважные — серым.



Мутагенез гена K^+ канала, в свою очередь, показал, что важные для связывания токсина а.о. локализованы в области между трансмембранными сегментами S5 и S6, а точнее —

во внеклеточных петлях между ними и поровым участком, содержащим селективный фильтр канала (340, 341); в этих экспериментах наряду с CTX использовался другой хорошо изученный α-KTx из яда того же скорпиона *L. q. hebraeus*, получивший название агитоксин-2 (AgTx-2; P46111; α-KTx 3.2; 38 a.o., 3 S-S; таблица 7) (332). Исследование активности большого числа мутантных форм CTX и AgTx-2 на мутантных каналах позволило выявить пары а.о. токсинов и каналов, которые предположительно взаимодействуют при образовании комплекса, а также объяснить селективность токсинов по отношению к различным K_v (340, 342-346). Кроме того, эти исследования позволили построить достаточно точную модель «устья» или «входного вестибюля» K^+ канала (см. ниже раздел «Токсины паукообразных как молекулярные инструменты исследования нервной системы»).

В 2013 г. лабораторией Р. Маккиннона (Рокфеллеровский университет, США) были опубликованы данные о строении комплекса CTX с K^+ каналом, изученного с помощью рентгеноструктурного анализа (РСА; PDB ID: 4JTA; рисунок 9), и в настоящее время эта работа является наиболее важным достижением в области KTx (347). Для получения комплекса использовался необычный K^+ канал, а именно химера на основе канала $K_v1.2$, в котором мотив «весла» был заменен на соответствующую область из канала $K_v2.1$ (см. объяснение в разделе «Ингибиторы активации K_v из яда пауков»). Как и предполагалось ранее на основе биохимических и электрофизиологических данных, CTX блокирует пору канала, связываясь со внеклеточной стороны (в его вестибюле; рисунок 9). При этом наблюдается соответствие формы взаимодействующих поверхностей канала и токсина, т.е. CTX действительно блокирует канал как пробка горлышко бутылки, реализуется механизм «ключ-замок»: структура устья канала при присоединении токсина почти не меняется. Это наблюдение противоречит предположениям других исследователей о значительном изменении структуры канала при связывании токсина (механизм «индуцированного соответствия»), сделанным на основании данных твердотельной спектроскопии ЯМР (348); представляется вероятным, что изменения химических сдвигов были неверно интерпретированы как отражающие структурные изменения канала.

Особая роль принадлежит функционально важному остатку лизина т.н. «функциональной диады» токсина (K27 у CTX): он наиболее глубоко проникает в пору канала и взаимодействует непосредственно с селективным фильтром (рисунок 9A, B). В K^+ каналах селективный фильтр образован высококонсервативной последовательностью ^{369}TTVGYGD^{375} (нумерация здесь и далее в соответствии с PDB ID: 4JTA); в пору канала обращены атомы кислорода пептидных связей участка TVGYG, которые имитируют гидратную оболочку проходящих катионов K^+. В изученных структурах K^+ каналов в отсутствие токсина имеются четыре сайта связывания проходящих катионов (S1–4), сформированных этими атомами ки-

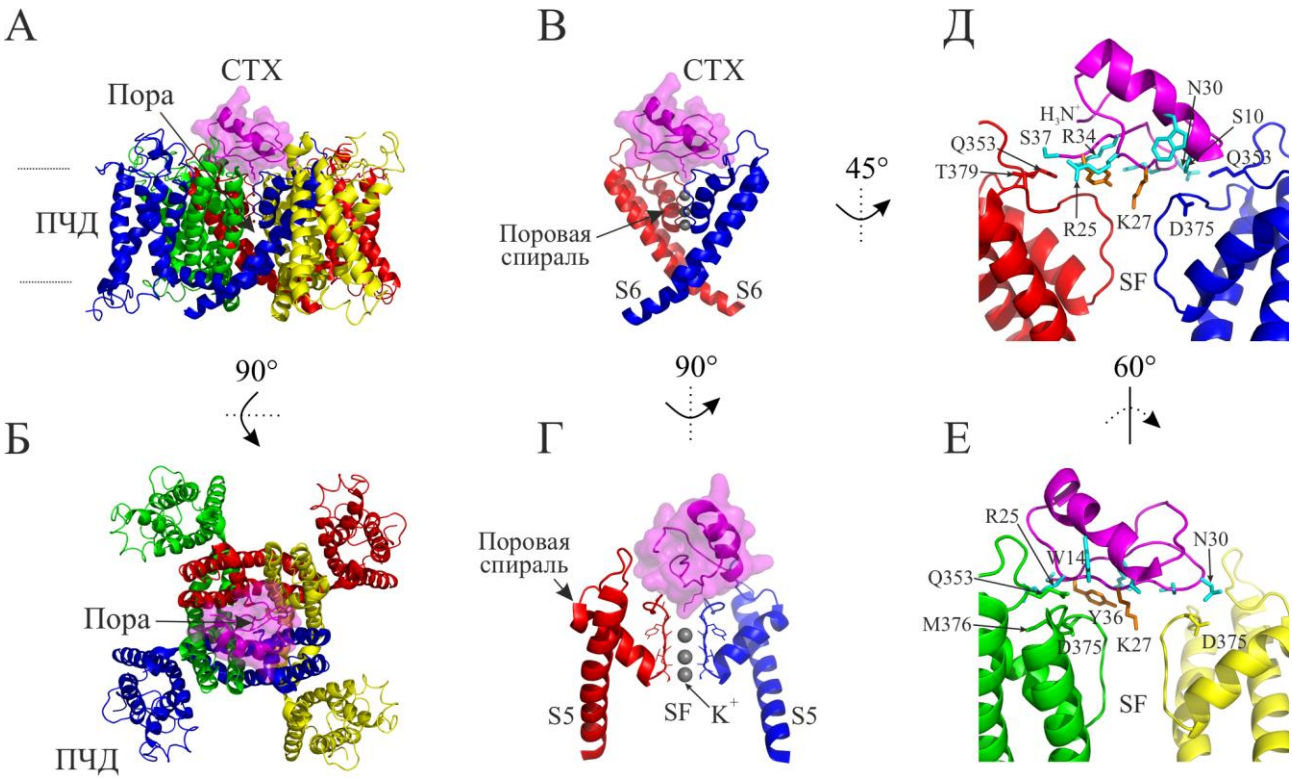
слорода (S4 образован также гидроксилами остатков треонина) (349). ε-Аминогруппа лизина диады «дотягивается» до внешнего кольца карбонилов (C=O остатков тирозина), и в результате в структуре комплекса канала с СТХ внешний сайт S1 оказывается вакантным ввиду электростатического отталкивания (рисунок 9Г). Такая конкуренция лизина диады с ионами K^+ за карбонилы селективного фильтра хорошо согласуется с приведенными выше экспериментальными данными, а именно: зависимостью силы связывания токсина от концентрации соли и мембранного потенциала (335, 336). Кроме того, понятно, почему критически важен именно остаток лизина: замена его даже на другой положительно заряженный остаток аргинина крайне не выгодна (340), аргинин больше и не укладывается в узкую нишу между токсином и селективным фильтром канала.

Долгое время считалось, что второй а.о. диады (Y36 в СТХ) формирует контакт с некой гидрофобной площадкой в вестибюле канала. Однако в реальных структурах K^+ каналов входной вестибюль обладает высокой гидрофильностью, и в разрешенной структуре комплекса выраженной гидрофобной площадки не обнаружено. По всей видимости, роль этого а.о. — придавать контактирующей с каналом поверхности токсина определенную выпуклую форму, соответствующую вогнутой поверхности устья канала. Очевидно, почему КТх свойственен положительный заряд (+4 у СТХ): входной вестибюль K^+ каналов заряжен отрицательно. А мотив кольца положительно заряженных а.о., описанный у некоторых токсинов, скорей всего предназначен именно для взаимодействия с отрицательно заряженными а.о. устья, в частности высококонсервативным D375, входящим в мотив селективного фильтра. Другие а.о. КТх, формирующие «активную» поверхность токсинов для контакта с каналом, с одной стороны, могут образовывать различного рода связи с а.о. устья (рисунок 9Д, Е), а с другой, похожи в функциональном плане на второй а.о. диады: по-видимому, важна сама форма контактной поверхности. Структурные данные замечательно согласуются с более ранними, полученными с помощью мутагенеза и отмеченными нами выше (338-340, 342-346). В частности, все критически важные по данным мутагенеза а.о. СТХ (рисунок 8) принимают непосредственное участие во взаимодействии с K_v, а неважные а.о. расположены на удаленной от канала стороне токсина (рисунок 9Д, Е).

Необходимо отметить и существенные недостатки имеющейся структуры комплекса, устранение которых — дело будущего. Во-первых, предложенная модель комплекса хорошо соответствует экспериментально полученной электронной плотности в области канала, а в случае токсина соответствие крайне низкое. Это говорит о том, что реальные расположение и конформация СТХ могут отличаться от описанных выше. Во-вторых, изучена структура комплекса токсина с гомомерным каналом, в то время как подавляющее большинство K^+ каналов *in vivo* гетеромерны (350-352). В-третьих, все четыре субъединицы канала представле-

ны в одинаковой усредненной конформации, в то время как очевидно, что токсин при связывании вносит асимметрию за счет взаимодействия с разными а.о. мономеров. По всей видимости, эта асимметрия касается прежде всего боковых цепей, а конформация полипептидного остова меняется мало. Однако для понимания природы селективности КТх и дизайна новых соединений с заданными профилем активности эта информация имеет принципиальное значение.

Рисунок 9. Комплекс харибдотоксина (CTX) с K^+ каналом. (А) Ленточная модель комплекса CTX с каналом $K_v1.2$, в котором область мотива «весла» (см. объяснение в тексте ниже) заменена на соответствующую последовательность из $K_v2.1$ (PDB ID: 4JTA) (347). Показана только мембранная часть белка, предполагаемое положение полярных головок липидов обозначено пунктирными отрезками слева. Мономеры окрашены разными цветами. CTX выделен малиновым и показан в виде ленточной модели, окруженной полупрозрачной поверхностью. Остаток лизина K27, блокирующий пору, показан линией. (Б) Вид «сверху», т.е. на плоскость мембраны со внеклеточной стороны. (В) Вид как на панели (А), показаны только поровые части двух мономеров. (Г) Вид как на панели (В) с поворотом, скрыты сегменты S6. А.о. области селективного фильтра (SF) показаны линиями, ионы K^+ — как серые сферы с диаметром ≈ 3 Å. (Д) Увеличенное изображение «входного» (внеклеточного) вестибюля канала. Линиями изображены боковые цепи остатков токсина (окрашены голубым; остатки функциональной диады K27 и Y36 — оранжевым) и канала (цветами соответствующих субъединиц), расположенные на расстоянии ≤3,5 Å от партнера по комплексу. (Е) Изображение аналогично (Д), показаны две другие субъединицы канала.



В настоящее время предполагается, что большинство α-КТх взаимодействуют с K^+ каналами аналогично CTX, на это указывают данные о ключевых а.о., полученные, напри-

мер, с помощью мутагенеза, а также высокая консервативность ключевого остатка лизина (K27 у CTX). Однако, по всей видимости, в природе встречаются и другие способы. В частности, у некоторых высокоаффинных блокаторов K_v, например относящихся к подсемейству α-KTx 9, указанный остаток лизина в структуре отсутствует (353). Анализ некоторых блокаторов Ca^{2+}-активируемых K^+ каналов малой проводимости (SK_{Ca}) и их производных показывает, что критически важные а.о. у этих токсинов могут быть расположены иначе, нежели у CTX (354). Наконец, γ-KTx взаимодействуют со своими мишенями, каналами ERG, по-другому ввиду особенностей архитектуры входного вестибюля (см. ниже раздел «Токсины паукообразных как молекулярные инструменты исследования нервной системы»). На рисунке 8 показана структура токсина BeKm-1 (Q9BKB7; γ-KTx 2.1; 36 а.о., 3 S-S; таблица 7) из яда *M. eupeus* и выделены критически важные а.о., необходимые для взаимодействия с каналом hERG1 (см. обсуждение ниже). Хорошо видно, что эти а.о. локализованы отличным от CTX образом. Итак, KTx взаимодействуют с устьем K^+ каналов несколькими способами, из которых наиболее изученным (и, вероятно, наиболее распространенным) является описанный для CTX.

По аффинности и селективности действия среди KTx находят одни из самых эффективных и специфичных веществ в природе. К примеру, CTX воздействует на каналы K_v1.2, 1.3 и K_{Ca}1.1 с $K_d \approx$ 0,1–10 нМ, аффинность KTX и Vm24 (α-KTx 23.1) из яда мексиканского скорпиона *Vaejovis mexicanus smithi* (Vaejovidae) к K_v1.3 еще выше ($K_d \approx$ 10 пМ и 3 пМ, соответственно) (332, 355, 356). В распоряжении исследователей в настоящее время имеются KTx, способные селективно блокировать определенные (под)семейства K^+ каналов: например, BeKm-1 селективно ингибирует каналы ERG1 [K_v11.1; концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) ≈ 3 нМ на канале человека] и с меньшей аффинностью родственные каналы ERG2 и 3, при этом неактивен в отношении множества других ионных каналов в концентрации 100 нМ (318, 357). Более того, известны KTx, проявляющие селективность в отношении отдельных изоформ каналов. К примеру, иберiотоксин (IbTX; P24663; α-KTx 1.3) из яда *Mesobuthus tamulus* проявляет высокую аффинность в отношении K_{Ca}1.1 ($K_d \approx$ 0,25 нМ) и при этом не воздействует на другие мишени CTX (K_v) (358). Упомянутый выше Vm24 селективен в отношении K_v1.3: его аффинность к другим исследованным изоформам, по крайней мере, в 100 раз ниже (356). В области KTx и других токсинов, воздействующих на K^+ каналы, имеет место существенное преобладание работ, посвященных именно изоформе K_v1.3; из всего многообразия исследованных KTx бóльшая часть была протестирована и показала активность на ней. Дело в том, что это валидированная фармакологическая мишень в аутоиммунных заболеваниях, и для терапевтического эффекта нужны специфичные блокато-

ры (359). Своеобразное соревнование за получение блокатора K_v1.3 с наилучшими свойствами стимулировало исследования молекулярных основ специфичности КТх.

Очевидно, что специфичность комплексообразования определяется а.о. контактирующих поверхностей белков. Поэтому, внося замены в критически важные и средней важности позиции КТх (см. рисунок 8), можно изменить их селективность. Это было продемонстрировано несколькими подходами: (1) получением химерных токсинов с «пересадкой» участков аминокислотной последовательности, содержащих важные а.о. (360); (2) получением селективного токсина с помощью фагового дисплея (355); (3) использованием молекулярного моделирования с предсказанием замен для увеличения селективности (361). Несмотря на множество работ такого рода, в настоящее время, к сожалению, не представляется возможным ни предсказать селективность КТх по аминокислотной последовательности, ни получить заданную селективность на основе известного токсина без проверки большого числа вариантов.

Интересно, что среди КТх не известно блокаторов крупных семейств K^+ каналов: входящего выпрямления (K_{ir}) и имеющих два поровых участка («двупоровых», K_{2P}). Это обстоятельство, с одной стороны, объяснимо с точки зрения эволюции: главная функция токсинов скорпиона в обездвиживании жертвы, чему лучше способствуют блокаторы K_v, поскольку воздействуют на потенциал действия непосредственно. С другой стороны, лишь небольшое число работ было посвящено поиску лигандов K_{ir} и K_{2P}.

Важным обстоятельством служит также то, что несмотря на формальное отнесение к КТх, активность некоторых токсинов, в частности β-КТх и κ-КТх, против K^+ каналов либо не была обнаружена, либо оказалась чрезвычайно низкой: например, IC_{50} для κ-хефутоксина-1 (P82851; κ-КТх 1.1; 22 а.о., 2 S-S; таблица 7) из яда Индийского черного скорпиона *Heterometrus fulvipes* (Scorpionidae) в отношении K_v1.3 составляет ≈40 мкМ (319). Представляется весьма вероятным, что мишенью действия этих токсинов являются либо какие-то неизученные K^+ каналы насекомых, либо вообще другие молекулы или процессы. В связи с этим интересно недавнее обнаружение в яде скорпиона *Urodacus manicatus* (Scorpionidae) пептида WaTx (“wasabi receptor toxin”; C0HLG4; 33 а.о., 2 S-S), по структуре относящегося к κ-КТх. Оказалось, что WaTx с высоким сродством воздействует на ионные каналы из анкиринового семейства TRPA1 (transient receptor potential channel ankyrin family): полуэффективная концентрация (EC_{50}) ≈ 15 нМ; а при подкожном (s.c.) введении мышам этот токсин вызывает болевую реакцию (см. подробнее ниже в разделе «Токсины, воздействующие на рецепторы раздражающих веществ») (362).

1.9.2. Ингибиторы активации K_v из яда пауков

По-видимому, второе место по значимости для исследователей среди токсинов, воздействующих на K^+ каналы, принадлежит ингибиторам активации K_v из яда пауков-птицеедов (семейство Theraphosidae) (363). В настоящее время известно несколько десятков таких токсинов (см. примеры в таблице 8). Они представляют собой пептиды со стандартной для токсинов пауков укладкой ICK (~30–35 а.о., 3 S-S) и выраженной амфифильностью (на поверхности выявляется кластер гидрофобных а.о., см. подробно ниже).

Наиболее изученным представителем этой группы является ханатоксин 1 (HaTx1; P56852; 35 а.о., 3 S-S; таблица 8) из яда чилийского розового птицееда *Grammostola rosea*, структура и механизм действия которого исследованы Р. Маккинноном и К. Шварцем (тогда работали в Гарвардской медицинской школе; токсин назван в честь дочери Шварца Ханы). HaTx1 был открыт как высокоаффинный ингибитор каналов $K_v2.1$ ($K_d \approx 100$ нМ) (364, 365). Эти каналы нечувствительны к AgTx-2 из яда *L. q. hebraeus*, одному из наиболее изученных α-KTx. Замена линкера S5-S6 в каналах Shaker, которые чувствительны к AgTx-2, но не HaTx1, на соответствующую последовательность из каналов $K_v2.1$ приводит к потере чувствительности к AgTx-2, однако такие каналы Shaker не становятся чувствительны к HaTx1. Таким образом, сайт связывания HaTx1 находится не в классическом месте связывания поровых блокаторов. Затем в экспериментах на каналах, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*, было показано, что приложение токсина HaTx1 вызывает сдвиг зависимости активации каналов от мембранного потенциала в сторону деполяризации, при этом каналы, связанные с токсином, могут быть активированы бóльшим потенциалом (365). Более того, концентрационная зависимость наблюдаемых эффектов проще всего объяснялась предположением о наличии четырех идентичных сайтов связывания токсина, при этом для ингибирования канала достаточно связывания одной молекулы токсина (365). Эти эксперименты убедительно свидетельствовали в пользу взаимодействия HaTx1 с ПЧД $K_v2.1$; действительно, для активации K_v необходимо, чтобы активировались все четыре ПЧД (366).

Таким образом, HaTx1 не является поровым блокатором K_v, а служит ингибитором активации каналов; аналогичными свойствами обладают другие представители данной группы токсинов. Считается, что механизм действия HaTx1 состоит в «захвате» сенсора потенциала (англ. voltage sensor trapping) в его нижнем (down) неактивированном положении и препятствовании его движению — переходу в верхнее (up) активированное положение. Действительно, показано, что связанный с каналом HaTx1 остается связанным вместе с каналом в ходе активации при приложении большого потенциала. По всей видимости, токсин выступает своеобразным грузом, «тяжесть» которого сенсору приходится преодолевать (367).

Таблица 8. Модуляторы воротных механизмов ионных каналов из яда пауков.

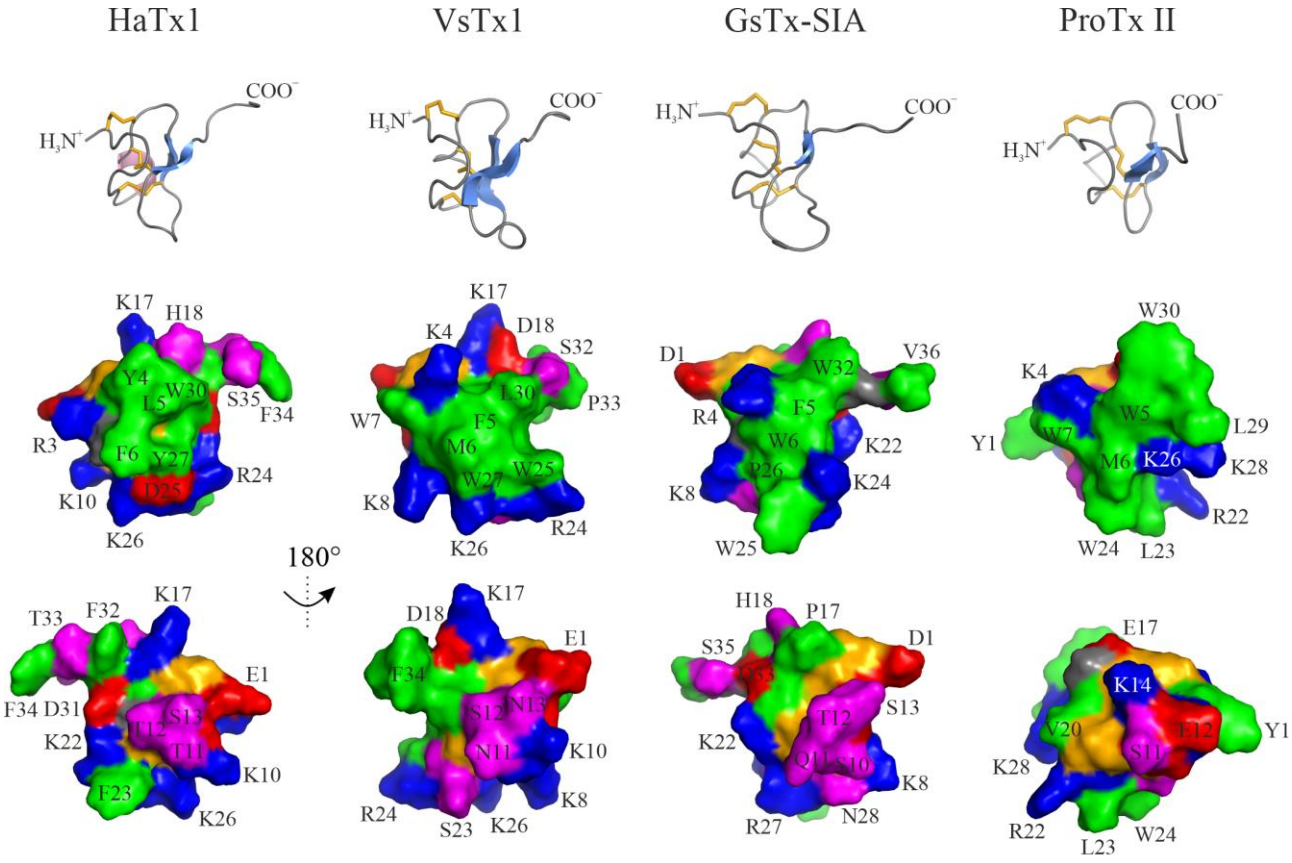
Источник	Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.	Литература
			1 5 10 15 20 25 30 35		
Grammostola rosea	HaTx1	P56852	--ECRYLFGGCK-TTSDCCK--HLGCKFRD--KYCAWDFTFS	35	(364)
	VsTx1	P60980	--ECGKFMWKCK-NSNDCCK--DLVCSSRW--KWCVLASPF	34	(368)
	GsTx-SIA	P60590	--DCVRFWGKCS-QTSDCCP--HLACKSKWPRNICVWDGSV-NH_2	36	(369)
	GsMTx-4	Q7YT39	--GCLEFWWKCNPNDDKCCR-PKLKCSKLF--KLCNFSF-NH_2	34	(370)
Psalmopoeus cambridgei	VaTx1	P0C244	-SECRWFMGGCD-STLDCCK--HLSCKMGL--YYCAWDGTF-NH_2	35	(371)
	VaTx3	P0C246	--ECRWYLGGCK-EDSECCE--HLQCHSYW--EWCLWDGSF-NH_2	34	
Stromatopelma calceatum griseipes	SGTx1	P56855	--TCRYLFGGCK-TTADCCK--HLACRSDG--KYCAWDGTF	34	(372)
Heteroscodra maculata	HmTx1	P60992	--ECRYLFGGCS-STSDCCK--HLSCRSDW--KYCAWDGTFS	35	(373)
Chilobrachys guangxiensis	JZTX-III	P62520	DGECGGFWWKCGRGKPPCCKG--YACSKTW--GWCAVEAP	36	(374)
	GxTx-1E	P84835	EGECGGFWWKCGSGKPACCP--KYVCSPKW--GLCNFPMP		(375)
	JZTX-IV	B1P1F4	--ECTKFLGGCS-EDSECCP--HLGCKDVL--YYCAWDGTF-NH_2	34	(376)
Poecilotheria vittata	PcaTX-1	C0HLN4	-AGCKYLFGSCK-EDSDCCK--HLGCRRKAP-QYCGWDGTF-NH_2	36	(377)
Poecilotheria metallica	Pme1a	P0DQO0	-GGCRYFLGGCS-EHSDCCE--HLRCKMGL--NYCAWDGTF-NH_2	35	(378)
Thrixopelma pruriens	ProTx I	P83480	--ECRYWLGGCS-AGQTCCK--HLVCSRRH--GWCVWDGTFS		(379)
	ProTx II	P83476	--YCQKWMWTCD-SERKCCEG--MVCRL-----WCKKKLW	30	
Paraphysa scrofa	PaTx1	P61230	--YCQKWMWTCD-SARKCCEG--LVCRL-----WCKKII-NH_2	29	(380)
	PaurTx 3	P84510	--DCLGFLWKCNPSNDKCCR-PNLVCSRKD--KWCKYQI	34	(381)
Cyriopagopus schmidti	HWTX-IV	P83303	--ECLEIFKACNPSNDQCCKSSKLVCSRKT--RWCKYQI-NH_2	35	(382)
Heteropoda venatoria	HpTx1	P58425	--DCGTIWHYCGTDQSECCEG--WKCSRQ----LCKYVIDW-NH_2	33	(383)

Сверху нумерация для HaTx1. В последовательность пептидов внесены разрывы для удобства сравнения. -NH_2, С-концевое амидирование. А.о. раскрашены в соответствии со свойствами: положительно заряженные (Arg, Lys) — синим, отрицательно заряженные (Asp, Glu) — красным, гидрофобные (Ala, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Tyr, Val) — зеленым, гидрофильные незаряженные (Asn, Gln, His, Ser, Thr) — малиновым, остатки глицина — серым, цистеина — выделены желтым. Критически важные а.о. для функции SGTx1, выявленные аланиновым сканированием (384), подчеркнуты.

Кроме того, HaTx1 и другие ингибиторы активации K^+ каналов из яда пауков-птицеедов обладают способностью взаимодействовать с липидными мембранами. Это свойство было продемонстрировано с использованием различных модельных систем, включая плоские липидные мембраны и липидные везикулы (липосомы) разного размера (гигантские, большие и малые) и состава (цвиттерионные и анионные) (385-389). Аффинность указанных токсинов к мембранам сопоставима с цитолитическими пептидами, а коэффициент распределения между фазами (K_p) лежит в пределах 0,1–100 × 10^3 M^{-1} (свободная энергия распределения от −5 до −9 ккал/моль) и сильно зависит от липидного состава. Мембранную активность связывают с амфифильной структурой токсинов и наличием на их поверхности гидрофобного кластера, который при ассоциации с мембранами погружается в их толщу (385, 390). На рисунке 10 хорошо видна локализация гидрофобных и гидрофильных а.о. на противоположных сторонах молекулы HaTx1, а также других сходных токсинов. Этот гидрофобный кластер формируется а.о., расположенными в петле между первым и вторым остатками цистеина, а также в С-концевой части молекулы вблизи последнего (шестого) остатка цистеина (см. таблицу 8). При этом он обычно окружен кольцом положительно заряженных а.о., которые при погружении гидрофобной части молекулы в мембрану оказываются удачно расположенными для эффективного взаимодействия с отрицательно заряженными остатками фосфорной кислоты фосфолипидов. Эти свойства сближают данную группу токсинов с цитолитическими пептидами (см. рисунок 3).

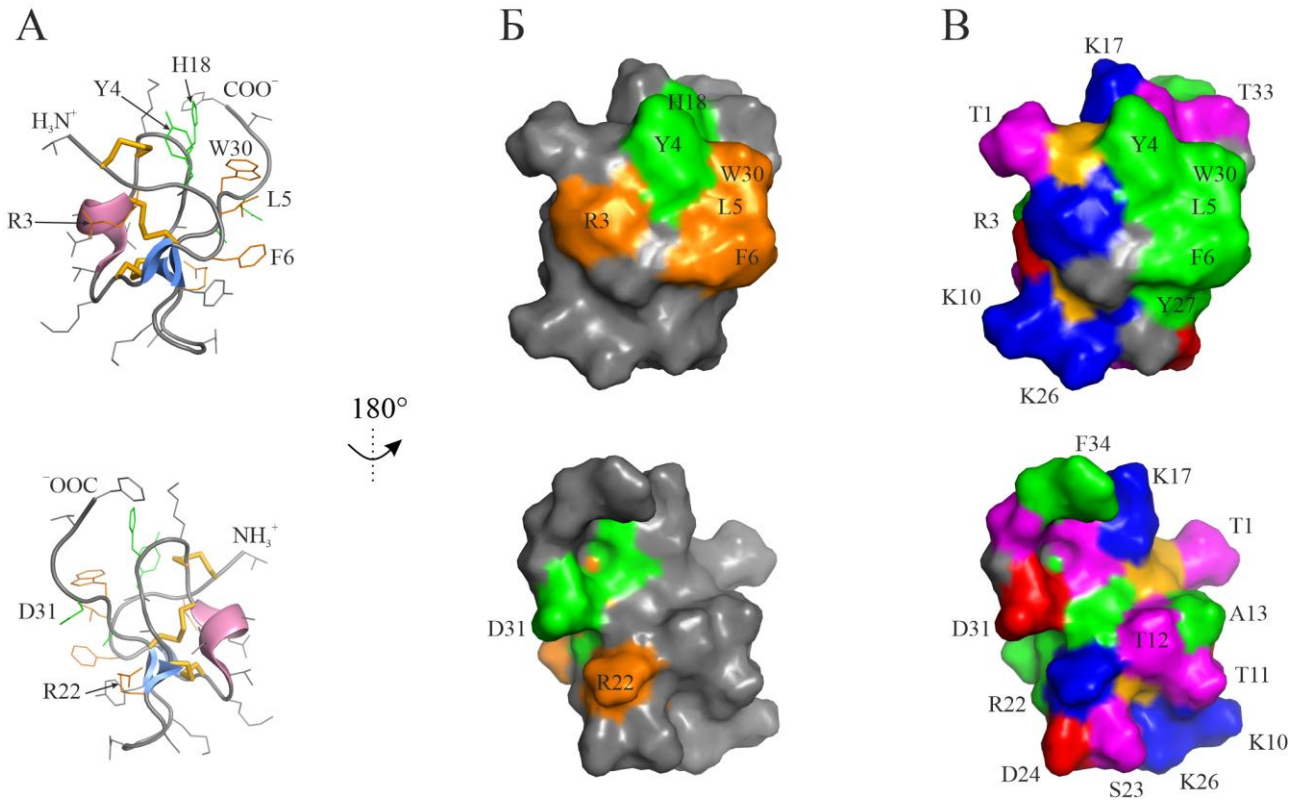
Для родственного HaTx1 токсина из яда африканского птицееда *Stromatopelma calceatum griseipes*, получившего название SGTx1 (P56855; 34 а.о., 3 S-S; см. таблицу 8) (372), был проведен сканирующий мутагенез: все а.о., за исключением цистеина и аланина, были по одному заменены на аланин (т.н. «аланиновое сканирование») (384). В результате были идентифицированы критически важные а.о. для активности SGTx1 против K_v2.1 (таблица 8, рисунок 11). Оказалось, что они расположены достаточно компактно на поверхности пептида и включают: (а) а.о. гидрофобного кластера и (б) положительно заряженные а.о., окружающие этот кластер. Таким образом, указанные нами выше характерные структурные признаки ингибиторов активации K_v являются функционально значимыми. Эти а.о. достаточно консервативны для всей группы, см. таблицу 8: по всей видимости, их положение в последовательности может отличаться на ±1 позицию у разных токсинов, при этом в пространстве гидрофобный кластер и окружающие его положительные заряды располагаются тоже немного по-разному по отношению к общему каркасу цистинового узла.

Рисунок 10. Пространственная структура модуляторов потенциал-чувствительных ионных каналов из яда пауков. Показаны структуры HaTx1 (PDB ID: 1D1H), VsTx1 (1S6X), GsTx-SIA (1KOZ) и ProTx II (2N9T). В верхнем ряду ленточные представления, указаны N- и C-концы цепей, дисульфидные мостики показаны желтым, спиральные участки — розовым, β-тяжи — голубым, петлевые участки — серым. В среднем и нижнем ряду показаны молекулярные поверхности пептидов, раскрашенные в соответствии со свойствами а.о. как в таблице 8.



Сайт-направленный мутагенез $K_v2.1$ позволил выявить а.о. канала, служащие сайтом взаимодействия с HaTx1. Оказалось, что токсин связывается с ПЧД канала в области α-спиральной шпильки S3-S4, а именно: с частями трансмембранных сегментов S3 и S4, приближенных к внеклеточной среде, и петлей между ними (рисунок 12) (391-393). В пространственной структуре канала данная область выступает из ПЧД и формирует так называемый «мотив весла» (англ. paddle motif) (394), своеобразную «горячую точку», с которой взаимодействуют многие токсины; аналогичная структура имеется в других потенциал-чувствительных ионных каналах, и здесь также связываются различные токсины (363, 395-397). Механизм действия ингибиторов активации K_v каналов из яда пауков описывают в терминах мембранного доступа или мембранного катализа: предполагается, что их аффинность к мембранам обеспечивает локальное концентрирование, а взаимодействие с K^+ каналами происходит вследствие латеральной диффузии вдоль мембран (при этом такое взаимодействие происходит уже не в объеме, а на плоскости) (398).

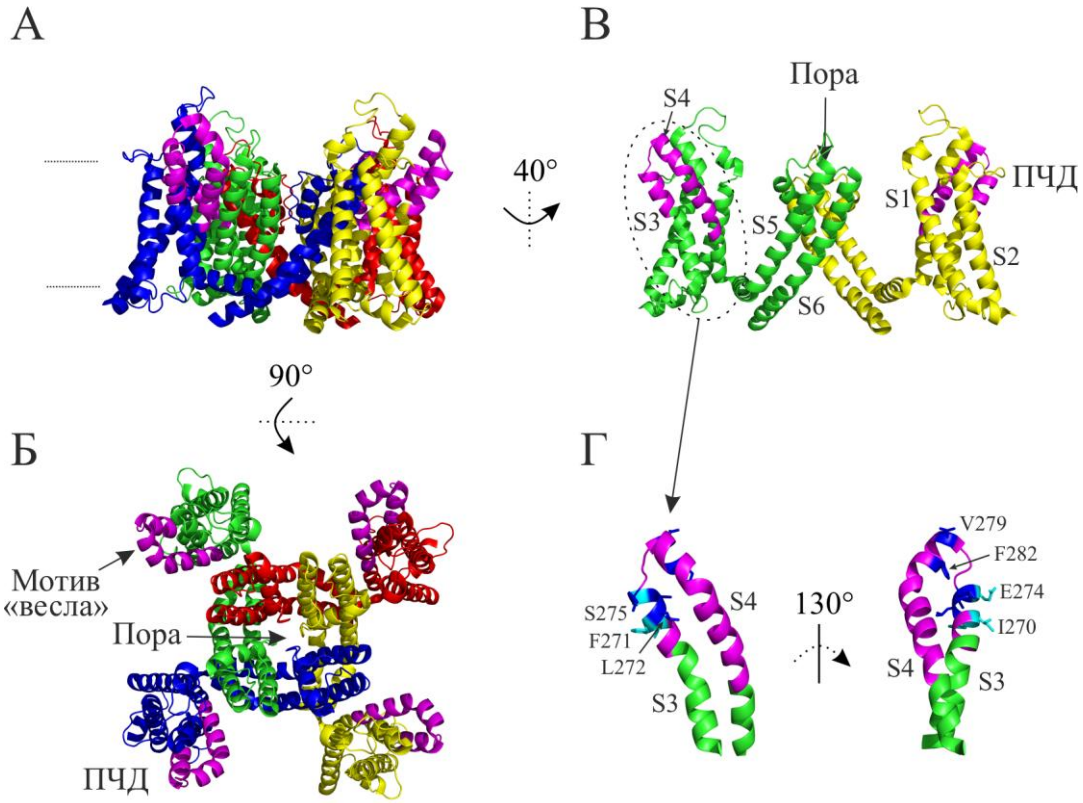
Рисунок 11. Локализация функционально важных остатков ингибитора активации K_v из яда паука. Показана структура SGTx1 (PDB ID: 1LA4), ориентация аналогично рисунку 10. (А) Ленточное представление, указаны N- и С-концы цепи, дисульфидные мостики показаны желтым, спиральные участки — розовым, β-тяжи — голубым, петлевые участки — серым. Боковые заместители показаны линиями и раскрашены: критически важные для активности токсина а.о. оранжевым, средней важности — зеленым, неважные — серым. (Б, В) Молекулярная поверхность пептида. Раскраска на (Б): поверхность критически важных а.о. оранжевая, средней важности — зеленая, неважных — серая; на (В) — в соответствии со свойствами а.о. как в таблице 8.



Среди ингибиторов активации K_v каналов из яда пауков редко находят высокоселективные соединения. Например, фриксотоксин 1 (PaTx1; P61230; 29 a.o., 3 S-S) из яда чилийского птицееда *Paraphysa scrofa* характеризуется высокой специфичностью к K_v4.2 и K_v4.3 (380). Обычно же им присущ «промискуитет» в отношении молекулярных мишеней: помимо K_v они зачастую воздействуют на другие белки, в частности Na_v и Ca_v, в сходных концентрациях (399-401). Кроме того, многие токсины пауков-птицеедов, воздействующие на Na_v и Ca_v, обладают аналогичной структурой (30–40 a.o., 3 S-S, ICK, амфифильность) и сходным механизмом действия (мембранная активность, взаимодействие с ПЧД, притом, как правило, с мотивом весла, и удерживание его в определенной конформации; см. ниже). К примеру, на рисунке 10 показаны ω-граммотоксин SIA (GsTx-SIA; P60590; 36 a.o., 3 S-S) из яда *G. rosea*, воздействующий на Ca_v (369), и протоксин-2 (ProTx II; P83476; 30 a.o., 3 S-S) из яда перуанского зеленого бархатистого птицееда *Thrixopelma pruriens*, подавляющего активацию Na_v

(379). Таким образом, мы имеем дело с большой группой токсинов, которые условно можно назвать «модуляторами воротных механизмов (англ. gating modifiers) потенциал-чувствительных ионных каналов из яда пауков».

Рисунок 12. Локализация сайта связывания ханатоксина 1 (HaTx1) с K^+ каналом. (А) Пространственная структура $K_v1.2$ крысы с заменой мотива весла на последовательность из $K_v2.1$ крысы (PDB ID: 2R9R) (349). Показана только мембранная часть белка, предполагаемое положение полярных головок липидов обозначено пунктирными отрезками слева. Мономеры окрашены разными цветами, мотивы весла во всех мономерах выделены малиновым. (Б) Вид «сверху», т.е. на плоскость мембраны со внеклеточной стороны. (В) Вид как на панели (А) с поворотом. Показаны два мономера, отмечено положение трансмембранных сегментов S1–6. (Г) Увеличенное изображение спиральной шпильки S3-S4. А.о., выявленные как важные для связывания HaTx1 с помощью аланинового сканирования, отмечены голубым (392), дополнительно с помощью лизинового сканирования — синим (393).



1.9.3. Другие токсины паукообразных, воздействующие на K^+ каналы

Разнообразие токсинов паукообразных, воздействующих на K^+ каналы, не ограничивается рассмотренными подробно двумя группами соединений. Важно понимать, что для целого ряда токсинов в настоящее время недостаточно данных, чтобы однозначно трактовать их специфичность или механизм действия.

В яде опасного австралийского воронкового паука *Hadronyche versuta* (Atracidae) обнаружены селективные модуляторы BK насекомых. Эти пептиды, названные J-атракотоксинами (J-ACTX) и впоследствии переименованные в κ-гексатоксины (или κ-

атракотоксины, при этом по современной номенклатуре их предлагают называть λ-гексатоксинами; многократное переименование вообще характерно для австралийских исследователей), проявляют высокую инсектицидную активность ($ЛД_{50} \approx 1$ мкг/г против домашних сверчков *Acheta domesticus*). В их структуре обнаружили необычную вицинальную дисульфидную связь (между соседними остатками цистеина), которая не играет важной структурной роли, однако необходима для функции токсинов: было показано, что при замене обоих цистеинов на серин укладка пептида κ-гексатоксина-Hv1c (κ-HXTX-Hv1c; P82228; 37 а.о., 4 S-S; PDB ID: 1DL0) не меняется (типичный ICK), однако активность теряется (402). Префикс "J" означает асимметрию расположения а.о. (от англ. Janus-faced, т.е. лики как у Януса): одна из сторон поверхности токсина гидрофобная, другая — гидрофильная с высоким содержанием заряженных а.о., это роднит κ-гексатоксины с описанными выше ингибиторами активации K_v из яда пауков-птицеедов.

Затем было убедительно продемонстрировано, что мишенью J-ACTX в организме насекомых являются BK каналы (они же мишень CTX); в качестве модели использовались выделенные нейроны из брюшного ганглия *P. americana* и BK каналы таракана, гены которых экспрессировали в клетках HEK293. При этом κ-HXTX-Hv1c селективно воздействовал именно на каналы насекомых: $IC_{50} \approx 2{,}5$ нМ в отношении BK в выделенных нейронах, ≈250 нМ против тех же каналов, экспрессированных в гетерологичной системе, и ≈10 мкМ по отношению к $K_{Ca}1.1$ мыши (403). Проведено аланиновое сканирование токсина κ-HXTX-Hv1c, и выявлены его критически важные а.о., однако установление молекулярных аспектов взаимодействия с каналами — дело будущего. По всей видимости, инсектицидная активность J-ACTX не есть следствие их воздействия на BK: дело в том, что другие блокаторы этих каналов, например CTX, подобными свойствами не обладают. Было показано, что κ-HXTX-Hv1c обладает свойствами положительного аллостерического модулятора nAChR в нейронах таракана, и предположено, что именно эти свойства обусловливают инсектицидную активность сродни другим инсектицидам (404). Однако эффективные концентрации в этих экспериментах составили сотни нМ, так что истинная мишень в организме насекомых, опосредующая летальные свойства токсина, может быть другой.

Из яда юго-восточноазиатского птицееда *Cyriopagopus schmidti* (Theraphosidae) был получен ингибитор трипсина хувентоксин-XI (HWTX-XI) с укладкой Кунитца как у δ-KTx и слабой ингибиторной активностью в отношении K_v (405). Изучена пространственная организация этого токсина, и с помощью мутагенеза картированы участки, необходимые для проявления обеих активностей. Оказалось, что а.о., необходимые для ингибирования трипсина, локализованы в том же петлевом участке, что у BPTI (316), принципиальное значение имеет консервативный остаток лизина, имеющийся в обоих соединениях. А.о., важные для ингиби-

рования K_v, расположены с другой стороны молекулы, там же, где у дендротоксинов (312). Однако в данном случае остаток лизина, у дендротоксинов взаимодействующий с порой канала, отсутствует, что, возможно, и объясняет слабую активность HWTX-XI. Предполагают, что J-ACTX и HWTX-XI относятся к поровым блокаторам K^+ каналов, однако достаточно убедительных данных не представлено.

Бразильскими исследователями сообщается, что токсин PnTx3-1 из яда паука *Ph. nigriventer* обладает способностью угнетать токи, опосредованные K^+ каналами А-типа, для которых свойственна быстрая инактивация (406). Однако активность не показана на индивидуальных изоформах каналов, а лишь на регистрируемых токах в опухолевых клетках, поэтому нельзя говорить об установленной специфичности и идентифицированной мишени этого токсина.

В литературе также имеются сообщения о токсинах-активаторах K^+ каналов из яда паукообразных. Однако большинство из них не вызывают доверия при внимательном прочтении. Например, эффективные концентрации хайнантоксина-1 (HNTX-I; D2Y1X7) из яда юго-восточноазиатского птицееда *Cyriopagopus hainanus* (Theraphosidae) в отношении $K_{Ca}3.1$ человека составляют десятки мкМ (407), в то время как против Na^+ каналов дрозофилы Para ($DmNa_v1$) $IC_{50} \approx 5$ мкМ (408). Селективность и механизм действия этого токсина мало изучены, и есть основания полагать, что наблюдаемые эффекты в отношении активации K^+ каналов связаны с его неспецифическим действием на мембраны в высокой концентрации. Яд скорпиона *A. australis* обладает активирующим действием в отношении K_v7 (409); это свойство приписывают укороченному на один N-концевой а.о. токсину AaTXK-β (P69939; β-KTx 1.2), утверждается, что полноразмерный токсин неактивен. Поскольку эти свойства не показаны на полипептидах, полученных встречным синтезом, а лишь на очищенных фракциях, велика вероятность артефактов.

1.10. Токсины, воздействующие на Na^+ каналы

Именно Na_v, наряду с nAChR, являются «излюбленной» мишенью природных токсинов, разнообразие таких соединений необычайно велико. Их можно классифицировать поразному: (1) по химическому строению выделяют две крупнейшие группы — низкомолекулярные соединения и (поли)пептиды; (2) по механизму действия — поровые блокаторы и разнообразные модуляторы воротных механизмов (активации и инактивации); (3) по сайту связывания с каналами (таблица 9). Таких рецепторных сайтов в настоящее время известно около 10, они пронумерованы в хронологическом порядке исследований. Токсины из яда паукообразных взаимодействуют с тремя: с сайтом 1 (входной вестибюль канала) связываются (немногочисленные) поровые блокаторы, с сайтами 3 (внеклеточная часть ПЧД IV) и 4 (аналогично в ПЧД II) — соответственно α и β-токсины скорпионов (α и β-NaTx), а также разнообразные модуляторы из яда пауков (410-412).

Таблица 9. Разнообразие лигандов Na_v.

Сайт	Лиганды	Химическое строение	Механизм действия
1	Тетродотоксин	Гуанидин-содержащее производное адамантана	Поровые блокаторы
	Сакситоксин	Гуанидин-содержащее производное пурина	
	μ-Конотоксины	Пептиды	
2	Батрахотоксин	Стероидные алкалоиды	Активаторы
	Вератридин		
	Аконитин	Дитерпеновый алкалоид	
	Граянотоксин	Циклический дитерпен	
3	α-NaTx	(Поли)пептиды	Ингибиторы инактивации
	Токсины морских анемон		
	δ-Токсины пауков		
4	β-NaTx		Потенциаторы активации
	Токсины пауков		Ингибиторы активации
5	Бреветоксины	Циклические полиэфиры	Активаторы
	Сигуатоксины		
(6)	δ-Конотоксины	Пептиды	Ингибиторы инактивации
(7)	Местные анестетики	Фенил-содержащие аминоэфиры и аминоамиды	Поровые блокаторы
	Антиаритмические препараты класса I	Разнообразные ароматические амины или амиды	
(8)	Пиретрины, пиретроиды	Эфиры хризантемовой кислоты	Активаторы
	ДДТ	Хлорорганическое соединение	

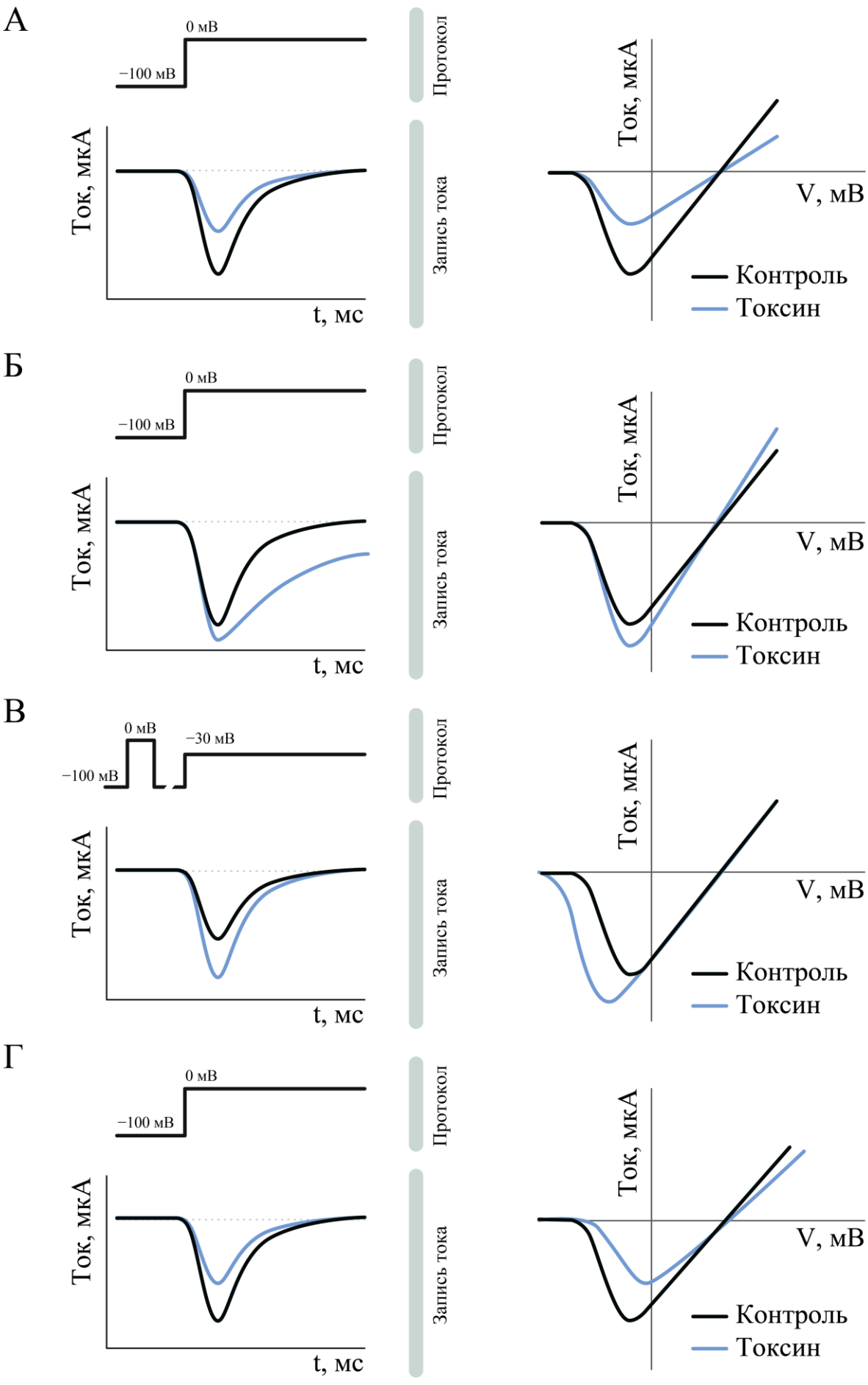
Сайты, обозначенные номерами в скобках, либо по современным представлениям существенно перекрываются / совпадают с другими, либо их нумерация не является общепринятой.

Отметим, что указанная сиситема сайтов устарела. С одной стороны, множатся примеры новых сайтов, и присвоение им новых порядковых номеров становится запутанным и неудобным. С другой стороны, структурные исследования уточняют локализацию сайтов, что необходимо влечет за собой изменение нумерации. Н. Янь (Университет Цинхуа, Китай) предложила новую систему, основанную на структурных данных (413). Время покажет, насколько эта система будет воспринята сообществом.

Если токсины, мишенью действия которых служат K^+ каналы, в подавляющем большинстве являются ингибиторами, то в случае лигандов Na_v имеет место широкое разнообразие (таблица 9). Так, в составе яда конусов обнаружены μ-конотоксины, поровые блокаторы Na_v, и δ-конотоксины, модулирующие воротные механизмы этих каналов (139). Главное оружие яда скорпионов — это модуляторы Na_v, относящиеся к двум большим группам: α-NaTx ингибируют быструю инактивацию каналов (40), а β-NaTx облегчают их активацию (414). Разнообразие же механизмов действия токсинов, обнаруженных в составе яда пауков, включает все перечисленные выше варианты и не ограничивается ими. На рисунке 13 показаны типичные следствия воздействия разных токсинов на Na_v: блок натриевого тока сродни аналогичному действию KTx на K^+ каналы (рисунок 6), а также облегчение или угнетение активации и ингибирование инактивации.

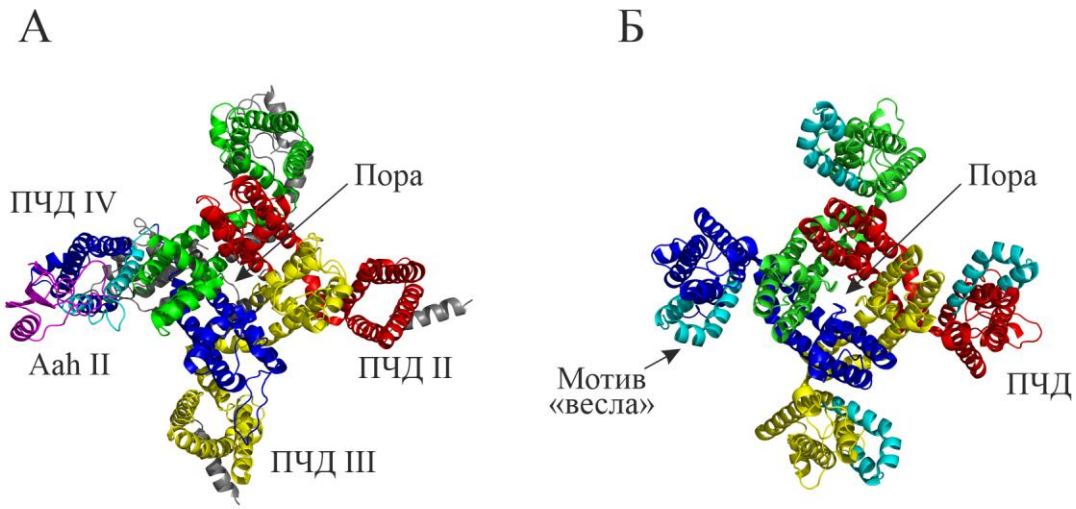
Сайт 1, с которым взаимодействуют поровые блокаторы Na_v, аналогичен сайту связывания поровых блокаторов K^+ каналов и формируется линкерами S5-S6 четырех гомологичных повторов Na_v, соответствующих отдельным субъединицам K^+ каналов. Сложнее дело обстоит с модуляторами воротных механизмов. Целый ряд экспериментов по мутагенезу выявил важнейшее значение внеклеточных петель ПЧД: повтора II в случае β-NaTx и повтора IV — для α-NaTx (415, 416). По аналогии с ингибиторами активации K_v из яда пауков, подробно рассмотренными выше, ученые из Национального института неврологических расстройств и инсульта (США) предположили, что важнейшим элементом во взаимодействии Na_v с токсинами так же служит мотив весла.

Рисунок 13. Разнообразие эффектов лигандов Na_v. Представлены схематические диаграммы, иллюстрирующие наиболее распространенные эффекты токсинов на биофизические свойства Na_v. Панели слева показывают графики зависимости тока от времени, справа — вольт-амперные характеристики. (А) Поровые блокаторы ингибируют ток путем физического перекрытия каналов. (Б) Токсины, такие как α-NaTx, δ-токсины пауков, замедляют быструю инактивацию. (В) β-NaTx вызывают сдвиг зависимости активации от напряжения в сторону гиперполяризации. (Г) Некоторые токсины пауков ингибируют пиковый ток, сдвигая зависимость активации от напряжения в сторону деполяризации.


А
0 мВ
−100 мВ
Протокол
Ток, мкА
t, мс
Запись тока
Ток, мкА
V, мВ
Контроль
Токсин
Б
0 мВ
−100 мВ
Протокол
Ток, мкА
t, мс
Запись тока
Ток, мкА
V, мВ
Контроль
Токсин
В
0 мВ
−30 мВ
−100 мВ
Протокол
Ток, мкА
t, мс
Запись тока
Ток, мкА
V, мВ
Контроль
Токсин
Г
0 мВ
−100 мВ
Протокол
Ток, мкА
t, мс
Запись тока
Ток, мкА
V, мВ
Контроль
Токсин

Значительный прогресс был достигнут благодаря работе, в которой получили химерные K^+ каналы с заменой мотива весла на соответствующие аминокислотные последовательности различных повторов Na_v (в частности, в качестве донора использовалась изоформа $Na_v1.2$ крысы, а в качестве реципиента — канал $K_v2.1$ человека). В результате были получены конструкты, по фармакологическим свойствам напоминающие отдельные ПЧД Na^+ каналов (схема на рисунке 14) (396). Оказалось, что классический α-токсин скорпиона Aah II действительно селективно воздействует на химерные каналы, где мотив весла был привнесен из ПЧД IV, классический β-токсин скорпиона Ts 1 аналогичным образом был селективен в отношении ПЧД II, но только в случае $Na_v1.4$, в то время как в каналах $Na_v1.2$ он связывался также с ПЧД III и IV. Необычное поведение Ts 1 было отмечено и другими исследователями: токсин воздействует как на активацию, так и на инактивацию ряда изоформ Na_v (417). Среди блокаторов активации Na_v из яда пауков были обнаружены как селективные в отношении конкретного ПЧД [например, PaurTx 3 из яда *P. scrofa* (P84510; 34 а.о., 3 S-S; см. таблицу 8) специфично распознавал ПЧД II], так и неселективные токсины (например, ProTx II воздействовал на ПЧД I, II и IV).

Рисунок 14. Система анализа селективности лигандов Na_v в отношении разных доменов. (А) Строение комплекса Na_v с токсином Aah II. Вид «сверху», как на рисунке 12Б. Гомологичные повторы канала окрашены разными цветами: I — зеленым, II — красным, III — желтым, IV — синим, а цитоплазматические линкеры и N- и C-концевые последовательности — серым. Токсин показан малиновым; участок ПЧД IV, пересаженный в K_v, выделен голубым. Протяженная петля S5-P ПД I не показана. [Для рисунка использовалась структура канала Na_vPaS, в котором ПЧД IV, а также части сегмента S5 и петли S5-P ПД I заменены на соответствующие последовательности канала $Na_v1.7$ человека, PDB ID: 6NT4 (418)]. (Б) Строение K_v с пересаженными участками из Na_v. Мономеры окрашены разными цветами; участки, замененные на последовательность из ПЧД IV Na_v, выделены голубым. [Для рисунка использовалась структура $K_v1.2$ крысы с заменой мотива весла на последовательность из $K_v2.1$ крысы, PDB ID: 2R9R (349)].



Как уже было отмечено выше, в яде скорпионов находят одни из наиболее эффективных модуляторов Na_v, образующих две большие группы: α и β-NaTx (39, 419). При этом первые характерны для яда скорпионов Старого Света, а вторые — Нового.

1.10.1. α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы

К α-NaTx относят токсины скорпионов, угнетающие процесс быстрой инактивации Na_v. Это небольшие белки (~65 а.о.) с мотивом CSα/β, содержащие четыре дисульфидных мостика с расположением C^1–C^8, C^2–C^5, C^3–C^6, C^4–C^7 (40). Традиционно α-NaTx делят на три группы в зависимости от их таксономической селективности: «млекотоксины», преимущественно влияющие на млекопитающих, «инсектотоксины», демонстрирующие высокую токсичность для насекомых, и «α-подобные токсины», влияющие как на млекопитающих, так и на насекомых (см. примеры в таблице 10) (420). Эта классификация не является строгой, поскольку инсектотоксины, например, способны убивать млекопитающих, хотя и в более высоких дозах.

К примеру, классический млекотоксин Aah II из яда *A. australis* (P01484; 64 а.о.) чрезвычайно токсичен для млекопитающих: $ЛД_{50}$ в отношении мышей составляет ≈25 нг/кг при внутримозговом (внутрижелудочковом) введении (i.c.v.) и ≈10 мкг/кг при подкожном (421). К насекомым его активность существенно ниже: $ЛД_{50}$ в отношении прусака *Blattella germanica* составляет ≈5 мкг/г. Классический инсектотоксин Lqh αIT из яда *L. q. hebraeus* (P17728; 66 а.о.), напротив, проявляет высокую токсичность к насекомым: $ЛД_{50}$ на *B. germanica* ≈ 20 нг/г; он гораздо менее токсичен при внутримозговом введении мышам, нежели млекотоксины: $ЛД_{50}$ ≈ 60 мкг/кг (i.c.v.); при подкожном введении токсичность сопоставима: $ЛД_{50}$ ≈ 60 мкг/кг (s.c.) (421, 422). Для хорошо изученного α-подобного токсина Lqh III из *L. q. hebraeus* (P56678; 67 а.о.) значения $ЛД_{50}$ такие: ≈2,5 мкг/кг (i.c.v.), ≈0,15 мг/кг (s.c.) для мышей, ≈0,2 мкг/г для *B. germanica* (423).

Приведенные летальные дозы находят отражение в действии токсинов на тканевом и молекулярном уровнях. Так, с помощью радиолигандного анализа показано, что млекотоксины обладают высокой аффинностью к синаптосомам мозга крысы [вытесняют радиоактивно-меченый Aah II в (суб)наномолярном диапазоне концентраций], а инсектотоксины — к мембранам ЦНС таракана *P. americana* (вытесняют радиоактивно-меченый Lqh αIT в субнаномолярном диапазоне концентраций) (421, 422). При этом α-подобные токсины не конкурируют с Aah II за сайт связывания на синаптосомах млекопитающих и показывают меньшую в сравнении с инсектотоксинами аффинность в отношении нейрональных мембран насекомых. В электрофизиологических экспериментах млекотоксины эффективно воздействуют на характерную для ЦНС млекопитающих изоформу $Na_v1.2$ (значения EC_{50} в наномоляр-

ном диапазоне), инсектотоксины — на Na_v насекомых; α-подобные токсины в среднем менее эффективны против Na_v насекомых в сравнении с инсектотоксинами и не эффективны против $Na_v1.2$, но сопоставимы по активности с млекотоксинами на других изоформах (420, 424, 425). Например, значения EC_{50}, полученные на канале крысы $rNa_v1.2$: Lqh II из *L. q. hebraeus* (относится к млекотоксинам; P59355; 64 а.о.), ≈20 нМ; Lqh αIT, ≈20 мкМ; для Lqh III не обнаружено активности при очень высоких концентрациях. На канале дрозофилы $DmNa_v1$: Lqh II, ≈3 мкМ; Lqh αIT, ≈0,3 нМ; Lqh III, ≈10 нМ (420). Важно, что активность α-NaTx в целом хорошо воспроизводима и реализуется как в условиях экспрессии Na_v в выбранной системе (например, в ооцитах *X. laevis* или клетках HEK293), так и на препаратах выделенных нейронов из соответствующих источников, хотя между разными системами могут наблюдаться различия в эффективности действия токсинов.

Среди α-NaTx, вдобавок к перечисленным группам по специфичности действия в отношении разных таксонов животных, находят соединения, проявляющие высокую селективность в отношении определенных изоформ Na_v млекопитающих. Например, α-подобный токсин OD1 из яда *Odontobuthus doriae* (P84646; 65 а.о.) селективно воздействует на изоформу $Na_v1.7$, характерную для чувствительных нейронов (426). Подкожная инъекция этого токсина грызунам вызывает болевую реакцию и используется как одна из животных моделей для поиска анальгетиков (427). А α-подобный токсин MeuNaTxα-2 из яда *M. eupeus* (P86403; 64 а.о.) из всех изоформ каналов млекопитающих воздействует только на $Na_v1.4$, характерную для скелетных мышц (428).

Многочисленные эксперименты, в которых с помощью мутагенеза меняли различные а.о. α-NaTx (429-437), а также получали химерные токсины с обширными вставками последовательности из одних на каркасе других (438, 439), показали, что за таксономическую селективность ответственны главным образом а.о., локализованные в N- и C-концевых областях (8–12 и 56–64 у Aah II; выделены полужирным шрифтом в таблице 10). Например, в структуре Aah II произвели замену а.о. 8–10 и 56–64 на соответствующие из Lqh αIT и получили сильный инсектотоксин, с высокой аффинностью связывающийся с каналами таракана (438). Аналогично замена тех же а.о. в составе Lqh αIT на таковые из Lqh II привела к получению млекотоксина, активного в отношении $Na_v1.2$ (в этом случае потребовалась еще замена в положении 15) (439). Для активности токсинов важны и другие а.о., которые могут непосредственно взаимодействовать с Na_v или влиять аллостерически.

Таблица 10. α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы.

Источник	Название	UniProt ID	Последовательность
			Млекотоксины
Androctonus australis	Aah I	P01479	KRDGYIVYPNNCVYHCVP----PCDGLCKKNGGSSGSCSFLVPSGLACWCKDLPDNVPIKDTSRKCT
	Aah II	P01484	VKDGYIVDDVNCTYFC--GRNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPDHVRTKGPG-RCH-NH_2
	Aah III	P01480	VRDGYIVDSKNCVYHCVP----PCDGLCKKNGAKSGSCGFLIPSGLACWCVALPDNVPIKDPSYKCHS
B. o. tunetanus[1]	Bot III	P01485	VKDGYIVDDRNCTYFC--GRNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKVPDHVRTKGPG-RCN-NH_2
L. q. hebraeus	Lqh II	P59355	IKDGYIVDDVNCTYFC--GRNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPDHVRTKGPG-RCR-NH_2
L. q. quinquestriatus[2]	Lqq V	P01481	LKDGYIVDDKNCTFFC--GRNAYCNDECKKKGGESGYCQWASPYGNACWCYKLPDRVSIKEKG-RCN-NH_2
			Инсектотоксины
B. o. tunetanus	Bot IT1	P55902	VRDAYIAQNYNCVYFC--MKDDYCNDLCTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYALPDNVPIRIPG-KCHS
	Bot XIV	Q17254	VRDGYIAQPHNCAYHCLKISS-GCDTLCKENGATSGHCGHKSGHGSACWCKDLPDKVGIIVHGEKCHR
Hottentotta judaicus	Bj αIT	Q56TT9	GRDAYIADNLNCAYTC--GSNSYCNTECTKNGAVSGYCQWLGKYGNACWCINLPDKVPIRIPG-ACR-NH_2
L. q. hebraeus	Lqh αIT	P17728	VRDAYIAKNYNCVYEC--FRDAYCNELCTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYALPDNVPIRVPG-KCHRK
L. q. quinquestriatus	Lqq III	P01487	VRDAYIAKNYNCVYEC--FRDSYCNDLCTKNGASSGYCQWAGKYGNACWCYALPDNVPIRVPG-KCH
M. martensii	BmK αIT1	Q9GQW3	VRDAYIAQNYNCVYHC--ARDAYCNELCTKNGAKSGSCPYLGEHKFACYCKDLPDNVPIRVPG-KCH
M. eupeus	MeuNaTxα-4	P86404	ARDAYIAKPHNCVYECFDAFSSYCNGVCTKNGAKSGYCQILGTYGNGCWCIVLPDNVPIRIPG-KCH
			α-Подобные токсины
Buthus occitanus mardochei	Bom III	P13488	GRDGYIAQPENCVYHCFPGSS-GCDTLCKEKGATSGHCGFLPGSGVACWCDNLPNKVPIVVGGEKCH
	Bom IV	P59354	GRDAYIAQPENCVYEC--AKNSYCNDLCTKNGAKSGYCQWLGKYGNACWCEDLPDNVPIRIPG-KCHF
L. q. hebraeus	Lqh III	P56678	VRDGYIAQPENCVYHCFPGSS-GCDTLCKEKGGTSGHCGFKVGHGLACWCNALPDNVGIIVEGEKCHS-NH_2
	Lqh VI	P59356	VRDGYIAQPENCVYHCIP----DCDTLCKDNGGTGGHCGFKLGHGIACWCNALPDNVGIIVDGVKCHK-NH_2
	Lqh VII	P59357	VRDGYIAKPENCAHHCFPGSS-GCDTLCKENGGTGGHCGFKVGHGTACWCNALPDKVGIIVDGVKCH
M. martensii	BmK M1	P45697	VRDAYIAKPHNCVYEC--ARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNGCWCIELPDNVPIRVPG-KCH
	BmK M7	P59854	VRDGYIALPHNCAYGC--LNNEYCNNLCTKDGAKIGYCNIVGKYGNACWCIQLPDNVPIRVPG-RCHPA
	BmK II	P59360	VRDAYIAKPHNCVYEC--ARNEYCNDLCTKDGAKSGYCQWVGKYGNGCWCIELPDNVPIRIPG-NCH
M. eupeus	MeuNaTxα-1	P86408	VRDGYIADDKNCAYFC--GRNAYCDEECKKKGAESGYCQWAGQYGNACWCYKLPDKVPIKVSG-KCN-NH_2
	MeuNaTxα-5	P86405	ARDAYIAKPHNCVYECFDAFSSYCNGVCTKNGAKSGYCQILGTYGNGCWCIALPDNVPIRIPG-KCH
Odontobuthus doriae	OD1	P84646	GVRDAYIADDKNCVYTC--ASNGYCNTECTKNGAESGYCQWIGRYGNACWCIKLPDEVPIRIPG-KCR-NH_2

В последовательности внесены разрывы для удобства сравнения. Остатки цистеина показаны на желтом фоне; а.о., составляющие NC/RC-домен, — на сером фоне. -NH_2, С-концевое амидирование. [1]*Buthus occitanus tunetanus*; [2]*Leiurus quinquestriatus* (подвид *quinquestriatus*).

Что касается эффекта в отношении Na_v, то α-NaTx характеризуются рядом особенностей (428, 440, 441). Во-первых, они вызывают замедление инактивации вплоть до полного ингибирования и появления неинактивируемого компонента (рисунок 13Б). Во-вторых, они могут значительно потенцировать натриевый ток. В-третьих, α-NaTx могут вызывать сдвиг зависимости т.н. «стационарной» инактивации Na_v (в ответ на продолжительную деполяризацию) от напряжения в сторону бóльших значений потенциала. При этом характер их действия зависит от конкретного токсина и канала, и могут наблюдаться различные комбинации и вариации перечисленных эффектов. В результате активности α-NaTx наблюдается усиление функции Na_v, что приводит к увеличению продолжительности потенциалов действия (441-443), а это, в свою очередь, ведет к нарушению нервной передачи или электрической активности мышц и спазму, судорогам, параличу.

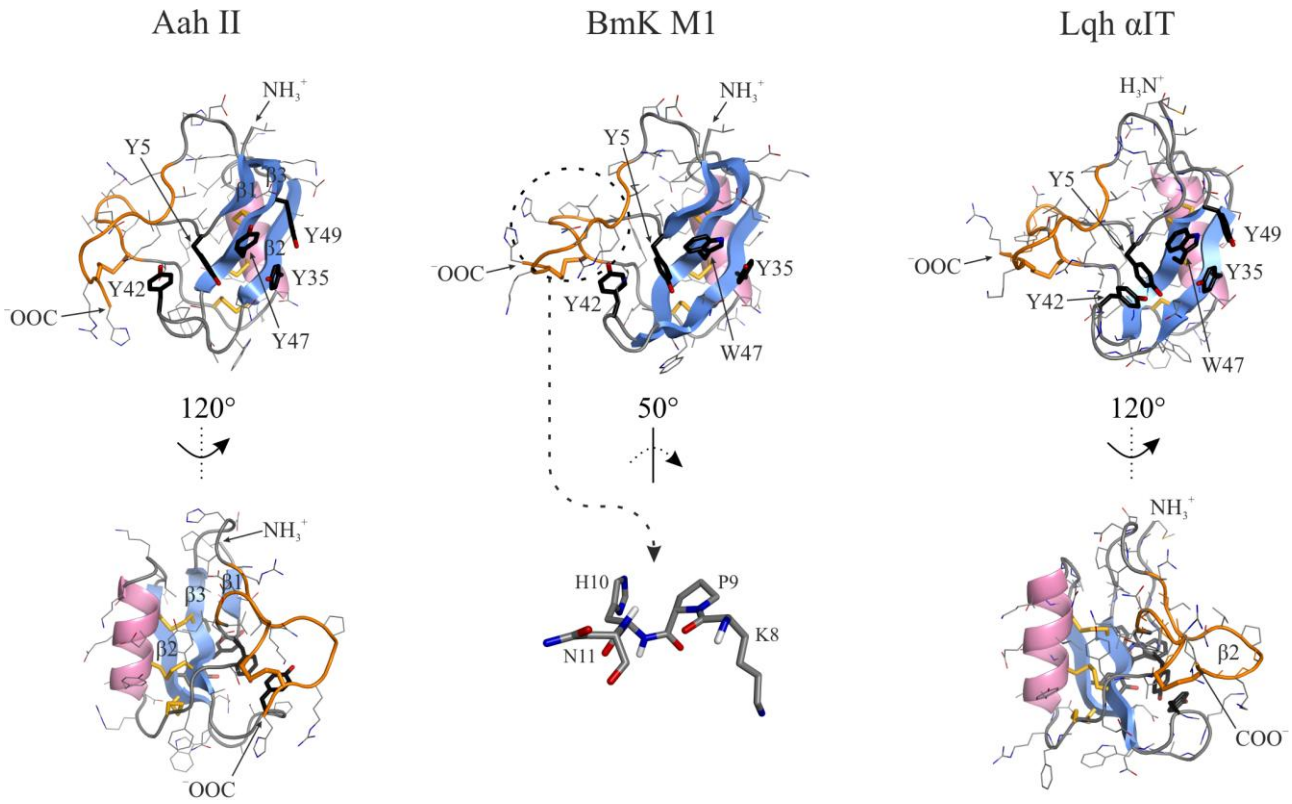
Впервые 3D структура α-NaTx была изучена на примере токсина BeM9 из яда *M. eupeus* (P09981; 66 а.о.), выделенного и исследованного под руководством Е.В. Гришина в ИБХ АН СССР (444, 445). Укладка α-NaTx представлена топологией βαββ, от других распространенных токсинов с мотивом CSα/β, а именно KTx, они отличаются существенно бóльшим размером (рисунок 5). В настоящее время изучена пространственная организация ≈20 α-NaTx, относящихся ко всем трем группам по специфичности действия (см. примеры на рисунке 15), и целого ряда их производных; большинство исследовались с помощью спектроскопии ЯМР, но имеются и кристаллические структуры.

Указанные выше области, ответственные за таксономическую селективность α-NaTx, сближены в пространстве и удерживаются дисульфидной связью (12–63 у Aah II; показаны оранжевым на рисунке 15). Вместе эти участки в литературе называют либо “NC”-доменом (включает N- и C-концевые области), либо “RC”-доменом (N-концевая область в пространстве формирует изгиб, в англоязычной литературе “reverse turn”, это “RT”-петля). Важно понимать при этом, что термин «домен» используется в данном случае не в строгом смысле и не является обозначением подлинного белкового домена, а лишь двух частей небольшого однодоменного белка. Такие дела.

Для специфичности важна не только аминокислотная последовательность, но также и характерная укладка NC/RC-домена, которая различается между группами α-NaTx. У многих α-подобных токсинов, к примеру, пептидная связь 9–10 (по нумерации BmK M1) присутствует в *цис*-конфигурации (рисунок 15) (434). Поскольку *цис*-конфигурация чрезвычайно не выгодна энергетически, она очень редко встречается в белках (≈0,3%) (446). Ее наличие часто не случайно и является следствием особой организации функционально важных участков. Исследователями из Института биофизики Китайской академии наук проведено детальное исследование структурных основ *цис-транс* изомеризации этой связи в BmK M1 (434). Ока-

залось, что принципиальным регулятором служит а.о. в положении 8: в случае, когда здесь расположен аспартат, как у млекотоксинов, конфигурация обращается, а активность сильно снижается (432).

Рисунок 15. Пространственная структура α-токсинов скорпионов, воздействующих на Na^+ каналы. Показаны структуры Aah II (PDB ID: 1PTX), BmK M1 (1SN1) и Lqh αIT (1LQH) в ленточном представлении. Указаны N- и C-концы цепей, дисульфидные мостики показаны желтым, спиральные участки — розовым, β-тяжи — голубым, петлевые участки — серым. Участки основной цепи и S-S-мостик NC/RC-домена выделены оранжевым. Боковые заместители показаны линиями, а.о. ароматического кластера — жирными черными линиями. Внизу для BmK M1 показан участок последовательности K8–N11 в скелетном представлении с атомами водорода основной цепи.



Остальную часть α-NaTx, включающую все элементы регулярной вторичной структуры и три S-S-мостика, называют сердцевиной (англ. core). β-Лист у α-NaTx состоит из трех антипараллельных β-тяжей (а.о. 2–4, 32–37 и 45–51 у Aah II; рисунок 15, ср.: рисунок 5); единственная α-спираль (а.о. 19–28 у Aah II) удерживается на центральном, но третьим по счету с N-конца β-тяже двумя S-S-связями (22–46 и 26–48 у Aah II; эти α-спираль и β-тяж параллельны). Еще одна дисульфидная связь (16–36 у Aah II) фиксирует положение петли, предшествующей α-спирали, относительно второго β-тяжа. Помимо остатков цистеина, формирующих S-S-связи, в сердцевину α-NaTx входят другие консервативные а.о., необходимые для правильного сворачивания и проявления биологической активности. Это гидрофобные

а.о., вместе с дисульфидами формирующие небольшое «ядро» молекулы (у Aah II: I6, Y14, Y21, L51, P52, V55), а также локализованные с противоположной стороны β-листа ароматические а.о., формирующие сеть стэкинг-взаимодействий (так называемый «ароматический кластер», у Aah II: Y5, Y35, Y42, Y47, Y49; показан черным на рисунке 15). Это также остатки глицина: G31 (по нумерации Aah II; у других токсинов чаще на один а.о. раньше), необходимый для инверсии хода полипептидной цепи между α-спиралью и β2; G34, единственный достаточно малый а.о., помещающийся между α-спиралью и β2; G43, необходимый для формирования изгиба в шпильке между β2 и β3. Кроме того, имеются консервативные пары заряженных а.о., формирующих солевые мостики: K2–D53 (по нумерации Aah II).

На примере BmK M1 была предпринята попытка анализа вклада отдельных дисульфидных связей в стабильность структуры и функциональную активность α-NaTx (447). Для этого были получены мутантные гены токсина с попарными заменами кодонов, кодирующих остатки цистеина, образующие S-S-мостики, на кодоны серина. Затем была проведена гетерологическая экспрессия этих генов в *E. coli*. Продуктов с заменой дисульфидов 22–46 и 26–48 (нумерация совпадает с Aah II) получить не удалось, соответствующие белки не синтезировались, на основании чего был сделан вывод о принципиальном значении этих S-S-мостиков (собственно образуют мотив CSα/β, скрепляя α-спираль и β-тяж) для стабильности α-токсинов. Два других продукта были получены, однако токсин с заменой третьей дисульфидной связи в сердцевине (16–36) оказался нестабильным. Единственный стабильный продукт — с заменой S-S-мостика в NC/RC-домене (12–63) — оказался неактивен. По данным спектроскопии кругового дихроизма (КД) его вторичная структура значительно отличается от исходного BmK M1, тем не менее, авторы делают вывод о преимущественном значении этого дисульфида для активности токсина, а не его общей укладки. Пожалуй, с учетом важных оговорок (отсутствие продукта экспрессии необязательно связано с утратой белком стабильной структуры, а данные КД прямо указывают на структурные изменения последнего производного) основные выводы авторов изложенной работы можно принять как наиболее вероятные.

Для локализации сайта связывания α-NaTx в Na_v (рецепторного сайта 3) был проведен мутагенез канала rNav1.2 с заменой а.о. во внеклеточных петлях. Оказалось, что остаток глутамата в петле S3-S4 ПЧД IV имеет принципиальное значение для связывания млекотоксинов, в частности Lqh II (415, 416). Другие а.о. этой петли также вносят вклад в аффинность α-NaTx; кроме того, важны а.о. других петель, а именно: S1-S2 ПЧД IV и S5-S6 ПД I. Наиболее наглядно это было продемонстрировано путем получения химерных каналов — заменой петель в одном на соответствующие последовательности другого. Замена петель S1-S2 и S3-S4 ПЧД IV, а также S5-S6 ПД I в канале $DmNa_v1$ на последовательности из $rNa_v1.2$ увеличила

аффинность Lqh II в ≈300 раз до сопоставимого с нативным каналом крысы уровня, при этом аффинность Lqh αIT упала в ≈650 раз (448). Пересадка петли S3-S4 из одних каналов в другие предсказуемо меняла аффинность α-NaTx различной специфичности (425). Двойной мутагенез токсина Lqh II и канала rNa_v1.2 позволил предположить сближенные при образовании комплекса а.о. и построить его модель: было предположено, что NC/RC-домен взаимодействует с линкерами S1-S2 ПЧД IV и S5-S6 ПД I, а шпилька β2-β3 встраивается в ПЧД IV и взаимодействует с петлей S3-S4 (448).

В 2019 г. международной группой исследователей, костяк которой составили сотрудники компании Genentech (США), опубликована структура комплекса Aah II с Na_v, изученная с помощью крио-ЭМ (PDB ID: 6NT4) (418). В этой работе использовали химерный канал: основу составлял канал таракана *P. americana* Na_vPaS, в нем были произведены замены ПЧД IV, а также частей сегмента S5 и петли S5-P ПД I на соответствующие последовательности канала Na_v1.7 человека. Таким образом, на каркасе канала таракана, который был ранее использован в структурных исследованиях (449), был реконструирован рецепторный сайт 3 канала человека.

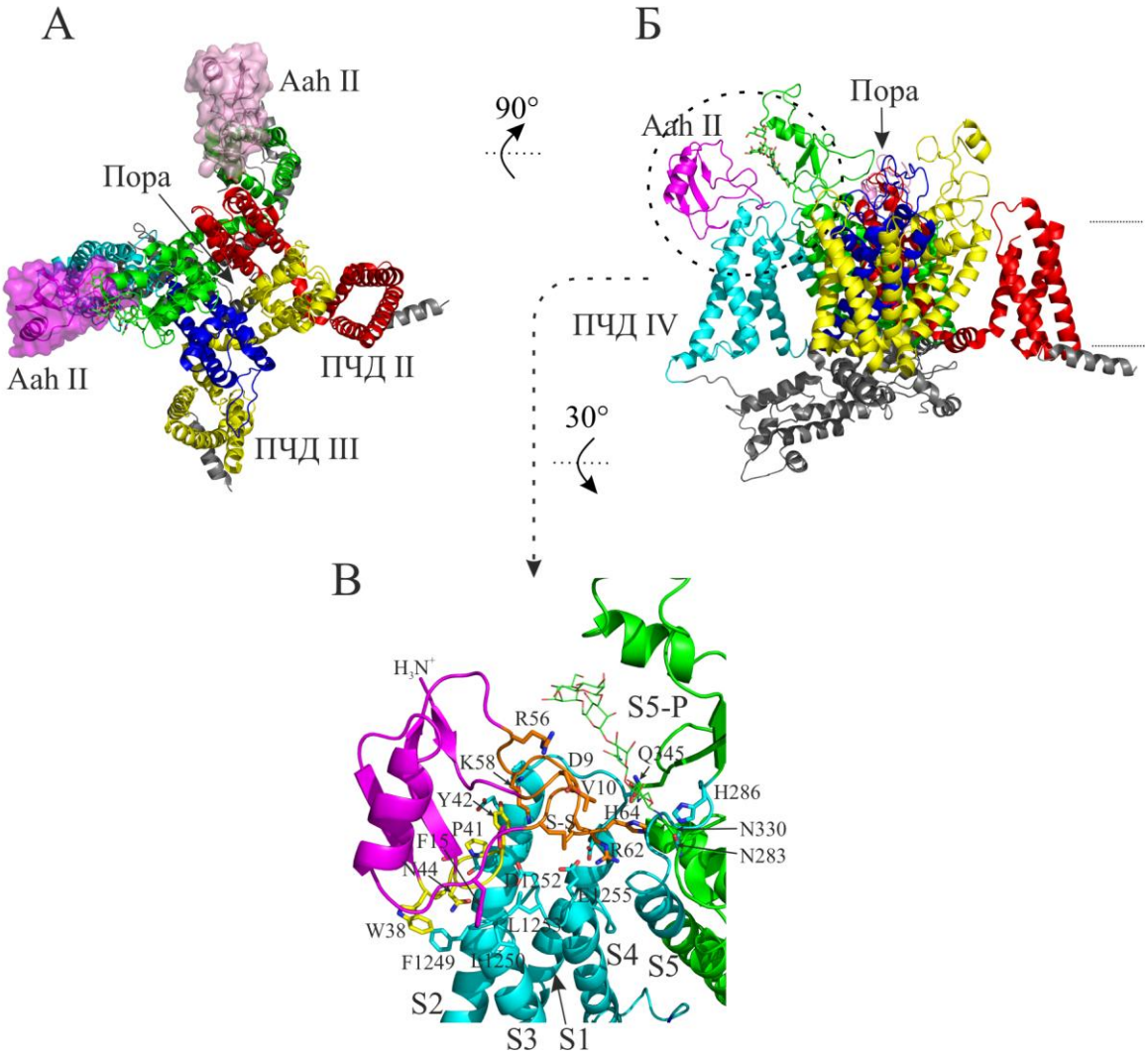
В основном полученная структура (рисунок 16) согласуется с моделями, которые строились ранее на основании биохимических данных (448). Молекула Aah II взаимодействует с ПЧД IV, формируя обширную поверхность контакта с внеклеточными частями шпилек S1-S2 и S3-S4. Токсин также взаимодействует с петлей S5-P ПД I. NC/RC-Домен принимает самое непосредственное участие во взаимодействии с каналом, формируя бóльшую часть контактной поверхности. В-частности, С-концевая область Aah II взаимодействует с S1-S2, S3-S4 ПЧД IV и S5-P ПД I: так, R62 формирует водородную связь с С-концом S5 и солевой мост с петлей S3-S4 (ключевым является именно заряд этого а.о., что показано многочисленными вариантами замен), а H64 образует сеть водородных связей с S5-S6 ПД I.

Важнейший результат заключается в том, что сенсор потенциала ПЧД IV в структуре комплекса находится в неактивированном положении (подробнее см. ниже в разделе «Токсины паукообразных как молекулярные инструменты исследования нервной системы»). Это наблюдение согласуется с другими данными, свидетельствующими в пользу функции ПЧД IV как триггера в процессе быстрой инактивации Na_v (450). Таким образом было наглядно продемонстрировано, что α-NaTx препятствуют инактивации каналов, удерживая ПЧД IV в неактивированном состоянии.

Стоит отметить и некоторые расхождения полученной структуры комплекса с ожиданиями. Во-первых, при взаимодействии с S5-S6 ПД I токсин контактирует прежде всего не с белком, а с гликаном (присоединен к остатку N330 Na_vPaS). Причем со стороны токсина в таком контакте участвуют а.о. петли 8–12, важнейшего элемента, определяющего специфич-

ность α-NaTx. Этот сайт N-гликозилирования является консервативным у Na_v, однако насколько полученный результат может быть распространен на все случаи связывания α-NaTx в настоящее время неизвестно. Ирония заключается в том, что у как раз у $Na_v1.7$ этого сайта нет, так что полученная структура может существенно отличаться от реального комплекса.

Рисунок 16. Комплекс Aah II с Na^+ каналом. (А) Ленточная модель комплекса Aah II с каналом Na_vPaS, в котором ПЧД IV, а также части сегмента S5 и петли S5-P ПД I заменены на соответствующие последовательности канала $Na_v1.7$ человека (PDB ID: 6NT4) (418). Показан вид «сверху», как на рисунке 14. Молекулы Aah II выделены малиновым (взаимодействует с ПЧД IV) и розовым (с ПЧД I) и показаны в виде ленточных моделей, окруженных полупрозрачной поверхностью. (Б) Вид «сбоку», т.е. со стороны толщи мембраны; предполагаемое положение полярных головок липидов обозначено пунктирными отрезками справа. Гомологичные повторы канала окрашены разными цветами как на рисунке 14А; участки $Na_v1.7$ выделены голубым. N-Гликан, присоединенный к N330 (S5-P ПД I), показан линиями. (В) Вид как на панели (Б) с поворотом и увеличением, показаны ПЧД IV (обозначены сегменты S1–4) и ПД I (обозначены сегмент S5 и петля S5-P). Боковые цепи взаимодействующих а.о. токсина и канала, а также S-S-мостик 12–63 показаны линиями; NC/RC-домен токсина окрашен оранжевым, петля β2-β3 — желтым.



Во-вторых, в изученной структуре комплекса присутствует еще одна молекула Aah II, связанная с ПЧД I похожим на ПЧД IV образом. Плотность в этой области структуры ниже, чем в основном сайте связывания, что говорит о сравнительно низкой аффинности. Здесь важно помнить, что в рассматриваемой структуре ПЧД I принадлежит каналу таракана Na_vPaS. Для проверки возможной значимости обнаруженного второго сайта были проведены электрофизиологические эксперименты на канале $BgNa_v1$ другого таракана — *B. germanica*: дело в том, что в настоящее время не удалось добиться функциональной экспрессии канала Na_vPaS. При воздействии на этот канал Aah II в концентрации 0,5 мкМ оказывает двойной эффект: происходит ингибирование быстрой инактивации, а также сравнительно медленно развивающееся (в течение десятков мс) подавление амплитуды тока (418). Если в канал $BgNa_v1$ ввести замену D1670R в ПЧД IV, то пропадает эффект токсина на быструю инактивацию, аналогичная замена D220R в ПЧД I, напротив, приводит к исчезновению эффекта на амплитуду тока. Важно помнить однако, что Aah II — классический млекотоксин, поэтому данный результат может не иметь биологического значения.

В 2021 г. вышла вторая статья, описывающая структуру комплекса Na_v и α-NaTx, изученную с помощью крио-ЭМ. В этом случае использовался несколько укороченный, но вполне функциональный канал $Na_v1.5$ из сердца крысы и α-подобный токсин Lqh III из яда *L. q. hebraeus* (см. аминокислотную последовательность в таблице 10) (451). В целом, выводы этой работы аналогичны: токсин взаимодействует с петлями S1-S1 и S3-S4, сенсор потенциала оказывается в положении down; однако в деталях две описанные структуры различаются. Lqh III связывается только с ПЧД IV $Na_v1.5$, что согласуется с биохимическими данными о специфичности α-NaTx. Однако предложенное положение токсина в комплексе менее ожидаемо: N-концевая часть NC/RC-домена (RT-петля) в данном случае не контактирует с каналом, и практически не наблюдается взаимодействий с ПД I. Более того, участок, соединяющий RT-петлю с α-спиралью, глубоко погружается в мембрану — обстоятельство, не замеченное авторами статьи. Можно предложить несколько причин этих различий: (а) разрешение полученных структур (у второй только ≈4–5 Å в области токсина) недостаточно высокое; (б) условия структурных экспериментов далеки от нативных и не показывают реальную картину; (в) детали взаимодействия α-NaTx с разными Na_v действительно могут существенно различаться. В последнем случае можно предполагать, что для образования комплекса α-NaTx и $Na_v1.5$ существенную роль играют липиды — как для токсинов пауков-модуляторов воротных механизмов ионных каналов (подробнее см. ниже в разделе «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков»).

Стоит отметить, что в обеих изученных с помощью крио-ЭМ структурах протяженную область контакта с каналом формируют а.о., расположенные в шпильке β2-β3: они

взаимодействуют со шпильками S1-S2 и S3-S4. Так, N44 формирует водородную связь с С-концом S3, а W38 образует обширные ван-дер-ваальсовы контакты с а.о. канала. Это наблюдение согласуется с нашей гипотезой о важной роли данной части молекулы α-NaTx (см. далее в Результатах, раздел «α-Токсины скорпионов, ингибирующие инактивацию Na^+ каналов»).

1.10.2. β-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы

К β-NaTx относят токсины скорпионов, облегчающие процесс активации Na_v. Аналогично α-NaTx, это небольшие белки (~60–75 а.о.) с мотивом CSα/β, содержащие четыре дисульфидных мостика (расположение у большинства такое же: C^1–C^8, C^2–C^5, C^3–C^6, C^4–C^7 — и отличается только у одной группы, см. ниже) (414). Традиционно β-NaTx делят на четыре группы в зависимости от их таксономической селективности и картины воздействия на мишень: млекотоксины, преимущественно влияющие на млекопитающих (эти токсины наиболее характерны для яда скорпионов Нового Света), «возбуждающие» (англ. excitatory) и «угнетающие» (англ. depressant) инсектотоксины, демонстрирующие высокую токсичность для насекомых, и токсины, влияющие как на млекопитающих, так и на насекомых (см. примеры в таблице 11).

Так, классические млекотоксины Cn2 из яда *C. noxius* (P01495; 66 а.о.) или Css2 из *Centruroides suffusus suffusus* (P08900; 66 а.о.) чрезвычайно токсичны для млекопитающих: $ЛД_{50}$ в отношении мышей составляет ≈15–25 мкг/кг при внутрибрюшинном (i.p.) или подкожном введении (452, 453). При этом млекотоксины практически не опасны для насекомых: к примеру, Css2 неактивен на личинках мясной мухи *Sarcophaga barbata* (в различных статьях даже одних авторов зачастую указываются разные виды, при этом скорей всего имеется в виду один и тот же, систематика мясных мух менялась неоднократно, а исследователи, работающие с ядами, не профессионалы в этой области) в дозах до 20 мкг/г. Возбуждающие инсектотоксины, например Aah IT1 из *A. australis* (P01497; 70 а.о.) и Bj-xtrIT из *H. judaicus* (P56637; 76 а.о.), и угнетающие инсектотоксины, например Lqh IT2 из *L. q. hebraeus* (Q26292; 61 а.о.), напротив, проявляют высокую токсичность против насекомых: доза, вызывающая паралич у 50% испытуемых ($ПД_{50}$) и определяемая особой методикой (454), в отношении личинок *S. barbata* составляет ≈0,15–0,2 мкг/г (455, 456). Инсектотоксины не опасны для млекопитающих: так, Aah IT1 не проявляет активности на мышах даже в очень больших дозах (50 мг/кг, s.c.; 2,5 мг/кг, i.c.v.) (452). Наконец, β-токсин смешанного действия Ts 1 (в литературе называется также Ts VII или Ts γ; P15226; 61 а.о.) из яда *T. serrulatus* проявляет сопоставимую токсичность в отношении мышей ($ЛД_{50}$ ≈ 0,25 мг/кг, s.c.) и личинок *S. barbata* ($ПД_{50}$ ≈ 0,5 мкг/г) (452).

Как и в случае α-NaTx (см. выше), приведенные летальные дозы находят отражение в действии β-NaTx на тканевом и молекулярном уровнях. Так, с помощью радиолигандного анализа показано, что млекотоксины показывают высокую [(суб)наномолярную] аффинность к синаптосомам мозга крысы, а инсектотоксины — к препаратам нейрональных мембран насекомых, при этом млекотоксины не связываются с препаратами насекомых, а инсектотоксины — с синаптосомами млекопитающих даже в микромолярных концентрациях (419, 457); токсины смешанного действия способны связываться и конкурировать со специфичными токсинами в обоих случаях (452).

Эффект β-NaTx проявляется в сдвиге зависимости активации Na_v от потенциала в сторону меньших значений (рисунок 13В); при насыщающих (микромолярных) концентрациях токсина характерная величина потенциала полумаксимальной активации каналов ($V_{1/2,Na}$) сдвигается в сторону отрицательных значений на ≈30 мВ до ≈ −70 мВ, т.е. Na_v приобретают способность активироваться даже при потенциале покоя (458). По действию на каналы β-NaTx можно отнести к активаторам: действительно, *in vivo*, например в теле жертвы, они способны вызвать активацию Na_v и привести к спонтанной генерации потенциала действия. Важно, что эффект некоторых β-NaTx проявляется только после предварительной активации Na_v в присутствии токсина, т.е. необходима первоначальная деполяризация мембраны, иначе действие β-NaTx не выявляется (458, 459).

Интересно, что при аналогичном молекулярном механизме действия на мишень две группы инсектотоксинов различаются физиологическим эффектом: возбуждающие инсектотоксины вызывают спастический паралич за счет непроизвольной активности мотонейронов, а угнетающие инсектотоксины приводят к вялому параличу — они подавляют вызванные потенциалы действия ввиду сильной деполяризации аксональной мембраны (414). Эти токсины, по-видимому, различаются селективностью в отношении Na_v насекомых: угнетающие инсектотоксины полностью вытесняют возбуждающие инсектотоксины со специфических сайтов в синаптосомах азиатской саранчи *Locusta migratoria* и таракана *P. americana* (457, 460, 461), в то время как возбуждающие инсектотоксины вытесняют угнетающие инсектотоксины только из высокоаффинных сайтов в этих препаратах, в случае синаптосом мух *S. barbata* их аффинность к сайтам угнетающих токсинов существенно снижена, а на препаратах личинок египетской хлопковой совки *Spodoptera littoralis* они вообще не конкурируют за такие сайты (462).

Таблица 11. β-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы.

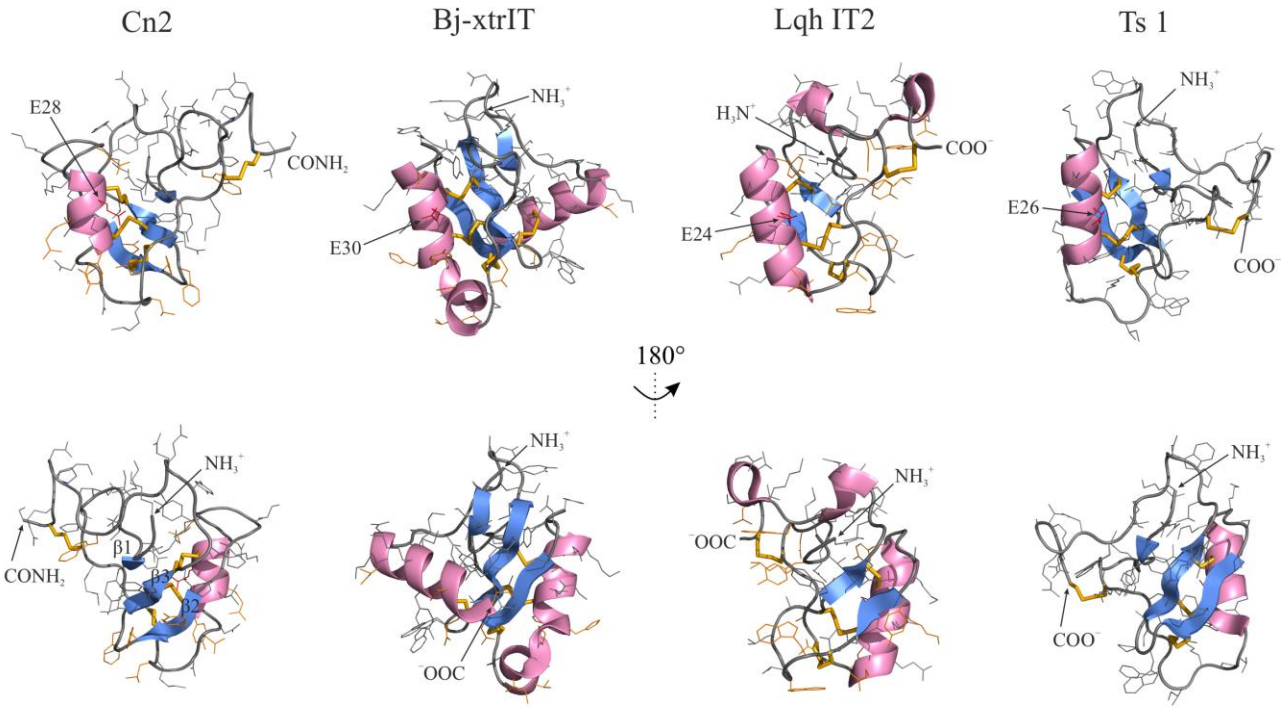
Источник	Название	UniProt ID	Последовательность
			Млекотоксины
C. noxius	Cn2	P01495	KEGYLVDKNTGCKYECLKL--GDNDYCLRECKQQYGKGAGGYCYAF--ACWCTHLYEQAIVWPLPNKRCS-NH_2
Centruroides suffusus suffusus	Css2	P08900	KEGYLVSKSTGCKYECLKL--GDNDYCLRECKQQYGKSSGGYCYAF--ACWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN-NH_2
	Css4	P60266	KEGYLVNSYTGCKFECFKL--GDNDYCLRECRQQYGKGSGGYCYAF--GCWCTHLYEQAVVWPLPNKTCN-NH_2
			Возбуждающие инсектотоксины
A. australis	Aah IT1	P01497	KKNGYAVDSSGKAPECLLSN-----YCNNECTKVHYADK-GYCCL--LSCYCFGLNDDKKVLEISDTRKSYCDTTIIN
L. q. quinquestriatus	Lqq IT1	P19856	KKNGYAVDSSGKAPECLLSN-----YCYNECTKVHYADK-GYCCL--LSCYCVGLSDDKKVLEISDARKKYCDFVTIN
M. martensii	BmK IT-AP	O77091	KKNGYAVDSSGKVAECLFNN-----YCNNECTKVYYADK-GYCCL--LKCYCFGLADDKPVLDIWDSTKNYCDVQIIDLS
H. judaicus	Bj-xtrIT	Q56TT9	KKNGYPLDRNGKTTECSGVNAIAPHYCNSECTKVYYAES-GYCCW--GACYCFGLEDDKPIGPMKDITKKYCDVQIIPS
			Угнетающие инсектотоксины
Buthacus arenicola	Ba IT2	P80962	-DGYI-RRRDGCKVSCL---FGNEG-CDKECK-AYG-GSYGYCWTWGLACWCEGLPDD-KTWKSETNTCG
B. o. tunetanus	Bot IT2	P59863	-DGYI-KGYKGCKITCV---INDD-YCDTECK-AEG-GTYGYCWKWGLACWCEDLPDE-KRWKSETNTC
H. judaicus	Bj IT2	P24336	-DGYI-RKKDGCKVSCI---IGNEG-CRKECV-AHG-GSFGYCWTWGLACWCENLPD-AVTWKSSTNTCG
L. q. hebraeus	Lqh IT2	Q26292	-DGYI-KRRDGCKVACL---IGNEG-CDKECK-AYG-GSYGYCWTWGLACWCEGLPDD-KTWKSETNTCG-NH_2
L. q. quinquestriatus	Lqq IT2	P19855	-DGYI-RKRDGCKLSCL---FGNEG-CNKECK-SYG-GSYGYCWTWGLACWCEGLPDD-KTWKSETNTCG
			β-Токсины смешанного действия
L. q. hebraeus	Lqh β1	P0C5H3	DNGYLLNKATGCKVWCV---I-NNASCNSECK--LRRGNYGYCYFWKLACYCEGAPKS-ELWAYATNKCNGKL
Tityus serrulatus	Ts 1	P15226	KEGYLMD-HEGCKLSCF---IRPSGYCGREC--GIKKGSSGYC-AW-PACYCYGLPNWVKVWDRATNKC-NH_2
Tityus zulianus	Tz 1	Q2NME3	KDGYLV-GNDGCKYSCF---TRPGTYCANECSR-VK-GKDGYCYAW-MACYCYSMPNWVKTWDRATNRCGR-NH_2

В последовательности внесены разрывы для удобства сравнения. Остатки цистеина показаны на желтом фоне. Консервативный функционально важный остаток глутаминовой кислоты (E28 по нумерации Cn2) выделен красным. -NH_2, С-концевое амидирование.

Аналогично α-NaTx, среди β-NaTx находят проявляющие высокую селективность в отношении определенных изоформ Na_v млекопитающих. Например, токсин Tf2 из яда *Tityus fasciolatus* (C0HJM9; 62 а.о.), относящийся к группе токсинов смешанного действия, проявляет селективность к изоформе $Na_v1.3$, специфические функции которой плохо изучены (463).

3D структура β-NaTx была впервые изучена для двух токсинов из яда *Centruroides sculpturatus* — т.н. «вариантов 2 и 3» (464). Важно отметить, и это касается многих других случаев, что в литературе имеет место путаница относительно аминокислотной последовательности и механизма действия этих токсинов. По-видимому, одна из причин, быть может, главная, кроется в недостатках экспериментальных методов исследования в 1970–80-х гг. по сравнению с настоящим временем; кроме того, разные коллективы могли использовать яд, полученный от разных подвидов скорпиона, а при этом называть изоформы токсинов одинаково. В настоящее время изучена пространственная организация ≈15 β-NaTx, относящихся ко всем трем группам по специфичности действия (см. примеры на рисунке 17).

Рисунок 17. Пространственная структура β-токсинов скорпионов, воздействующих на Na^+ каналы. Показаны структуры Cn2 (PDB ID: 1CN2), Bj-xtrIT (4KYP), Lqh IT2 (2I61) и Ts 1 (1NPI) в ленточном представлении. Указаны N- и C-концы цепей, дисульфидные мостики показаны желтым, спиральные участки — розовым, β-тяжи — голубым, петлевые участки — серым. Боковые заместители показаны линиями; функционально важные а.о. по данным мутагенеза окрашены оранжевым (в структуре Cn2 выделены а.о., соответствующие Css4), инвариантный остаток глутаминовой кислоты в α-спирали — красным.



Аланиновое сканирование или же замена а.о. на другие помимо аланина — были выполнены для млекотоксина Css4 из яда *C. s. suffusus* (P60266; 66 а.о.) (465), возбуждающего инсектотоксина Bj-xtrIT из *H. judaicus* (466) и угнетающего инсектотоксина Lqh IT2 из *L. q. hebraeus* (456) (аминокислотные последовательности см. в таблице 11). Функционально значимые а.о. в разных работах определяли по-разному: (а) в случае Css4 такими а.о. считали те, мутация которых приводит к изменению аффинности токсина (определяемой радиолигандным анализом) в 10 и более раз (изменение свободной энергии связывания на 1,3 ккал/моль и более) (465); (б) в случае Bj-xtrIT порог приняли выше — в 30 раз (466); (в) наконец, для Lqh IT2 такой величины вообще не приводится, внимательный анализ публикации показывает, что она составляла ×20 раз, но не все а.о., подходящие по этому критерию, были в итоге названы важными, и авторы никак не объясняли свой выбор (456).

Функционально важные а.о. у β-NaTx локализованы отличным от α-NaTx образом (ср.: рисунки 15 и 17); кроме того, наблюдается значительная вариабельность между группами по селективности (оранжевые а.о. на рисунке 17). Общие для всех групп важные а.о. располагаются в α-спирали и предшествующей ей петле; предполагается, что именно этой частью токсины связываются с сенсором потенциала каналов (см. ниже). Здесь расположен инвариантный для всех β-NaTx остаток E28 (по нумерации Cn2; выделен красным на рисунке 17); наибольшее снижение аффинности отмечается при его замене на положительно заряженный а.о., поэтому считали, что он формирует солевой мост с положительно заряженным а.о. сенсора. Для Css4 и Lqh IT2 важны а.о. во втором β-тяже и петле β2-β3, пространственно сближенные с указанными выше функциональными частями токсинов. Кроме того, у всех трех мутированных β-NaTx важные а.о. находятся также в С-концевой области. Особенно в этом смысле выделяется Bj-xtrIT, у которого здесь имеется еще одна α-спираль; этой характерной особенности возбуждающих инсектотоксинов приписывают важную роль во взаимодействии с Na_v насекомых (467).

В 1998 г. французскими и американскими исследователями была предложена модель действия β-NaTx, которая актуальна и сегодня, — модель «захвата сенсора потенциала», она подразумевает, что токсин представляет собой «ловушку» для сенсора потенциала ПЧД II. Согласно этой модели β-NaTx связываются с Na_v и «ждут» их активации. При деполяризации мембраны положительно заряженный сенсор потенциала движется во внеклеточную сторону и оказывается «захваченным» связанным с каналом токсином, который стабилизирует активированное положение сенсора. В результате последующая активация канала оказывается облегченной, поскольку один сенсор потенциала уже находится в активированном состоянии, что проявляется в сдвиге порогового потенциала активации Na_v (458). Эта модель согласуется с большим массивом данных, полученных к настоящему времени:

(а) прежде всего, как было сказано выше, для проявления активности β-NaTx необходима предварительная активация Na_v;

(б) активность токсинов снижается при продолжительной гиперполяризации мембраны, поскольку повышается вероятность возвращения сенсора в неактивированное положение;

(в) при приложении токсина кривая зависимости активации Na_v от потенциала хорошо описывается суммой двух функций; одна соответствует популяции немодифицированных каналов, другая — каналам в комплексе с токсином и «захваченным» сенсором, у этих популяций различаются $V_{1/2,Na}$;

(г) если реакция первого этапа (связывание с каналами) зависит от концентрации токсина, то второй этап (захват сенсора) — нет (468);

(д) β-NaTx также могут вызывать небольшое снижение пиковой амплитуды тока, по-видимому, за счет стабилизации частично активированных каналов, повышая вероятность стационарной инактивации Na_v — инактивированные каналы не открываются при повторной стимуляции, что и выражается в снижении амплитуды тока;

(е) указанный эффект в отношении пиковой амплитуды также снижается при продолжительной гиперполяризации мембраны;

(ж) связывание β-NaTx снижает т.н. «воротный ток» (469) — очень малый по амплитуде ток, возникающий при активации каналов и связанный с движением воротных зарядов (сенсоров потенциала); действительно, поскольку один из сенсоров пойман токсином в ловушку, он не дает вклада в воротный ток;

(з) наконец, множество экспериментов по картированию сайта связывания β-NaTx показывают их взаимодействие с петлей S3-S4 ПЧД II, а тем самым с сенсором потенциала (S4) ПЧД II (см. выше).

Локализация сайта связывания β-NaTx (рецепторного сайта 4) была проведена последовательно в ряде экспериментов. Так, было отмечено, что Css4 проявляет высокую активность против характерной для ЦНС млекопитающих изоформы $Na_v1.2$, но обладает сниженной аффинностью (×20 раз) и не вызывает характерных эффектов в отношении изоформы $Na_v1.4$, найденной в сердечной мышце. Был получен набор химерных каналов на основе $rNa_v1.2$, у которых внеклеточные петли были заменены на соответствующие последовательности $rNa_v1.4$. Изучение связывания Css4 с такими каналами показало, что принципиальное значение имеет структура петли S3-S4 ПЧД II и что, возможно, дополнительный вклад вносят петли S1-S2 того же ПЧД II и S5-S6 ПД I или III (458). Дальнейший сайт-направленный мутагенез $rNa_v1.2$ выявил а.о. петель S1-S2 и S3-S4 ПЧД II и S5-S6 ПД III, замена которых снижает аффинность связывания Css4 (458, 468) или влияет на его способность сдвигать по-

рог активации Na_v (470, 471). Интересно, что замена а.о. S4 ПЧД II не влияет на аффинность токсина, но при этом сказывается на его способности сдвигать $V_{1/2,Na}$, наибольший эффект отмечается при замене воротных зарядов R1 и R2 (остатков аргинина в S4, наиболее близких к внеклеточной среде) (468); это еще одно свидетельство в пользу модели ловушки для сенсора.

С учетом результатов по мутагенезу β-NaTx и $rNa_v1.2$ была предложена модель взаимодействия этих токсинов с каналами. Предполагалось, что β-NaTx встраиваются в ложбину ПЧД II, образованную внеклеточными петлями (S1-S2 и S3-S4), при этом петля, предшествующая α-спирали, и петля β2-β3 оказываются направленными внутрь этой ложбины, а N- и C-концевые области токсинов сближаются с петлей S5-S6 ПД III (471). В 2026 г. опубликован препринт статьи, описывающей структуру комплекса Cn2 с $hNa_v1.6$ (472). Воздерживаясь от подробного рассмотрения, всё же скажем, что поза токсина в комплексе отличается от ожидавшейся: (1) а.о. α-спирали, включая E28, формируют контакты с петлей S5-S6 ПД III; (2) C-концевая область токсина и петля, предшествующая α-спирали, сближены с S3-S4 ПЧД II, но не S5-S6 ПД III; (3) с воротным зарядом (R844, это R1) взаимодействует E15; (4) Cn2 образует множественные контакты с консервативным N-гликаном, присоединенным к N1372. Насколько такой способ взаимодействия с ПЧД II и ПД III характерен для других β-NaTx — предмет будущих изысканий.

1.10.3. Другие токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы

Стоит отметить, что разнообразие эффектов, оказываемых токсинами скорпионов на Na^+ каналы, шире простой дихотомии (α-NaTx *vs.* β-NaTx). К примеру, упомянутый выше токсин OD1 обладает типичным α-эффектом в отношении $Na_v1.4$, 1.6 и 1.7, но также проявляет β-эффект в отношении $Na_v1.4$ и 1.6 (473). Токсин Tz 1 из *Tityus zulianus* (Q2NME3; 64 а.о., см. таблицу 11) проявляет типичный β-эффект в отношении $Na_v1.4$, однако блокирует активацию $Na_v1.5$ (сродни блокаторам активации Na_v из яда пауков, см. далее в соответствующем разделе). По всей видимости, в зависимости от структуры ПЧД II токсин удерживает сенсор потенциала в разных положениях (474). Родственный ему и более исследованный токсин Ts 1, упоминавшийся нами выше, тоже ингибирует $Na_v1.5$, а еще воздействует на стационарную инактивацию $Na_v1.4$ и 1.6 и приводит к возникновению неинактивируемого тока в случае $DmNa_v1$ (похоже на эффект δ-paluIT1 и 2, см. ниже в разделе «Инсектотоксины из яда воронковых пауков, потенцирующие Na_v») (417).

Структурное разнообразие токсинов скорпионов, воздействующих на Na^+ каналы, тоже не ограничивается рассмотренными выше примерами. Так, из яда *P. transvaalicus* получен биртоксин (P58752; 58 а.о., 3 S-S), аминокислотная последовательность которого сходна с β-

NaTx, однако содержит только шесть «коровых» остатков цистеина (475). В данном случае отсутствует четвертая дисульфидная связь, которая у большинства α и β-NaTx соединяет N- и C-концевые участки. Вероятно поэтому, что биртоксин близок предковой форме, от которой происходят современные α и β-NaTx. Активность биртоксина не исследовалась детально, однако на препарате ганглионарных клеток сетчатки золотой рыбки *Carassius auratus* он продемонстрировал в отношении натриевых токов эффекты, характерные для β-NaTx (476). Обнаружение целого семейства сходных токсинов в яде *P. transvaalicus* (477) и других скорпионов (478) указывает на их биологическое значение.

Кроме того, из яда *Anuroctonus phaiodactylus* (Chactidae) был выделен файодотоксин (Q5MJP5; 72 a.o., 4 S-S), который вызывал сдвиг зависимости стационарной инактивации каналов $DmNa_v1$ от напряжения в сторону деполяризации (479). В этом случае число дисульфидных связей такое же, как у α и β-NaTx, однако различается их расположение: три «коровые» связи на месте, а четвертая локализована в C-концевой области молекулы.

1.10.4. Разнообразие токсинов пауков, воздействующих на Na^+ каналы

Как было отмечено выше, разнообразие токсинов пауков, модифицирующих функцию Na_v, очень велико. Это и блокаторы поры, и соединения, обладающие эффектом как α-NaTx или β-NaTx скорпионов, и ингибиторы активации, сходные по действию с описанными выше ингибиторами активации K^+ каналов. Традиционно для обозначения различных эффектов в отношении Na_v в номенклатуре токсинов используют греческие буквы-префиксы: μ — для поровых блокаторов, β — для воздействующих на активацию (как облегчающих, так и угнетающих), δ — для ингибиторов инактивации.

Предположение о связывании с рецепторным сайтом 1 выдвинуто для многих токсинов пауков, это чаще всего делается на основании наблюдения блокирующего эффекта, не зависящего от мембранного потенциала (рисунок 13A). Важно понимать, что в случае высокоаффинного связывания с ПЧД и стабилизации сенсора потенциала в нижнем положении, а также большого времени диссоциации комплекса ингибиторы активации тоже не будут проявлять зависимости от потенциала. По этой простой причине некоторые токсины ошибочно называют поровыми блокаторами Na_v (382). Единственным токсином паукообразных, для которого считается подтвержденным блокирование поры Na_v, служит Tx1 (UniProt ID: P17727) из яда паука *Ph. nigriventer* (480). По-видимому, у этого токсина достаточно необычная структура: он содержит 78 a.o. и семь S-S-мостиков. Кроме того, Tx1 конкурирует за связывание с μ-конотоксином GIIIB, но не TTX или STX: предполагают, что из-за своего размера он не может проникнуть достаточно глубоко в устье канала и не дотягивается до сайта гуанидиновых токсинов.

Гораздо больше разнообразие токсинов пауков, модифицирующих процессы активации и/или инактивации Na_v. Наиболее изученными являются три группы: (1) ингибиторы инактивации Na_v из яда австралийских воронковых пауков; (2) ингибиторы активации Na_v из яда многих мигаломорфов; (3) потенциаторы активации Na_v насекомых из яда американских воронковых пауков.

1.10.5. Ингибиторы инактивации Na_v из яда пауков

В яде опасных для человека австралийских воронковых пауков *Atrax robustus* и *H. versuta* обнаружены соответственно робустоксин (несколько раз переименовывался в попытках систематизации: сначала в δ-атракотоксин-Ar1a, δ-ACTX-Ar1a, затем в δ-гексатоксин-Ar1a, δ-HXTX-Ar1a; P01478; 42 a.o., 4 S-S) (481) и версутоксин (аналогично δ-ACTX-Hv1a или δ-HXTX-Hv1a; P13494; 42 a.o., 4 S-S) (482) (аминокислотные последовательности см. в таблице 12). Оба токсина представляют собой действующее начало яда и летальны для млекопитающих (483). Значения $ЛД_{50}$ составляют: ≈60 нг/кг (i.c.v.), ≈0,2 мг/кг (s.c.) для мышей, ≈4 мкг/г для сверчков *Gryllus* sp. (484).

В электрофизиологических экспериментах на выделенных нейронах спинальных ганглиев крысы эти токсины в наномолярных концентрациях сходным образом воздействовали на TTX-чувствительные Na_v: (а) замедляли их инактивацию и приводили к появлению неинактивированного компонента натриевого тока (аналогично α-NaTx, рисунок 13Б), (б) снижали амплитуду тока, (в) сдвигали зависимость активации от потенциала в сторону гиперполяризации (т.е. способствовали активации, аналогично β-NaTx, рисунок 13В), (г) облегчали выход из инактивированного состояния (23, 35, 485). В радиолигандном анализе оба токсина конкурировали с меченым Aah II за сайты связывания в синаптосомах мозга крысы в наномолярных концентрациях и с меченым Lqh αIT за связывание с мембранами ЦНС таракана *P. americana* — в субнаномолярных концентрациях (484). Таким образом, по фармакологии δ-HXTX совмещают свойства двух групп α-NaTx скорпионов — млеко- и инсектотоксинов (см. раздел «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы»). При этом по токсичности они очень похожи на α-млекотоксины (сравнительно малотоксичны для сверчков, см. выше), что вначале озадачило исследователей. Впоследствии оказалось, что δ-HXTX обладают значительно меньшей аффинностью к препаратам синаптосом саранчи *L. migratoria* (443). Так что, по всей видимости, мы имеем дело с дифференциальной специфичностью токсинов в отношении Na_v разных насекомых: если на каналах тараканов δ-HXTX эффективны, то на каналы прямокрылых они воздействуют слабо.

Таблица 12. Ингибиторы инактивации Na^+ каналов из яда пауков.

Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.
		1 5 10 15 20 25 30 35 40	
δ-HXTX-Ar1a	P01478	CAKKRNWCGKNEDCCCPMKCIYAWYNQQGSCQTTITGLFK-KC	
δ-HXTX-Hv1a	P13494	CAKKRNWCGKTEDCCCPMKCVYAWYNEQGSCQSTISALWK-KC	42
δ-AOTX-Mb1a	P83608	CAKKREWCAKTEDCCCPMKCIYAWYNEQSSCQTTFSGMFK-KC	
δ-HXTX-Mg1a	P83560	CGSKRAWCKEKKDCCCGYNCVYAWYNQQSSCERKWKYLFTGEC	43

В последовательность пептидов внесены разрывы для удобства сравнения. А.о. раскрашены в соответствии со свойствами (как в таблице 8).

Интересно, что в яде японского воронкового паука *Macrothele gigas* (Atracidae) обнаружен очень сходный токсин, названный magi-4 (впоследствии — δ-HXTX-Mg1a; P83560; 43 а.о., 4 S-S; см. таблицу 12) (486, 487). Он проявлял сходные с робустоксином и версутоксином эффекты в отношении Na_v, однако не был способен конкурировать с Lqh II за связывание с синаптосомами мозга крысы, напоминая α-подобные токсины скорпионов (см. раздел «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы»). Magi-4 был охарактеризован электрофизиологически на панели Na_v, оказалось, что он эффективно воздействует на нейрональные изоформы млекопитающих $Na_v1.1$, 1.3 и 1.6, но слабо — на изоформу $Na_v1.2$, что согласуется с данными по конкуренции с Lqh II. Кроме того, этот токсин проявляет высокую аффинность и эффективность в отношении Na_v насекомых: к примеру, в субмикромолярных концентрациях он полностью предотвращал инактивацию каналов.

Пожалуй, еще любопытней, что очень похожий токсин (δ-миссуленатоксин-Mb1a, δ-MSTX-Mb1a, или δ-AOTX-Mb1a; P83608; 42 а.о., 4 S-S; см. таблицу 12) был получен из яда *Missulena bradleyi* (Actinopodidae) (488). Это наблюдение привело к пересмотру систематики Hexathelidae и выделению нового семейства Atracidae (489) (в настоящее время эти изменения пока еще не нашли отражения в номенклатуре токсинов). При этом *M. bradleyi* не представляет большой опасности для человека, случаи серьезного отравления крайне редки (490), что может быть связано с поведенческими особенностями: этот паук зачастую кусает без впрыскивания яда. Более того, здесь имеет место половой диморфизм: по-видимому, опасен яд только мужских особей, в то время как женские не продуцируют δ-AOTX-Mb1a (491). В недавнем исследовании выдвигается предположение, что δ-HXTX эволюционировали как средство защиты пауков от позвоночных хищников, а их летальный эффект в отношении человека — досадное совпадение (156).

В настоящее время исследована пространственная структура робустоксина (PDB ID: 1QDP), версутоксина (1VTX) и magi-4 (2ROO) (487), все они содержат стандартный мотив цистинового узла (C^1–C^4, C^2–C^6, C^3–C^7), а особенностью служит дополнительная S-S-связь

(C^5–C^8), фиксирующая С-концевой а.о. Из электрофизиологических экспериментов и конкуренции с α-NaTx следует, что δ-HXTX связываются с рецепторным сайтом 3 Na_v (ПЧД IV), однако детали этого взаимодействия не изучены.

В яде опасного для человека американского странствующего паука *Ph. nigriventer* найдены PnTx2-5 и 6 (O76199 и P29425; 48 а.о., 5 S-S; см. таблицу 13), вызывающие характерные симптомы нейротоксичности, напоминающие отравление цельным ядом и, по-видимому, являющиеся его главным действующим началом; на мышах $ЛД_{100} \approx 10–40$ мкг/кг (i.c.v.) (492). Эти токсины ингибируют инактивацию Na_v и смещают зависимость их активации от потенциала в сторону гиперполяризации (эксперименты были выполнены на клетках линии GH3, экспрессирующих несколько нейрональных изоформ каналов); при этом PnTx2-6 проявляет в ≈5 раз бóльшую активность (24, 493). Он частично вытесняет Aah II из специфических сайтов в синаптосомах крыс (на ≈70% в насыщающих концентрациях) (493) и не проявляет избирательности в отношении разных изоформ Na_v (494). Любопытно, что характерный признак отравления ядом *Ph. nigriventer* — приапизм — вызывается именно PnTx2-5 и 6 (495, 496). Это наблюдение послужило основанием для начала разработки нового агента для терапии эректильной дисфункции (см. ниже раздел «Потенциал компонентов яда паукообразных для разработки лекарств») (494).

В том же яде обнаружены токсины PnTx4(5-5) и PnTx4(6-1) (P59367 и P59368; 47 и 48 а.о., 5 S-S; см. таблицу 13), проявляющие высокую инсектицидную активность [для PnTx4(6-1) $ЛД_{50} \approx 0{,}2$ мкг/г против *M. domestica*] и не показывающие токсичности при внутримозговом (i.c.v.) введении мышам даже в высоких дозах (1,5 мг/кг) (497, 498). Эти токсины ингибируют инактивацию Na_v насекомых сродни α-NaTx (499, 500). PnTx4(6-1) вытесняет α-подобный токсин скорпиона Bom IV со специфических сайтов в синаптосомах таракана *P. americana* (499). По всей видимости, указанные токсины *Ph. nigriventer* связываются с рецепторным сайтом 3 Na_v насекомых.

Таблица 13. Ингибиторы инактивации Na^+ каналов из яда *Ph. nigriventer* и искусственный пептид PnPP-19.

Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.
PnTx2-5	O76199	ATCAGQDQTCKVTCDCCGERGECVCGGPCICRQGNFLIAWYKLASCKK	48
PnTx2-6	P29425	ATCAGQDQPCKETCDCCGERGECVCGGPCICRQGYFWIAWYKLANCKK	
PnPP-19		CH_3CO-GER----------RQ-YFWIAWYKLANSKK-NH_2	19
PnTx4(5-5)	P59367	CADINGACKSDCDCCGDSVTCDCYWSDSCKCRESNFKIGMAIRKKF-C	47
PnTx4(6-1)	P59368	CGDINAACKEDCDCCGYTTACDCYWSKSCKCREAAIVIYTAPKKKLTC	48

В последовательности PnTx4(5-5) и PnPP-19 внесены разрывы для удобства сравнения. CH_3CO-, N-концевое ацетилирование; -NH_2, С-концевое амидирование. А.о. раскрашены в соответствии со свойствами (как в таблице 8).

В яде китайского палевого птицееда *Chilobrachys guangxiensis* обнаружены сходные цзиньчжаотоксины I и II (JZTX-I; P83974; 33 a.o., 3 S-S и JZTX-II; B1P1B9; 32 a.o., 3 S-S; таблица 14), которые ингибируют инактивацию Na_v и практически не обладают активностью в отношении активации каналов (501, 502). Одиночная мутация D1609A в каналах $Na_v1.5$ человека делает их устойчивыми к действию этих токсинов, указывая на рецепторный сайт 3 как место их связывания (503, 504). Интересно, что JZTX-II сравнительно специфичен в отношении изоформы $Na_v1.5$, в то время как JZTX-I характеризуется широким спектром действия (504) и при больших концентрациях воздействует также на $K_v2.1$ — аналогично HaTx1, связываясь с мотивом весла (505).

Таблица 14. Ингибиторы инактивации Na^+ каналов из яда *Chilobrachys guangxiensis*.

Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, a.o.
JZTX-I	P83974	ACGQFWWKCGEGKPPCCANFACKIGLYLCIWSP	33
JZTX-II	B1P1B9	GCGTMWSPCSTEKP-CCDNFSCQPAIKWCIWSP	32

В последовательность JZTX-II внесен разрыв для удобства сравнения. A.o. раскрашены в соответствии со свойствами (как в таблице 8).

Интересный случай представляет токсин HmTx1 из яда западноафриканского птицееда *Heteroscodra maculata* (δ-TRTX-Hm1a; P60992; 35 a.o., 3 S-S; таблица 8). Дело в том, что вначале он был охарактеризован как ингибитор активации K_v2 и K_v4 (373), а затем оказалось, что этот токсин проявляет достаточно высокую селективность в отношении $Na_v1.1$ ($EC_{50} \approx 40$ нМ, в то время как по отношению к $Na_v1.3$ $EC_{50} \approx 220$ нМ при существенно меньшей амплитуде эффекта, по отношению к $K_v4.1$ $IC_{50} \approx 280$ нМ, а на других каналах активность еще ниже) (506). Пересадка мотива весла из ПЧД IV, но не из других ПЧД $Na_v1.1$ в $K_v2.1$ привела к появлению у этого канала высокой чувствительности к HmTx1 (506) — аналогично α-NaTx скорпионов (396). Однако пересадка этой области в устойчивый к действию токсина канал $Na_v1.4$ не привела к проявлению у него чувствительности, для этого потребовалась также пересадка петли S1-S2. Предполагается таким образом, что обе внеклеточные петли ПЧД IV необходимы для связывания HmTx1, при этом его селективность в отношении изоформы $Na_v1.1$ определяется S1-S2 (506).

1.10.6. Ингибиторы активации Na_v из яда пауков

Выше (раздел «Ингибиторы активации K_v из яда пауков») были рассмотрены токсины из яда пауков-птицеедов, модифицирующие воротный механизм K_v. Эти токсины (таблица 8), наиболее изученным из которых является HaTx1, связываются с ПЧД каналов (рисунок 12) и препятствуют их переходу в активированное состояние. Было также отмечено, что

похожие по строению токсины воздействуют на Na_v и Ca_v. Хорошо изученными соединениями с подобным эффектом на Na_v являются протоксины 1 и 2 (ProTx I и II) из *Th. pruriens* (379), хувентоксин-IV (HWTX-IV) из *C. schmidti* (382) и цзиньчжаотоксин-III (JZTX-III) из *Ch. guangxiensis* (374) (см. таблицу 8).

Указанные токсины угнетают токи, опосредованные Na_v, за счет ингибирования активации каналов. Так, вольт-амперная характеристика $Na_v1.5$ или $Na_v1.7$ под действием ProTx II или JZTX-III смещалась вправо, т.е. для активации каналов был необходим бóльший потенциал (рисунок 13Г) (374, 379, 507). В отличие от ТТХ, блок $Na_v1.2$, $Na_v1.5$ или $Na_v1.7$ посредством ProTx II или HWTX-IV частично снижался при длительной предварительной деполяризации или даже полностью снимался экстремальной деполяризацией (свыше 100 мВ) (508, 509). Использование ТТХ для блокирования тока через пору канала позволило изучить влияние ProTx II на воротный ток $Na_v1.2$. Оказалось, что токсин блокирует быструю компоненту, составляющую <40% от общего воротного тока (509). Поскольку экспериментальные данные по угнетению натриевого тока соответствовали кривой «доза–ответ» для случая одного сайта связывания токсина, что также подтверждалось данными радиолигандного анализа с использованием ^{125}I-меченого ProTx II (510), логично предположить, что ProTx II препятствует движению одного сенсора потенциала.

Локализация сайта связывания ингибиторов активации Na_v из яда пауков была осуществлена в результате ряда наблюдений. Так, замена двух а.о., играющих роль воротных зарядов, в S4 ПЧД II (R1 и R2) на незаряженные а.о. приводит к исчезновению эффекта ProTx II в отношении воротного тока. Для мутантных каналов с такими заменами не наблюдается снижение блока токсином при приложении предварительных деполяризующих импульсов (509). Мутации, меняющие структуру внешней части S3 и петли S3-S4, влияют на эффективность действия ProTx II, HWTX-IV и JZTX-III (507-510). Более того, внесение таких замен в структуру Na_v, чтобы они соответствовали последовательности других изоформ, приводит к ожидаемому эффекту — снижению или повышению активности токсинов в зависимости от изоформы канала (508, 510). К примеру, изоформа $Na_v1.7$ высокочувствительна к HWTX-IV ($IC_{50} \approx 30$ нМ), а $Na_v1.4$ — устойчива ($IC_{50} > 1$ мкМ); замена двух а.о. в петле S3-S4 ПЧД II канала $Na_v1.4$ (N и Q) на соответствующие а.о. из $Na_v1.7$ (D и E) придают чувствительность к токсину; обратные замены делают канал $Na_v1.7$ устойчивым (508). Таким образом, эта группа токсинов взаимодействует с ПЧД II, а конкретней — с внешней частью шпильки S3-S4 (мотивом весла). Место связывания и действие этих токсинов в отношении Na_v аналогично таковым для HaTx1 и K_v (см. выше «Ингибиторы активации K_v из яда пауков»). Зачастую механизм их работы описывается в терминах модели захвата сенсора потенциала, сродни β-NaTx (см. выше «β-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы»). При этом в от-

личие от β-NaTx ингибиторы активации Na_v из яда пауков «ловят» сенсор не в активированном (верхнем) положении, а в деактивированном (нижнем).

В деталях механизм действия перечисленных токсинов может различаться. Например, мутагенез показывает, что сайты связывания HWTX-IV и ProTx II в ПЧД II перекрываются, но различаются (507) (забегая вперед, скажем, что эти данные подтвердились при структурном анализе комплексов токсинов с каналом, см. ниже). Более того, упомянутый ранее промискуитет токсинов подобного рода отмечен не только в смысле разнообразия белков-мишеней, но также с точки зрения сайта связывания с одним белком. Дело в том, что данные мутагенеза показывают, что ProTx II взаимодействует и с ПЧД IV, и это находит отражение в его воздействии на процесс инактивации Na_v (507).

Что касается специфичности, то среди ингибиторов активации Na_v из яда пауков наблюдается широкое разнообразие. К примеру, ProTx II проявляет высокую избирательность в отношении $Na_v1.7$ ($IC_{50} \approx 0{,}3$ нМ; ингибирование наблюдается при концентрациях токсина в ≈100 раз меньших, чем для других изоформ) (510), а PaurTx 3 специфичен к изоформе $Na_v1.2$ (381). ProTx I, напротив, обладает сходной аффинностью в отношении ряда изоформ Na_v и воздействует также на K_v и Ca_v и даже TRPA1 (379, 511). JZTX-III представляет любопытный случай, поскольку оказывается селективным в отношении каналов двух типов: $Na_v1.5$ и $K_v2.1$ (374, 400).

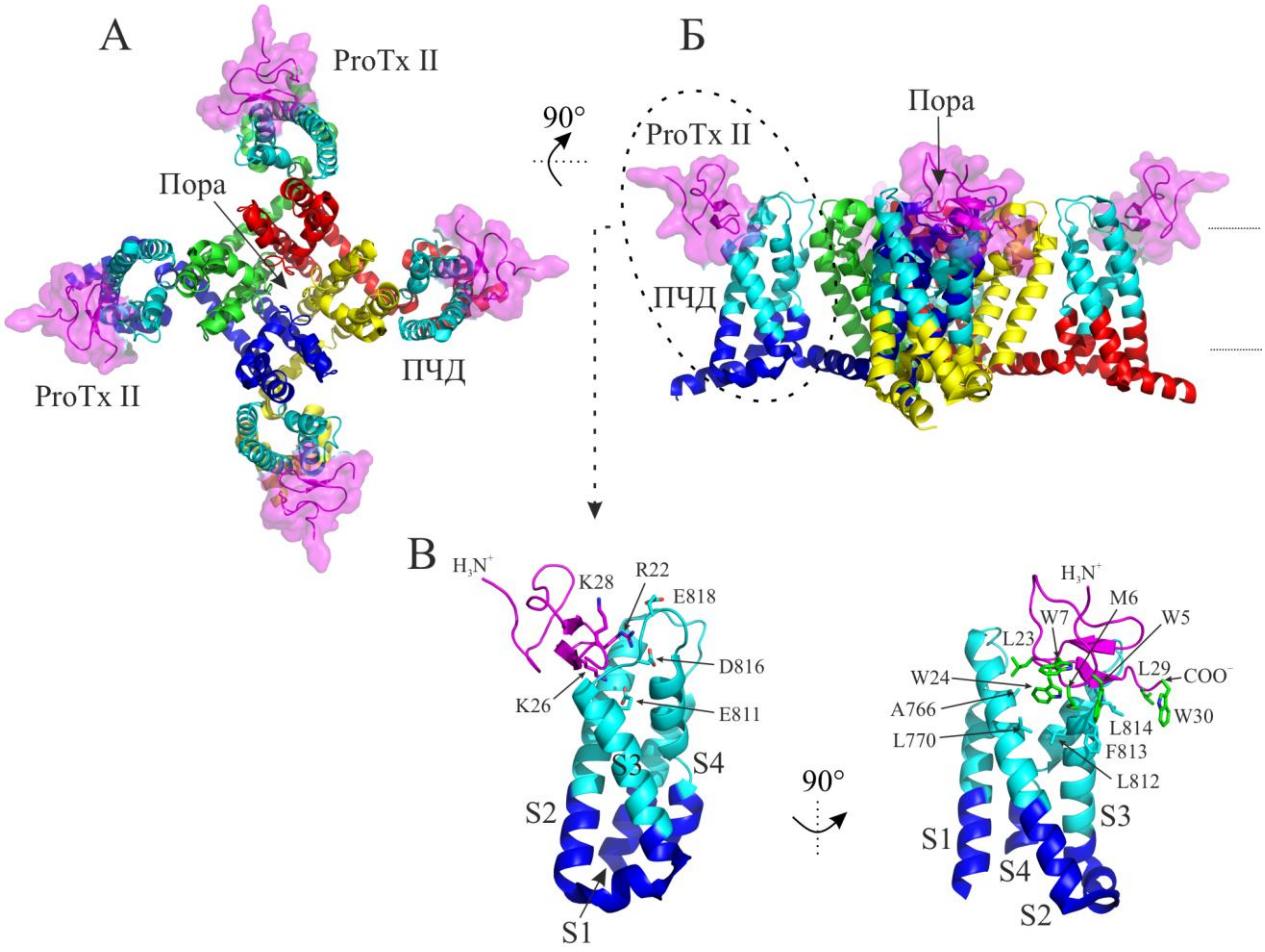
Аналогично родственным ингибиторам активации K_v из яда пауков, рассмотренным нами выше, ингибиторы активации Na_v обладают амфифильной структурой (на рисунке 10 показана структура ProTx II), и многие проявляют способность связываться с мембранами (512). Механизм их действия, по всей видимости, так же подразумевает узнавание мишени в мембрано-связанном состоянии — например, может иметь место механизм мембранного доступа. Не удивительно поэтому, что свойства мембраны оказывают влияние на активность подобных токсинов (513). Предложено даже не считать мембрану как просто пассивную среду, пусть и с особыми свойствами, в которой происходит взаимодействие канал–токсин, а рассматривать ее как полноправного участника образования тройного комплекса канал–токсин–мембрана или канал–токсин–липиды (514). Важно понимать при этом, что отсутствует существенная корреляция между аффинностью токсинов к мембранам и их активностью или селективностью в отношении Na_v (512); более того, некоторые токсины, например HWTX-IV, вообще не проявляют значительной аффинности к мембранам (515).

В 2019 г. почти одновременно вышли две статьи, докладывающие результаты исследования структуры комплексов Na_v с ингибиторами активации из яда пауков с помощью крио-ЭМ. В первой из них, опубликованной сотрудниками компании Genentech, объектами служили ProTx II и химерный Na^+ канал, представляющий собой гомотетрамерный канал

Na_vAb бактерии *Arcobacter butzleri*, у которого части трансмембранных сегментов ПЧД, приближенные ко внеклеточной стороне мембраны, были заменены на соответствующие участки последовательности ПЧД II $Na_v1.7$ человека (рисунок 18) (516). Аналогичный прием использовался этой группой исследователей ранее для исследования комплекса ПЧД IV $Na_v1.7$ с низкомолекулярным модулятором из класса арилсульфонамидов GX-936 (517). Авторам удалось изучить структуру комплекса $Na_vAb/Na_v1.7$ с ProTx II двумя методами: РСА и крио-ЭМ. Оказалось при этом, что в кристалле и большинстве изображений крио-ЭМ ПЧД присутствуют в активированном состоянии. Однако в ≈20% изображений ПЧД находились в неактивированном состоянии — см. подробнее в разделе «Токсины паукообразных как молекулярные инструменты исследования нервной системы».

Как и ожидалось, ProTx II погружен в мембрану своим гидрофобным кластером (окрашен зеленым на рисунке 18B), богатым ароматическими а.о. (см. последовательность в таблице 8 и пространственную структуру на рисунке 10). При этом токсин взаимодействует с петлей S3-S4 канала и располагается над спиралью S3. Остаток W24 служит ключевым элементом гидрофобной поверхности ProTx II, стабилизирующим комплекс: он внедряется в щель между спиралями S2 и S3 и формирует множественные ван-дер-ваальсовы контакты с гидрофобными а.о. канала; кроме того, атом азота его индольного кольца образует водородную связь с карбонилом основной цепи на конце S3, тем самым «кэпируя» эту спираль. Положительно заряженные а.о. ProTx II (R22, K26 и K28) формируют ионные связи с отрицательно заряженными а.о. $Na_v1.7$ на конце S3 (E811; нумерация по последовательности $Na_v1.7$) и в петле S3-S4 (D816 и E818; см. рисунок 18B). Важно, что эксперименты по сайт-направленному мутагенезу канала и токсина согласуются с данными структурных исследований: так, аланиновое сканирование указывает на принципиальное значение конца спирали S3 и петли S3-S4 для высокоаффинного связывания токсина, а замена R22 или K26 на отрицательно заряженные а.о. приводит к снижению активности ProTx II в 100 и более раз. Более того, полученная структура комплекса объясняет природу селективности ProTx II в отношении $Na_v1.7$: токсин своей гидрофобной поверхностью контактирует с F813, на месте которого у других изоформ располагается остаток глицина; замены в петле S3-S4 канала $Na_v1.2$ с привнесением а.о., характерных для $Na_v1.7$ (F813 и D816, их роль отмечена выше), повышает активность токсина более, чем в 20 раз.

Рисунок 18. Комплекс протоксина-2 (ProTx II) с Na^+ каналом. (А) Ленточная модель комплекса ProTx II с каналом Na_vAb, в котором части ПЧД заменены на соответствующие последовательности ПЧД II канала $Na_v1.7$ человека (PDB ID: 6N4I) (516). Показан вид «сверху», т.е. на плоскость мембраны со внеклеточной стороны. Молекулы ProTx II выделены малиновым и показаны в виде ленточных моделей, окруженных полупрозрачной поверхностью. (Б) Вид «сбоку», т.е. со стороны толщи мембраны; предполагаемое положение полярных головок липидов обозначено пунктирными отрезками справа. Субъединицы канала окрашены разными цветами; участки $Na_v1.7$ выделены голубым. (В) Вид как на панели (Б) с увеличением (слева) и поворотом (справа), показан один ПЧД, обозначены сегменты S1–4. Боковые цепи взаимодействующих а.о. токсина и канала, а также гидрофобного кластера токсина (справа, окрашены зеленым) отмечены и показаны линиями.



Вторая статья презентовала структуру $Na_v1.7$ человека, исследованную с помощью крио-ЭМ, в комплексе одновременно с двумя лигандами — ингибиторами активации из яда пауков и поровыми блокаторами: (а) ProTx II и TTX; (б) HWTX-IV и STX (518). В общих чертах положение токсинов пауков в комплексе совпадает с данными предыдущей работы, более того, они занимают практически идентичную позицию (помещаются в щель между сегментами S2 и S3 и взаимодействуют главным образом со спиралью S3 и линкером S3-S4). Остановимся на различиях. Во-первых, из-за низкого разрешения в области молекул токсинов авторы второй работы не стали предпринимать попыток докинга атомной структуры, по-

этому детали межмолекулярных контактов остаются неизученными. Во-вторых, в комплексе с каналом человека имеется вторая молекула ProTx II — она взаимодействует с ПЧД IV, ее расположение несколько отличается от места связывания с ПЧД II: токсин сдвинут ближе к S4 и взаимодействует почти исключительно с линкером S3-S4. При этом в первой работе специально обсуждается, почему такое взаимодействие невозможно. В этой связи стоит отметить более раннее исследование, в котором было достаточно убедительно показано, что ProTx II может связываться с ПЧД IV (507). Для HWTX-IV второго сайта не обнаружено, что так же согласуется с предшествующими работами.

В 2025 г. опубликованы результаты исследований комплексов токсинов PaurTx 3 и ProTx I с каналами $Na_v1.6$ и 1.8 человека соответственно с помощью крио-ЭМ (519, 520). В первом случае обнаружилось сразу три сайта связывания токсина с каналом: с ПЧД I, II и ПД с внутриклеточной стороны. Разрешение в области ПЧД I низкое и позволило только примерно оценить расположение PaurTx 3, а связывание со стороны цитоплазмы ставит вопросы о возможности проникновения пептида сквозь мембрану и сохнанения укладки при восстановлении S-S-мостиков. Что касается ПЧД II, то в общих чертах положение PaurTx 3 соответствует двум структурам, описанным выше. Во втором случае, напротив, выявлен только один сайт связывания токсина — с ПЧД II. Эти результаты контрастируют с данными системы анализа селективности лигандов Na_v на основе химерных $K_v2.1$ с заменой мотива весла (см. выше, рисунок 14) (396). ProTx I взаимодействует со специфичным для $Na_v1.8$ остатком лизина в линкере S3-S4 (образуется солевой мостик D31–K748), при этом опять общий вид комплекса аналогичен описанным выше.

Необходимо отметить и некоторые нерешенные вопросы, которые не удалось адресовать даже с получением пространственных структур комплексов. Так, аланиновое сканирование показывает важную роль остатка I767, расположенного в спирали S2, для активности ProTx II, однако он не образует контактов с токсином. Возможно, его роль состоит в связывании липидов, которые в свою очередь контактируют с ProTx II. Как говорилось выше, в литературе достаточно широко обсуждается модель тройного функционального комплекса канал–токсин–липиды, подразумевающая более важную роль последних в сравнении с просто средой, в которой происходит взаимодействие белковых молекул (513, 514). Стоит признать однако, что эта модель не получила однозначного подтверждения. Очевидно, что свойства мембраны, а следовательно и компонентов, из которых она состоит, оказывают непосредственное влияние на структуру и функцию мембранных белков, в том числе на их взаимодействие с лигандами. Адепты модели тройного комплекса, таким образом, вынужденно подразумевают нечто большее, т.е. образование специфических контактов между каналом, токсином и липидами — этих контактов в изученных структурах комплексов Na_v не видно.

1.10.7. Инсектотоксины из яда воронковых пауков, потенцирующие Na_v

Работы М. Адамса (Калифорнийский университет в Риверсайде, США), ставшие классическими, были посвящены изучению состава яда американского воронкового паука *A. aperta* (Agelenidae). Оказалось, что в нем содержится три основные группы токсинов (100): (1) α-агатоксины — ацилполиамины, аналогичные по действию рассмотренным выше (см. раздел «Ацилполиамины»); (2) μ-агатоксины, воздействующие на Na_v и вызывающие спонтанную активность нейронов, приводящую к возбуждающему параличу, и (3) ω-агатоксины, ингибирующие Ca_v (см. ниже соответствующий раздел).

μ-Агатоксины (μ-Aga I–VI) представляют собой пептиды, содержащие 36–37 а.о. и четыре S-S-мостика (таблица 15) (105). Они облегчают активацию Na_v насекомых, сдвигая кривую активации в область более отрицательных значений мембранного потенциала — аналогично β-NaTx (см. соответствующий раздел выше). Интересно, что μ-агатоксины селективны в отношении каналов насекомых и не обнаруживают эффектов в отношении Na_v млекопитающих. Это наблюдение послужило основанием для создания бакуловирусной конструкции с геном μ-Aga IV; при заражении личинок насекомых этой конструкцией они погибали быстрее, чем при заражении вирусом дикого типа (521).

Таблица 15. Инсектотоксины из яда воронковых пауков, потенцирующие Na_v.

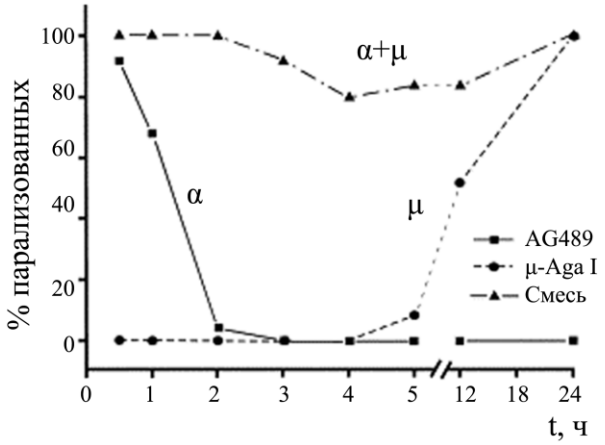
Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.
		1 5 10 15 20 25 30 35	
μ-Aga I	P11057	ECVPENGHCRDWY-DECCEGFYCSCRQPPKCICRNNN-NH_2	36
μ-Aga IV	P11060	ACVGENQQCADWAGPHCCDGYYCTCRYFPKCICRNNN-NH_2	37
CT-I	P15967	SCVGEYGRCRSAY-EDCCDGYYCNCSQPPYCLCRNNN-NH_2	36
δ-paluIT1	P83256	GCLGEGEKCADWSGPSCCDGFYCSCRSMPYCRCRNNS-NH_2	37
δ-paluIT2	P83257	ACVGDGQRCASWSGPYCCDGYYCSCRSMPYCRCRNNS-NH_2	

Сверху нумерация для μ-Aga I. В последовательность пептидов внесены разрывы для удобства сравнения. -NH_2, С-концевое амидирование. А.о. раскрашены в соответствии со свойствами (как в таблице 8).

Отдельного упоминания стоят исследования совместного действия различных агатоксинов. Инъекция комнатным мухам сублетальных доз α-Aga (в тесте использовался мажорный компонент яда AG489, в качестве ацильной группы содержащий остаток индолилуксусной кислоты) приводит к быстрому кратковременному параличу (длится <3 ч). Эффект μ-Aga (использовался μ-Aga I), напротив, развивается долго (паралич наступает лишь спустя ≥5 ч). А вот совместное введение этих токсинов обеспечивает эффективный паралич в течение ≥24 ч (см. рисунок 19) (522). Как мы говорили выше (раздел «Ацилполиамины»), функционально место μ-Aga в яде некоторых других пауков занимает собственно нейромедиатор

глутамат (189), выброс которого μ-Aga индуцируют вследствие активации Na^+ каналов в мотонейронах. Таким образом, парадоксальное, казалось бы, сочетание в одном яде α-Aga, вызывающих вялый паралич, и μ-Aga, приводящих, напротив, к возбуждающему параличу, на самом деле приводит к синергии и эффективному действию цельного яда.

Рисунок 19. Совместное действие α и μ-агатоксинов.



AG489 и μ-Aga I вводились в брюшко взрослых комнатных мух *M. domestica* по отдельности или вместе. Дозы: 35 мкг/г для AG489 ($ПД_{50}$) и 0,3 мкг/г для μ-Aga I (1,5 × $ЛД_{50}$).
Рисунок адаптирован из (100) с любезного разрешения М. Адамса; лицензия Elsevier № 5100790737476.

Очень похожие пептиды были обнаружены в яде других агеленовых пауков — это куртатоксины 1–3 (CT-I–III) из *Hololena curta* (523) и δ-палутоксины 1–4 из *Pireneitega luctuosa* (δ-paluIT1–4; см. примеры в таблице 15) (524). Надо оговориться при этом, что если для μ-агатоксинов и куртатоксинов отмечают эффект облегчения активации Na_v, то для δ-палутоксинов было отмечено ингибирование инактивации — аналогично α-NaTx (см. соответствующий раздел выше). Более внимательное изучение этого эффекта показало, что δ-paluIT1 и 2 не влияют на кинетику инактивации Na_v, но при этом индуцируют появление неинактивируемого тока (525). В качестве объяснения предложено считать, что δ-палутоксины облегчают переход из инактивированного в закрытое состояние канала.

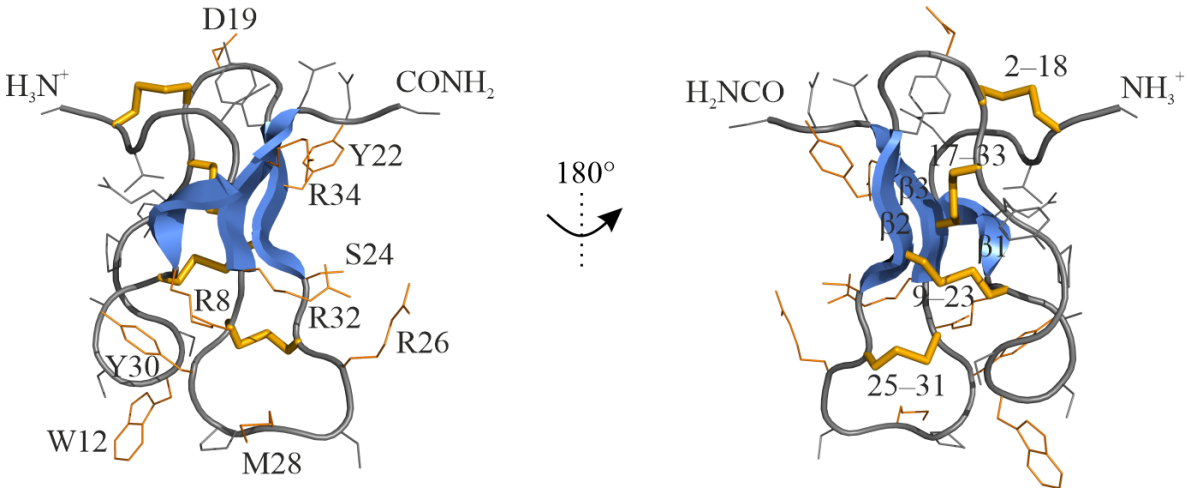
С помощью радиолигандного анализа показано, что δ-paluIT1 и 2 имеют высокую аффинность к мембранам ЦНС таракана *P. americana* (526). Они вытесняют радиоактивномеченый Bj-xtrIT (возбуждающий β-инсектотоксин скорпиона) в наномолярном диапазоне концентраций, но не влияют на связывание Lqh αIT (α-NaTx). Кроме того, угнетающий β-инсектотоксин скорпиона Lqh IT2 вытесняет меченый δ-paluIT2. Таким образом, несмотря на необычную активность (α-подобный эффект), δ-палутоксины связываются с рецепторным сайтом 4 Na_v.

Изучена пространственная структура μ-Aga I (PDB ID: 1EIT) (527) и двух δ-палутоксинов: δ-paluIT1 (1V90) и 2 (1V91; рисунок 20) (525). Все они образуют типичные цистиновые узлы (C2–C18, C9–C23 и C17–C33 у δ-paluIT2) с дополнительной четвертой ди-

сульфидной связью (C25–C31), стабилизирующей β-шпильку. Аланиновое сканирование δ-paluIT2 позволило определить функционально важные а.о., необходимые для высокоаффинного связывания с Na_v и проявления инсектицидной активности (рисунок 20) (526). В этом исследовании функционально значимыми а.о. считали те, мутация которых приводит к изменению аффинности токсина (определяемой радиолигандным анализом) в 10 и более раз (изменение свободной энергии связывания на 1,3 ккал/моль и более) или к статистически значимому снижению $ЛД_{50}$. Большинство важных а.о. локализованы с одной стороны молекулы токсина и формируют кластер. Особая ситуация с остатком D19: его замена не сказывается на аффинности, но существенно снижает токсичность, и расположен он вдалеке от других важных а.о.

Механизм действия μ-агатоксинов, куртатоксинов и δ-палутоксинов уподобляют β-NaTx (подробно обсуждался выше в соответствующем разделе): предполагают, что они взаимодействуют с сенсором потенциала ПЧД II (сайт 4), удерживая его в активированном состоянии. Остатку D19 у δ-paluIT2 при этом приписывают способность формировать стабильную связь с сенсором потенциала только в активированном положении (526). Стоит отметить однако, что эти токсины исследованы существенно хуже β-NaTx. В частности, остается непонятным, каким образом реализуется характерная для δ-палутоксинов активность, напоминающая α-NaTx.

Рисунок 20. Пространственная структура и локализация функционально важных остатков δ-paluIT2 (PDB ID: 1V91). Структура в ленточном представлении, указаны N- и C-концы, дисульфидные мостики показаны желтым, β-тяжи — голубым, петлевые участки — серым. Боковые заместители показаны линиями и раскрашены: важные для активности токсина а.о. оранжевым, неважные — серым. Слева отмечены функционально важные а.о., а справа отмечены β-тяжи и S-S-связи.



1.10.8. Другие токсины пауков, воздействующие на Na^+ каналы

Выше мы уделили внимание наиболее исследованным группам, однако разнообразие токсинов пауков, модифицирующих воротные механизмы Na_v, этим не исчерпывается. К примеру, в яде японского воронкового паука *M. gigas* обнаружен magi-5 (впоследствии — β-HXTX-Mg1a; P83561; 29 a.o., 3 S-S), который конкурировал с Css4 за связывание с синаптосомами мозга крысы и проявлял токсичность при внутримозговой инъекции мышам ($ЛД_{50} \approx$ 2,5 мкг/кг) (486). Аналогично β-NaTx (см. раздел «β-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы») приложение magi-5 приводило к сдвигу зависимости активации Na_v (исследовалась только изоформа $Na_v1.2$) от потенциала в сторону меньших значений. Исследована пространственная структура magi-5 (PDB ID: 2GX1) и проведено аланиновое сканирование, выявившее функционально важные a.o. (528). Предполагается, что молекулярный механизм его действия аналогичен β-NaTx.

В яде паука *Ch. guangxiensis* обнаружен цзиньчжаотоксин-IV (JZTX-IV; B1P1F4; 34 a.o., 3 S-S; см. таблицу 8), который помимо ингибирования инактивации сдвигает зависимость активации TTX-чувствительных каналов от потенциала в сторону деполяризации (т.е. ингибирует их активацию), чем одновременно напоминает две группы токсинов, рассмотренных выше (376). Токсин с похожими свойствами был обнаружен в яде Шри-Ланкийского птицееда *Poecilotheria vittata* (Theraphosidae), он получил название PcaTX-1 (C0HLN4; 36 a.o., 3 S-S; см. таблицу 8) (377). Для этого токсина показана любопытная посттрансляционная модификация — изомеризация по остатку аспарагиновой кислоты D33; пептид находят в яде в виде двух изомеров, у одного из них (PcaTX-1a) амидная связь образована не α-, а β-карбоксильной группой, этот изомер оказывает менее выраженный эффект на Na_v. Вероятно, данная модификация является результатом спонтанной изомерии. Здесь важно отметить, что и данный a.o., и вообще вся C-концевая область аминокислотной последовательности PcaTX-1 очень похожа или даже идентична многим другим хорошо исследованным пептидам (таблица 8), для которых о подобной модификации не сообщалось. А токсин HpTx1 (P58425; 33 a.o., 3 S-S; см. таблицу 8) из яда аранеоморфного паука *Heteropoda venatoria* (Sparassidae) по структуре напоминает обсуждавшиеся выше ингибиторы активации K_v и Na_v из мигаломорфных пауков и при этом обладает спектром активностей: он ингибирует активацию $K_v4.2$ (383) и $Na_v1.7$, а также инактивацию $Na_v1.9$ (529). И если в случае $Na_v1.7$ он связывается с ПЧД II, то в случае $Na_v1.9$ — с ПЧД IV.

1.11. Токсины, воздействующие на Ca^{2+} каналы

В настоящее время токсинам из яда паукообразных, воздействующим на Ca^{2+} каналы, уделяется существенно меньше внимания по сравнению с рассмотренными выше токсинами, воздействующими на K^+ или Na^+ каналы. Стоит оговориться при этом, что если в случае скорпионов, по-видимому, действительно токсины, активные на Ca^{2+} каналы, существенно менее распространены, а бóльшая часть яда представлена блокаторами K^+ каналов и активаторами Na^+ каналов, то в случае пауков причины другие. Дело в том, что у тех пауков, где состав яда изучен достаточно подробно, токсины, нацеленные на Ca^{2+} каналы, оказываются не менее разнообразными (см. ниже). Всплеск интереса к ним наблюдался в 1990-е гг. и связан, в первую очередь, с работами М. Адамса, посвященными яду *A. aperta*, о которых упоминалось выше. Эти работы, наряду с исследованиями Б. Оливеры (Университет Юты, США), посвященными характеристике токсинов моллюсков-конусов (конкретнее — ω-конотоксинам, воздействующим на Ca^{2+} каналы) (530), предоставили уникальные по специфичности молекулы, распознающие определенные типы (или подтипы) Ca_v, которые рутинно используются в качестве инструментов исследований и сегодня. Сниженный интерес в настоящее время связан, во-первых, со спецификой коллективов, работающих в области, во-вторых, со сравнительной сложностью тестирования активности лигандов Ca^{2+} каналов: эти каналы содержат больше субъединиц, их экспрессия более трудоемка.

Выше уже упоминался GsTx-SIA из яда *G. rosea* (см. раздел «Ингибиторы активации K_v из яда пауков», таблицу 8) (531). Этот токсин ингибирует $Ca_v2.1$ и 2.2 (Ca^{2+} каналы P/Q- и N-типа соответственно) с наномолярным сродством (369) и очень похожим образом на то, как действует HaTx1 на $K_v2.1$ или ProTx II на $Na_v1.7$ (механизмы подробно рассмотрены нами выше в разделах «Ингибиторы активации K_v из яда пауков» и «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков»). Приложение GsTx-SIA вызывает сдвиг зависимости активации каналов от мембранного потенциала в сторону деполяризации, при этом каналы, связанные с токсином, могут быть активированы бóльшим потенциалом. Это типичный случай захвата сенсора потенциала (англ. voltage sensor trapping) в его нижнем (down) неактивированном положении, а GsTx-SIA является членом большой группы токсинов пауков — модуляторов воротных механизмов ионных каналов (англ. gating modifiers; подробно описывались выше). Ввиду высокого сходства аминокислотных последовательностей (таблица 8), пространственная структура GsTx-SIA похожа на структуру других представителей этой группы (PDB ID: 1KOZ; см. рисунок 10) (532). В частности, внимание привлекает амфифильность с характерным кластером гидрофобных а.о., который может обусловливать механизм действия токсина по типу мембранного доступа (обсуждался выше).

Любопытно, что в очень высоких концентрациях GsTx-SIA ингибирует также $K_v2.1$ ($K_d \approx 20$ мкМ), причем делает это аналогично HaTx1, который, в свою очередь, в микромолярных концентрациях блокирует $Ca_v2.1$ (395). Мутации, позволившие локализовать сайт связывания HaTx1 в мотиве весла $K_v2.1$ (рисунок 12), также снижали аффинность GsTx-SIA. Этот эксперимент наглядно демонстрирует сходство в механизме действия и сайтах связывания модуляторов воротных механизмов разных ионных каналов.

В русле этой логики упоминавшийся токсин ProTx I из *Th. pruriens*, не проявляющий высокой избирательности, помимо K_v и Na_v воздействует и на Ca_v (533, 534). Изучена его активность в отношении каналов Т-типа, оказалось, что токсин проявляет селективность в отношении изоформы $Ca_v3.1$ в сравнении с $Ca_v3.2$ и 3.3. Локализация сайта связывания была проведена путем сравнения эффективности действия токсина против химерных каналов, полученных путем обмена доменами между $Ca_v3.1$ и 3.3 и сегментами полипептидной цепи между $Ca_v3.1$ и 3.2. Показано, что наибольший вклад во взаимодействие с ProTx I вносит петля S3-S4 (мотив весла) ПЧД IV.

А из яда скорпиона *P. transvaalicus* под руководством К. Шварца (Национальный институт неврологических расстройств и инсульта, США) был выделен куртоксин (P58910; 63 а.о., 4 S-S; назван в честь сына Шварца Курта), который с наномолярным сродством связывается и ингибирует Ca^{2+} каналы Т-типа $Ca_v3.1$ и 3.2 (535). Механизм его действия, по всей видимости, аналогичен рассмотренному выше для GsTx-SIA и других ингибиторов активации потенциал-чувствительных каналов. По последовательности куртоксин похож на α-NaTx (см. раздел «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы»), неудивительно поэтому, что он ингибирует инактивацию Na_v. Кроме того, оказалось, что он — пусть и с меньшим сродством — воздействует на Ca^{2+} каналы L- и N-типа (536). Эти наблюдения предопределили существенные ограничения использования куртоксина в исследованиях.

1.11.1. ω-Агатоксины

Если рассмотренные нами ранее μ-агатоксины из яда паука *A. aperta*, воздействующие на Na_v (см. раздел «Инсектотоксины из яда воронковых пауков, потенцирующие Na_v»), представляют группу очень сходных пептидов, то ω-агатоксины из этого же яда, ингибирующие Ca_v, формируют несколько семейств (ω-Aga I–IV), аминокислотные последовательности которых мало похожи (см. таблицу 16) (100). Кроме того, если ω-Aga I и II препятствуют выбросу глутамата в нервно-мышечном сочленении комнатной мухи *M. domestica* (537), то ω-Aga III и IV неактивны на этом препарате, однако воздействуют на синапсы позвоночных (синаптосомы кур или крыс) и центральные нейроны кузнечика *Schistocerca americana* (538-540).

Любопытно, что ω-агатоксины демонстрируют разнообразие профилей специфичности в отношении Ca_v (таблица 17). К примеру, ω-Aga IIIA (UniProt ID: P33034; 76 a.o., 6 S-S) блокирует все каналы HVA-типа (от англ. high-voltage-activated, т.е. активируемые при значительной деполяризации): L-, P/Q-, N- и R-типа (540-542); а ω-Aga IV проявляют высокую селективность в отношении каналов $Ca_v2.1$ (P/Q-типа) (539, 543). Более того, один и тот же токсин может по-разному воздействовать на различные Ca_v. Например, ω-Aga IIIA в насыщающих концентрациях полностью блокирует каналы L-типа (исследовалась изоформа $Ca_v1.2$, характерная для сердечной мышцы), однако лишь частично — каналы Ca_v2 (P/Q-, N- и R-типа) (541, 542). Интересно также, что практически идентичные по селективности и аффинности к каналам $Ca_v2.1$ (P/Q) ω-Aga IVA и B (P30288 и P37045; 48 a.o., 4 S-S) различаются по скорости взаимодействия с мишенью: эффект ω-Aga IVA развивается значительно быстрее (543). Дело в данном случае в различной структуре N-концевой части токсинов: у ω-Aga IVA здесь сконцентрированы положительно заряженные a.o., а у ω-Aga IVB — отрицательно заряженные; их роль была показана получением химерного пептида (544). Наконец, ω-Aga IVA способен различать P- и Q-подтипы канала $Ca_v2.1$: его аффинность в ≈10 раз ниже к каналам Q-типа, что объясняется наличием в последовательности двух дополнительных a.o. (Asn-Pro) в петле S3-S4 ПЧД IV и является результатом альтернативного сплайсинга (545).

Структура ω-агатоксинов не менее любопытна. Если ω-Aga IV представляются достаточно «обычными» токсинами пауков, содержащими 8 остатков цистеина (укладка цистинового узла с дополнительным дисульфидом согласно мотиву ESM), то другие ω-агатоксины необычны. ω-Aga III длинные (76 a.o., см. таблицу 16), содержат цистиновый узел с мотивом ESM и вдобавок протяженную C-концевую область, которая стабилизирована и прикреплена к N-концевому кору двумя дополнительными дисульфидами (итого шесть S-S-мостиков). ω-Aga IA состоит из двух цепей: большой (66 a.o.) и малой (3 a.o.), — которые удерживаются дисульфидной связью (см. таблицу 16). Кроме того, в составе этого токсина находят пять S-S-мостиков, которые не формируют мотива цистинового узла. Исследована пространственная структура токсинов ω-Aga IVA и B в растворе (PDB IDs: 1IVA и 1AGG), демонстрирующая типичный цистиновый узел, дополнительную дисульфидную связь, стабилизирующую β-шпильку, и достаточно протяженный неупорядоченный и липофильный C-концевой участок (a.o. 39–48) (544, 546). Укороченное производное ω-Aga IVA (1–40) с делецией этого участка даже в концентрации 10 мкМ практически не оказывало влияния на каналы P-типа, что указывает на важную функциональную роль этой части токсина (547). 3D структура других ω-агатоксинов не изучена.

Таблица 16. Токсины пауков, воздействующие на Ca^{2+} каналы.

Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.	Число S-S-мостиков
ω-Aga IA	P15969	AKALPPGSVCDGNESDCKCYGKWHKCRCPWKWHFTGEGPCTCEKGMKHTCITKLHCPNKAEWGLDW SPC	66+3	5
ω-Aga IIIA	P33034	SCIDIGGDCDGEKDDCQCCRRNGYCSCYSLFGYLKSGCKCVVGTSAEFQGICRRKARQCYNSDPDK-CESHNKPKRR-NH_2	76	6
ω-Aga IIIB	P81744	SCIDFGGDCDGEKDDCQCCRSNGYCSCYNLFGYLKSGCKCEVGTSAEFRRICRRKAKQCYNSDPDK-CVSVYKPKRR-NH_2		
PnTx3-4	P81790	SCINVGDFCDGKKDDCQCCRDNAFCSCSVIFGY-KTNCRCEVGTTATSYGICMAKHKCGRQTTCTKPCLSKRCKKNH-NH_2		7
PnTx3-6	P81792	ACIPRGEICTDDCECCGCDNQCYCPPGSSLGIFKCSCAHANKYFCNRKKEKCKKA	55	5
ω-Aga IVA	P30288	KKKCIAKDYGRCKWGGTPCCRGRGCICSIMGTNCECKPRLIMEGLGLA	48	4
ω-Aga IVB	P37045	EDNCIAEDYGKCTWGGTKCCRGRPCRCSMIGTNCECTPRLIMEGLSFA		
PnTx3-2	O76201	ACAGLYKKCGKGASPCCEDRPCKCDLAMGNCICK	34	
ω-ACTX-Hv1a	P56207	SPTCIPSGQPCPYNENCCSQSCTFKENENGNTVKRCD	37	3
ω-ACTX-Ar1a	P83580	SSVCIPSGQPCPYNEHCCSGSCTYKENENGNTVQRCD		
ω-ACTX Hv2a	P82852	-LLACLFGNGRCSSNRDCCELTPVCKRGSCVSSGPGLVGGILGGIL	45	
ω-ACTX Hi2a	Q9BJV9	GVLDCVVNTLGCSSDKDCCGMTPSCTLGICAPSVGGIVGGLL-NH_2	42	

ω-Aga IA содержит две цепи, они разделены пробелом. Разрывы (прочерки) в последовательности внесены для удобства сравнения. -NH_2, С-концевое амидирование — неоднократно упоминается в публикациях М. Адамса для ω-Aga III, однако в UniProt не аннотировано. А.о. раскрашены в соответствии со свойствами (как в таблице 8). Последовательность PnTx3-4 приводится согласно (548).

Таблица 17. Специфичность ω-агатоксинов.

ω-Aga	Ca_v насекомых		Ca_v млекопитающих				
	Нервно-мышечный синапс мухи	Центральные нейроны кузнечика	L	P/Q	N	R	T
IA	+	+	+	?	+	?	–
IIA	+	+	?	?	?	?	?
IIIA	–	+	+	+	+	+	–
IIIB	–	+/–	+/–	?	+	?	–
IVA	–	+	–	+	–	–	–
IVB	–	?	–	+	–	–	–

«?» означает, что тестирование для данных токсина и канала не проводилось или данные не удалось найти в литературе. «+/–» означает существенно меньшую аффинность ω-Aga IIIB к каналам центральных синапсов насекомых и L-типа в сравнении с ω-Aga IIIA.

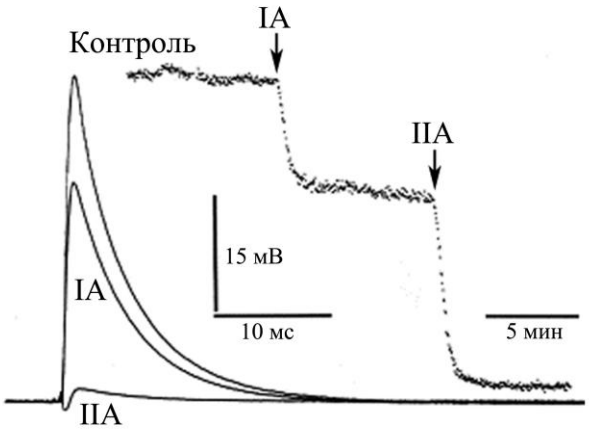
Молекулярный механизм действия ω-агатоксинов представляет особый интерес — ввиду как разнообразной специфичности, так и различий вызываемых эффектов. Несмотря на частичный блок тока, ω-Aga IIIA полностью предотвращает связывание с каналами ω-конотоксинов GVIA и MVIIC, которые полностью блокируют ток, опосредованный каналами N-типа (GVIA) или N- и P/Q-типа (MVIIC). Это было элегантно продемонстрировано как в радиолигандном анализе (549), так и с помощью электрофизиологии: приложение ω-конотоксинов к каналам, к которым уже был приложен ω-Aga IIIA в насыщающей концентрации, не приводило к дополнительному блокированию тока, в то время как приложение ω-конотоксинов в отсутствие ω-Aga IIIA полностью блокировало каналы (550). Было также продемонстрировано, что ω-Aga IIIA, в отличие от ω-конотоксина GVIA, снижает проводимость одиночных каналов (проводился анализ дисперсии амплитуды макроскопических ответов нейронов мозга крысы на деполяризацию, из которого следовала оценка одиночной проводимости) (550). В настоящее время достаточно убедительно показано, что ω-конотоксин GVIA является поровым блокатором $Ca_v2.2$ (551); аналогичный механизм приписывают другим ω-конотоксинам из-за сходства структуры или по данным конкуренции за сайт связывания. Предполагается поэтому, что ω-Aga IIIA блокирует пору Ca_v2, однако располагается во входном вестибюле так, что перекрывает проход ионам не полностью.

ω-Aga IVA не конкурирует за сайт связывания ни с ω-Aga IIIA, ни с ω-конотоксинами GVIA или MVIIC (549). Механизм его действия сходен с рассмотренным выше для GsTx-SIA: наблюдаемый блок тока через каналы $Ca_v2.1$ является следствием сдвига зависимости активации каналов от мембранного потенциала в сторону деполяризации; т.е. ω-Aga IVA относится к модуляторам воротных механизмов ионных каналов (550, 552, 553). В 2024 г. опубликована структура комплекса $Ca_v2.1$ с ω-Aga IVA (554). Разрешение в области токсина низкое (≈6 Å) и позволило только примерно оценить его расположение, однако хорошо видно, что он связывается со шпилькой S3-S4 (мотивом весла) ПЧД IV. Это подтверждается биохимическими данными: (а) здесь локализованы а.о., отличающие Q-тип (см. выше); (б) замена расположенного здесь E1658 на лизин резко снижает аффинность токсина (555). Несмотря на сходство в механизме, действие ω-Aga IVA и GsTx-SIA в отношении сдвига активационной кривой $Ca_v2.1$ носит аддитивный характер (369). По всей видимости, они взаимодействуют с различными ПЧД канала.

Наличие в яде нескольких ω-Aga тоже получило экспериментальное объяснение: ω-Aga IA и ω-Aga IIA по отдельности блокируют выброс глутамата в нервно-мышечных синапсах мухи лишь частично даже в насыщающих концентрациях, однако их действие аддитивно, и совместное приложение токсинов двух типов вызывает полный блок (рисунок 21) (537). В свою очередь, парадоксальное сочетание в одном яде μ-Aga, провоцирующих вы-

брос глутамата, и ω-Aga, блокирующих выброс нейромедиатора, объясняют различной скоростью наступления эффектов: μ-Aga нужны для быстрой и эффективной работы α-Aga, а действующие медленней ω-Aga приводят к фактически необратимому блоку Ca^{2+} каналов и длительному параличу (100).

Рисунок 21. Совместное действие ω-агатоксинов.



Уменьшение возбуждающего потенциала концевой пластинки, вызванного раздражением мотонейрона и зарегистрированного от мышцы 7A стенки тела мухи, под действием ω-Aga IA (150 нМ) и IIA (100 нМ). Слева показаны индивидуальные записи, справа — амплитуда ответов.
Рисунок адаптирован из (100) с любезного разрешения М. Адамса; лицензия Elsevier № 5100790737476.

1.11.2. Ингибиторы Ca_v из яда Phoneutria nigriventer

Не менее разнообразными представляются ингибиторы Ca_v, найденные в яде паука *Ph. nigriventer* (см. таблицу 16) (556), однако в этом случае качество имеющихся данных значительно ниже, номенклатура запутана, а для целого ряда токсинов неизвестна полная аминокислотная последовательность. PnTx3-2 (O76201; 34 a.o., 4 S-S) проявляет селективность в отношении каналов L-типа (по всей видимости, исследовалась изоформа $Ca_v1.3$) (557). PnTx3-3 ингибирует все каналы HVA-типа с наибольшей аффинностью в отношении P/Q-, и R-типа (558). PnTx3-4 (P81790; 76 a.o., 7 S-S) проявляет высокую эффективность против каналов P/Q- и N-типа и низкую — против R-типа (559). Аминокислотная последовательность этого токсина сходна с ω-Aga III и содержит еще одну дополнительную дисульфидную связь (всего семь мостиков). Наконец, PnTx3-6 (P81792; 55 a.o., 5 S-S) высокоактивен на каналах Ca_v2 (P/Q-, N- и R-типа) и менее активен на каналах L-типа (тестировался на изоформе $Ca_v1.2$) (560).

1.11.3. Инсектотоксины австралийских воронковых пауков, действующие на Ca_v

В яде австралийского воронкового паука *H. versuta* и родственных видов обнаружены две группы эффективных инсектотоксинов, получивших название ω-атракотоксинов 1 и 2 (ω-ACTX; см. таблицу 16) и впоследствии переименованных в ω-гексатоксины (ω-HXTX), из которых наиболее изучены токсины ω-ACTX Hv1a (ω-HXTX-Hv1a; P56207; 37 a.o., 3 S-S) и ω-ACTX Hv2a (ω-HXTX-Hv2a; P82852; 45 a.o., 3 S-S) (561, 562).

При инъекции ω-АСТХ Hv1a в брюшко тараканам *P. americana* медленно развивается необратимый паралич ($ПД_{50} \approx 1$ мкг/г). Приложение токсина непосредственно к метаторакальному ганглию вызывало паралич задних конечностей, чего не наблюдалось, если токсин прикладывали к нервной цепочке между брюшными ганглиями. Благодаря этому и ряду других наблюдений было предположено, что токсин воздействует на передачу сигнала между нейронами в ганглии, а не на проведение нервного импульса. Было показано, что ω-АСТХ Hv1a селективно блокирует Ca^{2+} каналы насекомых: в концентрации 1 мкМ он снижал токи в нейронах брюшных ганглиев таракана, однако практически не оказывал эффекта в отношении Ca^{2+} каналов млекопитающих L-, P/Q- и N-типа (561, 563, 564).

Многочисленные исследования показали высокую токсичность ω-АСТХ Hv1a в отношении разнообразных насекомых; более того, оказалось, что токсичность может сохраняться при пероральном введении, хотя и значительно снижается: к примеру, в отношении мух *Lucilia cuprina* $ЛД_{50} \approx 2$ мкг/г при инъекции и 200 мкг/г при пероральном введении (565). Все эти наблюдения указывают на ω-АСТХ Hv1a как кандидата для создания нового инсектицида.

Похожей специфичностью в отношении насекомых обладает ω-АСТХ Hv2a. При инъекции домашним сверчкам *A. domesticus* он вызывал немедленный и продолжительный паралич ($ПД_{50} \approx 1$ мкг/г), а повторное введение дозы токсина (≈2 мкг/г) парализованным животным приводило к их смерти. ω-АСТХ Hv2a эффективно блокировал кальциевые токи в изолированных нейронах мозга пчел ($EC_{50} \approx 0{,}1$ нМ), при этом в концентрации 1 мкМ он не оказывал влияния на препараты гладких или скелетных мышц и чувствительные нейроны позвоночных (курицы, крысы и мыши) (566).

Изучена пространственная структура токсинов ω-АСТХ Hv1a (PDB ID: 1AXH; рисунок 22) (561) и ω-АСТХ Hv2a (1G9P) (566). Оба пептида формируют классическую укладку ICK; примечательной особенностью первого служит сравнительно протяженная β-шпилька (образуемая длинной петлей между C5 и C6), а второго — неупорядоченная липофильная С-концевая область. Синтезирован аналог ω-АСТХ Hv2a без этой области (фрагмент 1–32), показано, что он сворачивается аналогично нативному токсину с образованием цистинового узла (PDB ID: 1HP3), однако теряет активность на нейронах пчелы (566). Таким образом, предполагается важная роль этой части молекулы во взаимодействии с Ca^{2+} каналами насекомых. Стоит отметить сходство ω-АСТХ Hv2a с ω-Aga IVA (см. выше): у обоих токсинов важное функциональное значение имеет С-концевой гидрофобный участок.

Выполнено аланиновое сканирование ω-АСТХ Hv1a, активность мутантов оценивалась сразу в трех тестах: токсичность на сверчках *A. domesticus* и мухах *M. domestica*, а также связывание с мембранами ЦНС таракана *P. americana*. Критически важными а.о. оказались

одни и те же: P10, N27 и R35 — они локализованы рядом в пространстве (рисунок 22) и представляют собой эпитоп, который можно использовать для получения селективных инсектотоксинов (563).

Интересно, что аналогично описанному выше κ-HXTX-Hv1c (см. раздел «Другие токсины паукообразных, воздействующие на K^+ каналы») (404), ω-ACTX Hv1a обладает свойствами положительного аллостерического модулятора nAChR в нейронах таракана (567). Более того, их сайты связывания перекрываются — предполагают, что именно nAChR служат мишенью этих токсинов, обусловливающей их инсектицидную активность. При этом наблюдаемые физиологические эффекты κ-HXTX-Hv1c и ω-ACTX Hv1a различаются — возможно, вследствие различий в селективности к разным типам nAChR. Так или иначе, в настоящее время фармакология указанных групп токсинов из яда австралийских воронковых пауков пересматривается.

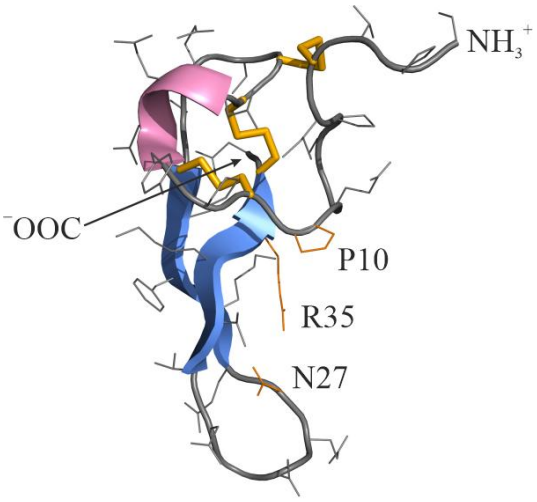


Рисунок 22. Пространственная структура и локализация функционально важных остатков ω-ACTX Hv1a (PDB ID: 1AXH). Структура в ленточном представлении, указаны N- и C-концы, окраска элементов вторичной структуры и боковых заместителей как на рисунке 20.

1.11.4. Токсины, воздействующие на рианодиновые рецепторы

В яде скорпионов (из различных семейств, но не Buthidae) обнаружены пептиды, составляющие небольшое семейство кальцинов. Эти пептиды состоят из 33–35 а.о. (см. таблицу 18), содержат шесть консервативных остатков цистеина, формирующих три S-S-мостика, и в пространстве образуют укладку цистинового узла. Они обладают уникальной способностью активировать рианодиновые рецепторы (RyR) (568). Первый охарактеризованный представитель семейства имперакальцин (569) воздействует на все три изоформы рецепторов RyR1–3 (570, 571).

Все охарактеризованные кальцины стимулируют связывание с RyR рианодина, который традиционно используется для активации этих каналов (572), и потенцируют активирующий эффект Ca^{2+}. Причем если кофеин только увеличивает активирующий эффект низ-

ких концентраций Ca^{2+}, то кальцины также снижают инактивирующий эффект высоких концентраций Ca^{2+}. Интересно, что различные кальцины показывают сильно различающиеся аффинность и эффективность. К примеру, для опикальцина-1 $K_d \approx 0{,}3$ нМ, а для урокальцина ≈400 нМ (568). На молекулярном уровне эффект кальцинов состоит в переводе RyR в особое долгоживущее открытое состояние с проводимостью, меньше наблюдаемой при обычной активации (~20–60%). При этом поскольку среднее время жизни различных состояний канала не зависело от концентрации кальцина, предполагается простая схема процесса:

$$C \leftrightarrow O \leftrightarrow O^*,$$

где C — закрытый канал, O — открытый, O^* — открытый со связанным токсином и меньшей проводимостью. Анализ данных с учетом этой схемы позволил также показать, что оцениваемые значения K_d согласуются с рассчитанными по связыванию рианодина, и предположить, что для активации канала достаточно связывания одной молекулы кальцина.

Показано также, что кальцины приводят к высвобождению Ca^{2+} из депо при приложении к клеткам. Они проникают внутрь, по всей видимости, не зависящим от эндоцитоза механизмом; кроме того, способны опосредовать проникновение в клетки более крупных молекул, будучи с ними связанными (573, 574). Эти свойства сближают кальцины с гетерогенной группой т.н. «проникающих в клетки пептидов» (англ. cell-penetrating peptides, CPP) (575). Действительно, наблюдается определенное сходство С-концевой половины кальцинов и наиболее исследованных CPP, Tat и пенетратина, а именно, насыщенность положительно заряженными а.о., главным образом аргинином. Стоит оговориться, что несмотря на 30-летнюю историю изучения CPP, в настоящее время отсутствует консенсус насчет механизма проникновения через мембраны, а тем более в комплексе с грузом.

Таблица 18. Кальцины из яда скорпионов, активирующие RyR.

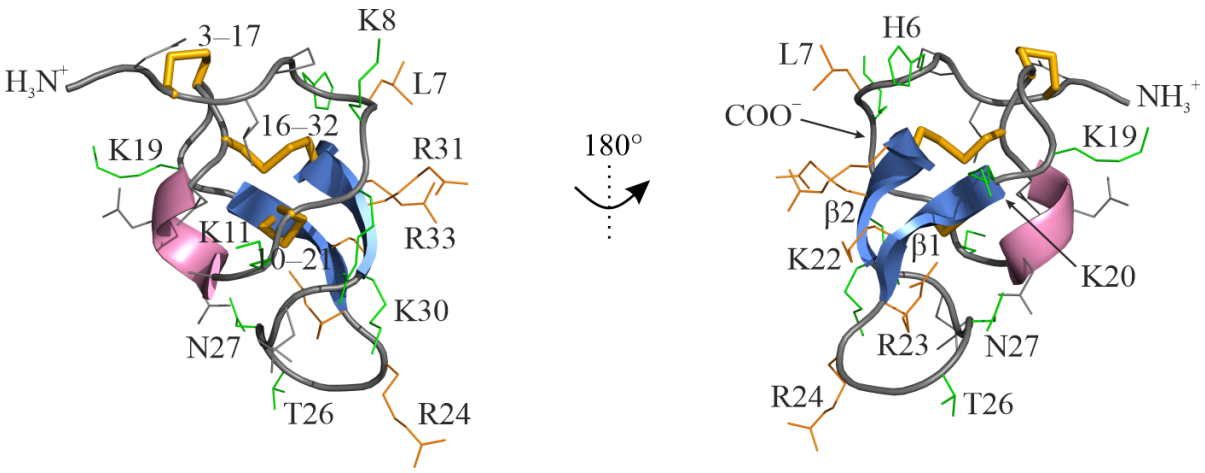
Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.
		1 5 10 15 20 25 30 33	
Имперакальцин	P59868	--GDCLPHLKRCKADNDCCGKKCKRRGTNAEKRCR	33
Опикальцин-1	P60252	--GDCLPHLKRCKENNDCCSKKCKRRGTNPEKRCR	
Опикальцин-2	P60253	--GDCLPHLKRCKENNDCCSKKCKRRGANPEKRCR	
Гемикальцин	A0A1L4BJ42	--GDCLPHLKLCKADKDCCSKKCKRRGTNPEKRCR	
Маурокальцин	P60254	--GDCLPHLKLCKENKDCCSKKCKRRGTNIEKRCR	
Вейокальцин	P0DPT1	--ADCLAHLKLCKKNNDCCSKKCSRRGTNPEQRCR	
Интрепикальцин	P0DM30	--ADCLAHLKLCKKNKDCCSKKCSRRGTNPEQRCR	
Урокальцин	L0GBR1	--KDCLKKLKLCKENKDCCSKSCKRRGTNIEKRCR	
Гадрукальцин	B8QG00	SEKDCIKHLQRCRENKDCCSKKCSRRGTNPEKRCR	35

Прочерки добавлены для удобства сравнения последовательностей. А.о. раскрашены в соответствии со свойствами (как в таблице 8). В последовательности имперакальцина подчеркнуты критически важные а.о. (см. пояснения в тексте).

Пространственная структура исследована для двух представителей семейства: имперакальцина (PDB ID: 1IE6) (576) и маурокальцина (1C6W) (577). В обоих случаях имеет место типичный мотив ICK, подробно обсуждавшийся выше и характерный главным образом для токсинов пауков. Для этих же пептидов выполнено аланиновое сканирование (576, 578, 579). В результате были идентифицированы критически важные а.о. для активности имперакальцина на RyR1 скелетных мышц кролика (усиления связывания с RyR рианодина; см. таблицу 18, рисунок 23): L7, K22, R23, R24, R31 и R33. Кроме того, ряд а.о. оказался средней важности: H6, K8, R9, K11, K19, K20, G25, T26, N27 и K30. Очень похожие данные получены для маурокальцина. На рисунке 23 хорошо видно, что критически важные а.о. локализованы на одной стороне молекулы кальцина, в то время как а.о. средней важности отделяют кластер критически важных а.о. от неважных.

Несмотря на большой объем накопленных данных, касающихся воздействия кальцинов на RyR, необходимо отметить невыясненные в настоящее время аспекты. Во-первых, стоит помнить, что RyR расположен на мембране эндоплазматического ретикулума и сайт связывания кальцинов локализован, по всей видимости, с цитоплазматической стороны. Поскольку окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы таков, что тиольные группы находятся преимущественно в восстановленной форме, а в составе кальцинов имеются три дисульфидные связи, непонятно, в какой именно форме пептиды взаимодействуют с рецепторами *in vivo*. Во-вторых, сайт связывания кальцинов с RyR не установлен: имеются лишь данные крио-ЭМ низкого разрешения (580). Наконец, кальцины — крупные гидрофильные молекулы, и хотя сообщалось об их способности проникать через биомембраны (см. выше), механизм такого проникновения не изучен.

Рисунок 23. Пространственная структура и локализация функционально важных остатков имперакальцина (PDB ID: 1IE6). Структура в ленточном представлении, указаны N- и C-концы, окраска элементов вторичной структуры и боковых заместителей как на рисунке 8. Отмечены функционально важные а.о.; слева обозначены S-S-связи, а справа — β-тяжи.



1.12. Токсины, воздействующие на болевые рецепторы

Как говорилось выше, главными функциями яда паукообразных являются нападение и обездвиживание жертвы и защита от агрессора. И если в первом случае ведущую роль играют токсины, приводящие к параличу и воздействующие на соответствующие молекулярные мишени, например Na_v, то во втором случае, пожалуй, основное место принадлежит токсинам, вызывающим острую болевую реакцию. Спровоцировать острый болевой ответ (ноцицепцию) можно путем возбуждения чувствительных нейронов, что, в свою очередь, может происходить разными способами. Наиболее простые из них не отличаются специфичностью действия именно в отношении афферентов. Например, упомянутая высокая концентрация ионов калия в ядах приводит к деполяризации в том числе и мембран чувствительных нейронов. Аналогичен эффект цитолитических белков и пептидов: их действие зачастую неспецифично в отношении клеточных мембран, затронутыми оказываются и чувствительные нейроны (581, 582).

Другой способ — действие через медиаторы воспаления, которые также вызывают болевую реакцию. Такой механизм предполагается для яда ос и других перепончатокрылых, в котором содержатся компоненты, вызывающие дегрануляцию тучных клеток (583-585). По-видимому, некоторые яды паукообразных вызывают аналогичный эффект. Стоит также отметить, что некоторые яды насекомых и паукообразных сами содержат медиаторы воспаления, например гистамин (586, 587).

Третья возможность возбуждения чувствительных нейронов — воздействие на Na_v, экспрессируемые этими клетками. По сегодняшним представлениям, именно этим обусловлен болевой эффект укуса скорпионов: содержащиеся в яде активаторы Na_v возбуждают чувствительные нейроны (426, 588, 589). Наибольшее внимание исследователи уделяют изоформе $Na_v1.7$, экспрессия которой характерна для афферентов и мутации с потерей функции в гене которой приводят к врожденной нечувствительности к боли (590).

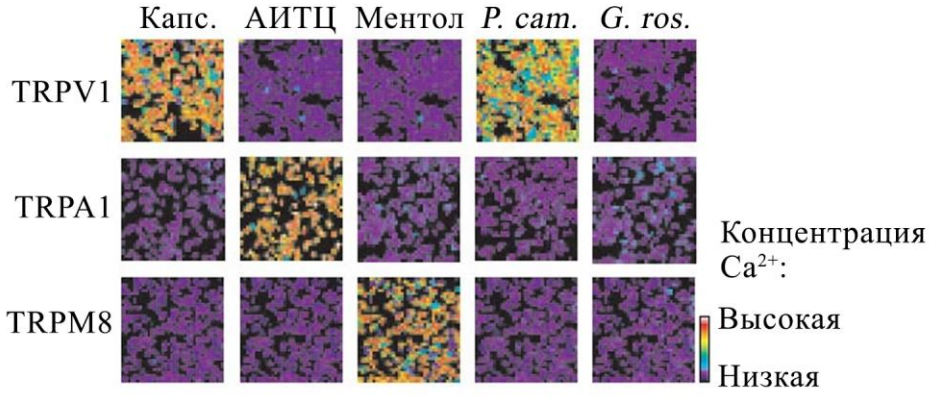
Наконец, еще одним способом спровоцировать боль является активация специализированных болевых рецепторов — ионных каналов чувствительных нейронов, в норме открывающихся в ответ на болевую стимуляцию. Например, в яде некоторых паукообразных содержится АТФ (194), и активация пуринергических рецепторов $P2X_3$ сенсорных нейронов вызывает боль при укусе. В яде ряда ямкоголовых змей содержатся миотоксины, провоцирующие выброс АТФ из мышц, в результате чего так же активируются $P2X_3$ рецепторы (591, 592). А в яде Техасского кораллового аспида *Micrurus tener* содержится гетеромерный белковый токсин MitTx, активирующий кислоточувствительные ионные каналы (ASIC, acid-sensing ion channels) сенсорных нейронов (593). В яде паукообразных же обнаружены полипептидные токсины, активирующие термочувствительные ионные каналы.

Кроме того, по-видимому, в силу высокого разнообразия молекулярного состава яда паукообразных были также найдены *ингибиторы* болевых рецепторов. Биологическая функция этих соединений — загадка, однако очевиден потенциал их использования человеком.

1.12.1. Токсины, воздействующие на терморецепторы (каналы TRPV1)

В лаборатории Д. Джулиуса (Калифорнийский университет в Сан-Франциско, США) были обнаружены полипептидные токсины пауков, активирующие термочувствительные ионные каналы из ванилоидного семейства TRPV1 (transient receptor potential channel vanilloid family). Для поиска веществ, воздействующих на этот канал, была использована система скрининга, в которой ген крысиного TRPV1 был экспрессирован в клетках HEK293, а активность каналов регистрировалась с помощью кальциевого имиджинга (использовался краситель Fura-2) ввиду их высокой кальциевой проводимости (рисунок 24). Оказалось, что ряд ядов пауков активирует TRPV1, и из них можно получить индивидуальные токсины, проявляющие эту способность. Первыми были обнаружены т.н. «ваниллотоксины» (VaTx1–3; 34–35 а.о., 3 S-S, ICK; таблица 8) из яда тринидадского шеврона *Psalmopoeus cambridgei* (371), а позднее в яде *C. schmidti* был найден DkTx (от англ. double-knot toxin) (594).

Рисунок 24. Система поиска активаторов болевых рецепторов. Клетки HEK293, экспрессирующие гены рецепторов и содержащие краситель Fura-2, обрабатывали капсаицином (Капс.), аллилизотиоцианатом (АИТЦ), ментолом или инкубировали с ядом *P. cambridgei* (*P. cam.*) или *G. rosea* (*G. ros.*). Показаны изображения прикрепленных к предметным стеклам клеток, полученные с использованием флуоресцентного микроскопа. Рисунок заимствован из (371).



Ваниллотоксины активируют TRPV1, проявляя микромолярное сродство; наиболее аффинным и селективным из них является VaTx3 (P0C246), интересно, что при повышении температуры его аффинность повышается ($EC_{50} \approx 1$ мкМ при 24 °C и 0,2 мкМ при 34 °C). Важно, что VaTx взаимодействуют с каналом снаружи клетки, в отличие от ванилоидных

агонистов типа капсаицина. DkTx похож на VaTx: это полипептидный активатор TRPV1, воздействующий на внеклеточный сайт рецептора. При этом DkTx уникален как в структурном отношении (содержит два ноттиновых домена, отсюда его название), так и функционально — он проявляет высокую селективность и фактически необратимость действия (см. подробнее об этом токсине ниже в разделе «Токсины с двумя ICK-доменами»).

VaTx1 и 2 являются также ингибиторами K_v2.1, при этом VaTx1 взаимодействует с участком, перекрывающимся с местом связывания HaTx1 (замены соответствующих а.о. приводят к снижению активности токсина), т.е. с мотивом весла (см. раздел «Ингибиторы активации K_v из яда пауков», рисунок 12). Место связывания VaTx1 в каналах TRPV1 перекрывается с DkTx (см. подробнее ниже в разделе «Токсины с двумя ICK-доменами»), т.е. в данном случае токсин взаимодействует с ПД (594).

Китайскими исследователями сообщается, что токсин BmP01 (Q9U8D2; α-KTx 8.2; 29 а.о., 3 S-S), слабый KTx из яда скорпиона *M. martensii* (595), активирует каналы TRPV1 (596). BmP01 вызывал болевую реакцию у мышей при введении в подушечку лапы и аналогично капсаицину терял эффективность в случае мышей, нокаутных по гену *Trpv1*. Однако его эффективность в отношении TRPV1 чрезвычайно низка в физиологических нейтральных условиях (pH 7,3): $EC_{50} \approx 130$ мкМ. Возможное разрешение противоречия заключается в том, что при закислении (pH 6,5) эффективность BmP01 значительно возрастает: $EC_{50} \approx 4$ мкМ (94). Как мы отмечали, яд скорпионов имеет слабую кислую реакцию (см. «Молекулярный состав яда паукообразных»), так что, возможно, имеет место синергия активаторов TRPV1 с кислотностью яда. Кроме того, похожей активностью обладают другие члены подсемейства α-KTx 8, возможно, это их природная функция.

Картирование сайта связывания BmP01 с каналом TRPV1 было проведено путем получения химер с TRPV3, который нечувствителен к действию токсина, а также сайт-направленным мутагенезом (94). В результате оказалось, что токсин взаимодействует с ПД, и для его активности принципиально важны а.о. петли P-S6. А мутагенез токсина выявил важный для активности токсина а.о. K23. Двойной мутагенез позволил предположить взаимодействие этого а.о. с E649 (нумерация по белку мыши, локализован в P-S6), одним из а.о., важных для чувствительности TRPV1 к внеклеточному закислению (597).

Другая китайская группа охарактеризовала два токсина из яда паука *C. hainanus*, активирующие TRPV1: хайнантоксины-21 и 22 (HNTX-XXI и XXII) (598). Бразильскими исследователями сообщается, что токсин PnTx3-5 (P81791) из яда паука *Ph. nigriventer* ингибирует каналы TRPV1 и не воздействует на TRPA1 (599). В этой же статье говорится, что PnTx3-5 обладает сильно выраженной анальгетической активностью при инъекции 100 фмоль крысе (≈1,5 нг/кг). Такая доза соответствует эффективным дозам самых сильных ток-

синов, известных человечеству, и на много порядков меньше заявленных эффективных концентраций PnTx3-5 в отношении TRPV1 ($IC_{50} \approx 50$ нМ). Кроме того, в ней же говорится о получении рекомбинантного токсина с аналогичными природному свойствами, однако утверждается, что получен пептид из 36 а.о. с делецией С-концевой области с последними двумя остатками цистеина. Очевидно, что такой пептид не будет формировать нативную укладку цистинового узла. Ко всему этому исследованию стоит относиться очень осторожно.

1.12.2. Токсины, воздействующие на рецепторы раздражающих веществ (каналы TRPA1)

Ранее мы отмечали, что в яде скорпиона *U. manicatus* найден токсин WaTx, по структуре относящийся к к-KTx (раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов»), выступающий активатором каналов TRPA1 (362). Для поиска активных ядов и их компонентов использовалась система, аналогичная упомянутой ранее для TRPV1 (рисунок 24): ген канала экспрессировали в клетках HEK293, а о его работе судили по увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в ответ на приложение аллилизотиоцианата (АИТЦ). WaTx активировал TRPA1 с высоким сродством ($EC_{50} \approx 15$ нМ) и характеризовался селективностью: он не воздействовал на TRPV1, TRPM8 и ряд K_v.

WaTx вызывал болевую реакцию у мышей при введении в подушечку лапы и терял эффективность в случае мышей, нокаутных по гену *Trpa1* (362). Любопытно, что в методе пэтч-кламп токсин проявлял способность активировать TRPA1 как в конфигурации outside-out, так и inside-out, а флуоресцентно-меченый пептид обладал способностью проникать через липидный бислой. Для поиска участка канала, с которым взаимодействует WaTx, были получены химеры TRPA1 человека, чувствительного к токсину, и змеи, проявлявшего устойчивость. Оказалось, что за чувствительность к WaTx отвечает С-концевая область внутриклеточного TRP-домена — здесь же связываются ковалентные активаторы типа АИТЦ (600), при этом принципиальное значение в канале человека имеет остаток P622 (362). В отличие от АИТЦ, который увеличивает вероятность открытия канала, WaTx стабилизирует открытое состояние TRPA1. Кроме того, при приложении токсина менялась ионная селективность канала. Надо сказать, что эти два свойства — способность проникать через мембрану и влиять на селективность канала — представляются удивительными и нуждаются в независимой проверке. В частности, непонятно, что происходит с дисульфидными связями пептида при попадании в цитоплазму. А изменения ионной селективности подразумевают структурные изменения в селективном фильтре, что необходимо требует значительного аллостерического сопряжения между сайтом связывания токсина и внешней частью поры канала.

Селективные ингибиторы TRPA1 из яда паукообразных в настоящее время не получены, однако известен ряд неселективных. К примеру, упоминавшийся выше ProTx I из *Th. pruriens*, неселективный ингибитор активации K_v, Na_v и Ca_v, как оказалось, воздействует и на TRPA1 (511); упоминавшийся выше PnTx3-6 из *Ph. nigriventer*, ингибитор Ca_v, тоже, как предполагается, угнетает TRPA1 (601).

1.12.3. Токсины, воздействующие на рецепторы кислоты (каналы ASIC)

В лаборатории М. Лаздунского (Институт молекулярной и клеточной фармакологии, София-Антиполис, Франция) из яда паука *P. cambridgei* был получен псалмотоксин (PcTx1; P60514; 40 a.o., 3 S-S, ICK), ингибитор кислоточувствительных каналов ASIC 1a, ставший одним из наиболее используемых инструментов изучения этих белков (602). Утверждается, что одновременно исследовался похожий по структуре и свойствам токсин Hm3a (C0HKD0; 37 a.o., 3 S-S) из яда *H. maculata*, результаты были опубликованы намного позднее (603). А еще анализ транскриптома ядовитых желез австралийского воронкового паука *Hadronyche infensa* (Atracidae) позволил выявить последовательности, кодирующие сходные с PcTx1 полипептиды Hi1a–d, содержащие два ноттиновых домена (см. подробнее о них ниже в разделе «Токсины с двумя ICK-доменами») (604).

PcTx1 проявляет высокую аффинность ($IC_{50} \approx 1$ нМ) и селективность в отношении изоформы ASIC 1a и не воздействует на каналы ASIC 2a или 3. В первой статье, посвященной этому токсину, указывалось на его абсолютную селективность, в частности, отсутствие эффекта на ASIC 1b и гетеромеры ASIC 1a/b; кроме того, механизм действия в деталях не рассматривался, и создавалось впечатление, что речь идет о «простом» блокаторе (602). Однако затем было показано, что:

(а) PcTx1 является модулятором — он увеличивает pH-чувствительность («аффинность к протонам») ASIC 1a, при этом стимулируя как открытие канала, так и его переход в десенситизированное состояние; последний эффект лежит в основе наблюдаемого ингибирования (605);

(б) токсин воздействует также на ASIC 1b с меньшей аффинностью ($EC_{50} \approx 100$ нМ), при этом в отличие от ASIC 1a в данном случае он преимущественно стимулирует открытие канала и замедляет десенситизацию (606);

(в) дифференциальный эффект PcTx1 в отношении ASIC 1a/b объясняется различиями в небольшой части аминокислотной последовательности каналов (606);

(г) PcTx1 активирует ASIC 1 курицы (607);

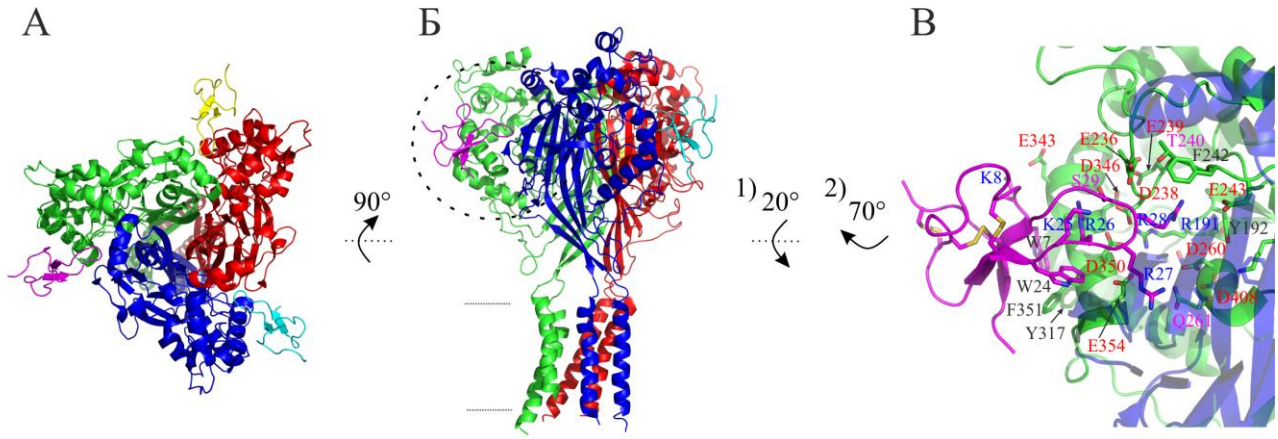
(д) он ингибирует гетеромерные ASIC 1a/2a крысы (608) и ASIC 1a/2b мыши (609),

(е) все эти эффекты в той или иной степени pH-зависимы.

Таким образом, PcTx1 представляет собой модулятор каналов ASIC сложного действия, активность которого зависит от изоформы каналов, их субъединичного состава, животного-источника и условий тестирования. К примеру, он выступает модулятором сложного действия по отношению к ASIC 1 курицы: снижает пиковую амплитуду тока и индуцирует неинактивирующийся Na^+-селективный ток при активации каналов при pH 5,5 и выступает агонистом, индуцирующим неселективный ток, при pH 7,25 (607).

В настоящее время изучена пространственная структура комплекса PcTx1 с этим каналом (его аналогом с укороченными цитоплазматическими N- и C-концевыми областями) при различных pH (на рисунке 25 показана структура при pH 5,5) (607, 610), при этом токсин был использован как инструмент для стабилизации открытого состояния канала. PcTx1 связывается в области межсубъединичного контакта ASIC 1, и его сайт связывания перекрывается с областью предположительного сенсора pH, насыщенной отрицательно заряженными а.о. (рисунок 25В).

Рисунок 25. Структура комплекса ASIC 1 курицы с псалмотоксином (PcTx1) при pH 5,5 (PDB ID: 4FZ0). (А) Вид «сверху», т.е. на плоскость мембраны со внеклеточной стороны. Мономеры ASIC 1 и три молекулы PcTx1 окрашены разными цветами. (Б) Вид «сбоку», т.е. со стороны мембраны, предполагаемое положение полярных головок липидов обозначено пунктирными отрезками слева. (В) Увеличенное изображение сайта связывания токсина. Показаны два мономера ASIC 1 в виде полупрозрачных ленточных моделей, дисульфидные мостики и боковые цепи а.о. токсина, взаимодействующих с каналом, а также а.о. канала, локализованных вблизи сайта связывания токсина. Положительно заряженные а.о. обозначены синим шрифтом, отрицательно заряженные — красным, гидрофильные незаряженные — малиновым, гидрофобные — черным.



1.13. Другие дисульфид-богатые пептиды из яда паукообразных

Разнообразие токсинов паукообразных не исчерпывается описанными выше. Важно понимать, что для некоторых компонентов яда паукообразных показана токсичность в отношении тех или иных организмов, однако молекулярная мишень действия не установлена. Мы уделим внимание некоторым из этих соединений, например группе токсинов, о которой речь пойдет сейчас, — ввиду ее большой значимости в историческом аспекте и для современных медицинских разработок.

1.13.1. Короткие инсектотоксины из яда скорпионов

В середине 1970-х гг. под руководством Е.В. Гришина в ИБХ АН СССР из яда скорпиона *M. eupeus* был выделен инсектотоксин I1, состоящий из 36 а.о. (611), который заметно отличался от известных ранее токсинов из яда скорпионов, сравнительно более длинных. Это позволило отнести I1 к новой группе токсинов скорпионов, т.н. «коротких инсектотоксинов». Позднее из того же яда был выделен целый ряд сходных пептидов (I3, I4, I5, I5A), а для I5A (P15222; 35 а.о., 4 S-S) была изучена пространственная структура (впервые для коротких токсинов скорпионов) (612, 613). В настоящее время известно ≈15 пептидов, составляющих семейство коротких (34–38 а.о.) инсектотоксинов (таблица 19), для всех характерно наличие восьми инвариантных остатков цистеина, образующих четыре внутримолекулярные дисульфидные связи (C^1–C^4, C^2–C^6, C^3–C^7 и C^5–C^8).

Наиболее известен другой пептид семейства, хлоротоксин (ClTx; P45639; 36 а.о., 4 S-S), полученный из яда скорпиона *L. q. quinquestriatus* в начале 90-х годов (614). «Говорящее» название этого токсина указывает на предполагаемую мишень: авторы считали, что они открыли первый специфичный ингибитор хлоридных (Cl^-) каналов пептидной природы. Позднее было показано, что ClTx специфично присоединяется к клеткам глиом, что послужило толчком бурному развитию области, связанной с возможным практическим применением ClTx и сходных пептидов. Важно отметить, что в дальнейшем было показано, что ClTx и другие короткие инсектотоксины не являются ингибиторами Cl^- каналов различных типов, в том числе характерных для глиом (615, 616). Таким образом, «хлоротоксин» — это ошибочное название; к сожалению, оно прочно закрепилось в литературе и служит причиной чрезвычайно распространенного заблуждения, что короткие инсектотоксины блокируют Cl^- каналы.

Таблица 19. Короткие инсектотоксины из яда скорпионов.

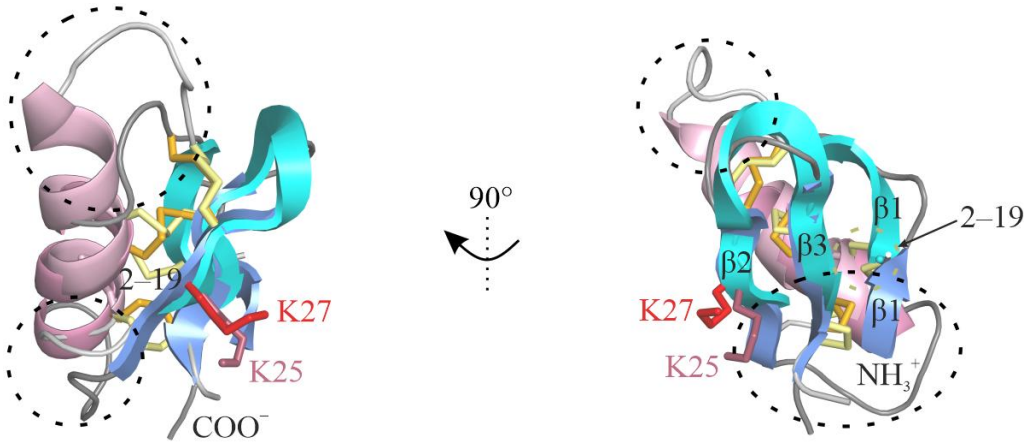
Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.
		1 5 10 15 20 25 30 35	
I5A	P15222	MCMPCFTTDPNMAKKCRDCCGGNG--KCFGPQCLCNR-NH_2	35
I4	P60269	MCMPCFTTDHNMAKKCRDCCGGNG--KCFGPQCLCNR-	
I5	P60270	MCMPCFTTDPNMANKCRDCCGGGK--KCFGPQCLCNR-	
MeuClTx	P86401	MCMPCFTTDHNMAKKCRDCCGGNG--KCFGYQCLCNR-NH_2	
MeuClTx-1	P86402	MCMPCFTTRPDMAQQCRDCCGGNG--KCFGYQCLCNR-NH_2	
I1	P15220	MCMPCFTTRPDMAQQCRACCKGRG--KCFGPQCLCGYD	36
BmK CT	Q9UAD0	-CGPCFTTDANMARKCRECCGGIG--KCFGPQCLCNRI	35
GaTx1	P85066	-CGPCFTTDHQMEQKCAECCGGIG--KCYGPQCLCNR-NH_2	34
I3	P60268	MCMPCFTTDHQTARRCRDCCGGRGR-KCFG-QCLCGYD	36
ClTx	P45639	MCMPCFTTDHQMARKCDDCCGGKGRGKCYGPQCLCR--	
Lqh-8/6	P55966	RCSPCFTTDQQMTKKCYDCCGGKGKGKCYGPQCICAPY	38
AaCtx	P86436	MCIPCFTTNPNMAAKCNACCGSR-RGSCRGPQCIC---	34
BTChl1	P83400	RCPPCFTTNPNMEADCRKCCGGR--GYCASYQCICPG-	35
BTChl2	P81761	RCGPCFTTDPQTQAKCSECCGRKG-GVCKGPQCICGIQ	37

Сверху нумерация для I5A. Разрывы и прочерки добавлены для удобства сравнения последовательностей. А.о. раскрашены в соответствии со свойствами (как в таблице 8). -NH_2, С-концевое амидирование — согласно аннотации в UniProt.

Изучена пространственная структура I5A (PDB ID: 1SIS), ClTx (1CHL) (617), I1 (6AVA) (401) и Lqh-8/6 (618) (для него нет данных в PDB), во всех случаях представленная укладкой CSα/β. По размеру и укладке эти пептиды близки KTx (см. выше раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов»). Три дисульфидные связи совпадают у α-KTx и коротких инсектотоксинов, которые содержат еще четвертую связь (C^1–C^4). Любопытно, что не только похожи их пространственная укладка и S-S-мостики, но в составе большинства коротких инсектотоксинов имеется остаток лизина (K25 у I5A), соответствующий принципиально важному у α-KTx (K27 у CTX; см. сравнение структуры I5A и CTX на рисунке 26).

Несмотря на близкое сходство с KTx, в настоящий момент нет убедительных данных, показывающих активность коротких инсектотоксинов на K^+ каналы. В описании MeuClTx в UniProt (P86401) без ссылки на статью указано, что этот пептид ингибирует каналы K_v1.2. С другой стороны, известно, что ClTx в концентрации 25 мкМ не ингибирует K_v1.3 (619), а GaTx1 в концентрации 100 нМ не ингибирует K_v1.1 (616). Отсутствие активности на K_v вполне объяснимо структурно: внимательное сравнение коротких инсектотоксинов с KTx показывает, что у них различаются длины двух петель на противоположных сторонах молекул (см. рисунок 26). Короткие инсектотоксины не могут взаимодействовать с K_v аналогичным KTx способом: их протяженная петля между вторым и третьим остатками цистеина не позволяет занять такое же положение в устье поры, чтобы ключевой остаток лизина взаимодействовал с селективным фильтром.

Рисунок 26. Сравнение структуры I5A (PDB ID: 1SIS) и CTX (2CRD). Пептиды показаны в ленточном представлении, отмечены N- и C-концы. У CTX окраска элементов вторичной структуры и бокового заместителя K27 как на рисунке 7; у I5A: дисульфидные мостики показаны светло-желтым, спиральные участки — светло-розовым, β-тяжи — бирюзовым, петлевые участки — светло-серым, K25 — темно-розовым. Дополнительный дисульфидный мостик у I5A подписан слева и обведен цветным кружком справа. Отличающиеся по длине петли обведены черными овалами.



Более того, несмотря на 45-летнее изучение коротких инсектотоксинов, крайне мало известно об их природной биологической активности. Для большинства изучавшихся с этой точки зрения пептидов показана инсектицидная активность. К примеру, I1, I3 и I5 вызывают паралич у тараканов *Nauphoeta cinerea* в дозе ≈ 5 мкг/г, а I4 — в дозе ≈ 10 мкг/г (104, 611, 620), ClTx парализует тараканов *P. americana* в такой же дозе (614). По-видимому, короткие инсектотоксины безвредны для млекопитающих; это показано, например, для тех же I1, I3, I4, I5 и ClTx (104, 611, 620, 621). Для BmK CT сообщалось о токсичности на мышах; по всей видимости, этот результат является ошибочным, поскольку рекомбинантный BmK CT, полученный и использовавшийся авторами того исследования, имел Мм = 18 кДа, не соответствующую его аминокислотной последовательности (см. в таблице 19) (622).

Молекулярный механизм действия коротких инсектотоксинов далек от понимания. С.М. Антоновым и Л.Г. Магазаником в Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова АН СССР в электрофизиологических экспериментах на нервно-мышечном сочленении личинки мясной мухи было показано, что I5 в концентрации ≈ 2,5 мкМ уменьшает на 50% чувствительность постсинаптических GluR (620). Других данных, которые позволили бы судить о мишени коротких инсектотоксинов, в настоящее время нет.

В конце 1990-х гг. было обнаружено, специфическое присоединение ClTx к клеткам глиом — для этого использовали ^{125}I-меченый ClTx и метод радиоавтографии (623). Позднее получены данные, что ClTx связывается с рядом других опухолевых клеток (624). Было также показано, что ClTx снижает подвижность клеток человеческой глиобластомы (625). По-

хожие свойства были обнаружены и у других пептидов семейства (626, 627). В настоящее время существует несколько кандидатов на роль акцептора ClTx на поверхности клеток глиом: Cl^- каналы семейства ClC (628), матриксная металлопротеиназа 2 (MMP-2) (629), аннексин A2 (630) и рецептор фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) нейропилин-1 (NRP1) (631). В зависимости от предполагаемого акцептора варьируют и предложенные модели механизма действия ClTx — его способности снижать инвазивность опухолевых клеток. Следует отметить, что в литературе имеются противоречивые данные (о Cl^- каналах говорилось выше) и не сформирован консенсус насчет истинной природы акцептора. Упомянутые предполагаемые акцепторные молекулы могут находиться в составе сложных белковых комплексов и взаимодействовать друг с другом, что может отчасти объяснить противоречия. При этом уникальная способность ClTx метить опухолевые клетки послужила бурному изучению возможностей его практического использования в медицине (подробней см. в разделе «Потенциал компонентов яда паукообразных для разработки лекарств»).

1.13.2. Пептиды, воздействующие на Cl^- каналы

Выше говорилось, что самый известный токсин в области (ClTx) на самом деле не взаимодействует с Cl^- каналами. Тем не менее, из яда скорпионов получены токсины, которые способны воздействовать на эти мишени. Конкретнее, из яда *L. q. hebraeus* был выделен GaTx1 (P85066; 34 a.o., 4 S-S; см. таблицу 19), который по сходству последовательности относится к группе коротких инсектотоксинов (616). Этот токсин обладает способностью модулировать каналы CFTR (англ. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе), Cl^- каналы, относящиеся к суперсемейству ABC-транспортеров. При приложении с цитоплазматической стороны GaTx1 угнетает токи, опосредованные CFTR, $K_d \approx 40–100$ нМ в зависимости от концентрации АТФ.

Из яда того же *L. q. hebraeus* был получен GaTx2 (P80670; 29 a.o., 3 S-S), который ингибирует Cl^- каналы ClC-2 (632). В этом случае токсин активен при приложении с внеклеточной стороны и демонстрирует очень высокую аффинность: $K_d \approx 10–50$ пМ. Механизм действия GaTx2 на ClC-2 сложен: максимальный уровень блока составляет 60–80% в зависимости от техники эксперимента, сила ингибирования зависит от мембранного потенциала (больше при деполяризации), токсин не воздействует на открытые каналы и замедляет их открытие, связываясь, по-видимому, с закрытым состоянием. По последовательности и пространственной структуре (633) GaTx2 близок α-KTx (классифицирован как α-KTx 8.3), поэтому вполне вероятно, что он способен блокировать K^+ каналы (тестировался только на $K_v1.2$ и Shaker при 10–20 нМ, не показал активности).

Оба токсина, воздействующие на Cl^- каналы, были изучены только одной группой и не получили распространения в качестве исследовательских инструментов, вопреки ожиданиям, ведь они остаются единственными примерами высокоаффинных пептидных лигандов CFTR и ClC. У обоих серьезные недостатки: сложный механизм действия и зависимость эффективности от условий эксперимента. GaTx1 и вовсе малоприменим: по всей видимости, он не способен проникать через биомембраны и соответственно не может достичь внутриклеточного сайта связывания с CFTR без специальных манипуляций (данные предоставлены Н. Маккарти, Эморийский университет, США).

1.13.3. Компоненты, потенцирующие действие токсинов

Особняком стоят компоненты яда, которые сами по себе не обладают выраженной активностью и для которых в настоящее время не обнаружена специфическая мишень. В некоторых случаях предполагается, что эти компоненты выступают своеобразными «усилителями» действия основных токсичных компонентов тех же ядов.

Пожалуй, лучше всего в этом смысле исследован CSTX-13 из яда *C. salei* (P83919; 63 а.о., 4 S-S) (634). Это необычный двуцепочечный токсин, две пептидные цепи которого (34 и 29 а.о.) удерживаются вместе двумя S-S-мостиками (см. рисунок 34 в разделе «Биосинтез токсинов паукообразных»). Если расположить аминокислотные последовательности двух цепей CSTX-13 друг за другом, окажется, что остатки цистеина обеих цепей формируют характерный мотив, соответствующий ноттиновой (ICK) укладке. Более того, обе цепи кодируются одним геном, и CSTX-13 синтезируется в виде непроцессированного предшественника, который подвергается протеолизу с отщеплением короткого пептида, соединяющего цепи зрелого токсина (см. ниже раздел «Биосинтез токсинов паукообразных»). CSTX-13 сам по себе обладает сравнительно невысокой токсичностью в отношении насекомых [$ЛД_{50} \approx$ 0,12 мг/г на *D. melanogaster*; в ≈50 раз менее токсичен в сравнении с главным токсином яда *C. salei* CSTX-1 (см. о нем подробнее ниже в разделе «Токсины, содержащие линейный и ICK-домен») и даже в ≈3 раза менее активен цитолитического купиеннина-1a]. Однако при совместном введении он существенно увеличивает токсичность CSTX-1 — даже в дозе, в 400 раз ниже его $ЛД_{50}$; при инъекции в молярном отношении 1 : 1 $ЛД_{50}$ CSTX-1 снижалась в 7 раз (635). Стоит отметить, что по структурной организации CSTX-13 походит на CSTX-1 и потому может рассматриваться как «модульный» токсин (см. о таких токсинах ниже).

Другой интересный пример представлен компонентом яда каракурта. Дело в том, что даже высокоочищенные препараты α-LTX (подробнее о латротоксинах см. ниже в специальной главе) содержат второй сравнительно низкомолекулярный компонент с Мм ≈ 8 кДа. Его называют «латродектин» или LMWP (от англ. low molecular weight protein; P49125; 70 а.о., 3

S-S) (636-638). LMWP не обладает собственной токсичностью, не имеет порообразующей активности в БЛМ и по своему строению напоминает представителей распространенного семейства белков первичноротых, к которому относится гипергликемический гормон ракообразных (639). Предполагается, что его функциональная роль заключается в потенцировании биологической активности α-LTX, однако убедительных данных насчет его механизма действия не получено. Кроме того, в яде американского домового паука *Eratigena agrestis* (Agelenidae) обнаружены сходные по строению с LMWP компоненты, также гомологичные гипергликемическим гормонам, которые проявляют инсектотоксичность (640, 641).

1.13.4. Другие малочисленные группы

1.13.4.1. Токсины, воздействующие на механорецепторы

В настоящее время из яда паукообразных не выделены селективные лиганды механорецепторов. Это связано, в частности, со сложностью тест-систем для поиска таких лигандов и сравнительно малой изученностью механорецепторов. В литературе получило распространение упоминание пептида GsMTx-4 (Q7YT39; 34 a.o., 3 S-S; таблица 8) из яда паука *G. rosea* как ингибитора механочувствительных ионных каналов (370, 642-644). Вопреки желанию открывателей, этот пептид оказался крайне не селективным: в микромолярных концентрациях он проявляет ингибирующую активность не только в отношении механочувствительных, но также ряда K^+ и Na^+ каналов (399) и nAChR (645), а также антимикробную активность (286). По сходству последовательности GsMTx-4 относится к группе модуляторов воротных механизмов ионных каналов, подробно рассмотренной нами выше (см. разделы «Ингибиторы активации K_v и Na_v из яда пауков»). Его биологические свойства, по всей видимости, есть результат высокого мембранного сродства: эффекты в отношении ионных каналов проявляются вследствие изменения свойств бислоя после адсорбции пептида.

1.13.4.2. Ингибиторы протеаз

Выше мы упоминали обнаруженные в яде скорпионов блокаторы K^+ каналов δ-KTx, которые также являются ингибиторами сериновых протеаз и походят на BPTI (раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов»). А вот в яде скорпиона *Tityus obscurus* (Buthidae) был обнаружен пептид ToPI1 (A0A6P3CW73; 33 a.o., 3 S-S; CSα/β), по структуре похожий на α-KTx и даже содержащий остаток K21, соответствующий ключевому лизину функциональной диады (646). Этот пептид не блокирует целый ряд протестированных K^+ каналов, однако с высокой аффинностью взаимодействует с трипсином и ингибирует его. С помощью РСА изучена пространственная структура комплекса ToPI1 с бычьим трипсином (PDB ID: 6MQR); оказалось, что имеет место любопытный механизм ингибирования: остат-

ком P1 служит K32, трипсин гидролизует связь P1-P1' с отщеплением C-концевого а.о. пептида, после чего ацилфермент атакуется N-концевой аминогруппой ингибитора, и в результате ToPI1 преобразуется в циклический пептид.

1.13.4.3. Лектин из яда паука

Из яда паука *C. schmidti* выделен пептид SHLP-I (Q86C51; 32 а.о., 3 S-S), вызывающий агглютинацию эритроцитов млекопитающих в концентрации ≈ 10–30 мкМ (647). По аминокислотной последовательности и пространственной структуре (648) SHLP-I напоминает типичный токсин паука с мотивом ICK, однако в его структуре отсутствует мотив PSM: между двумя первыми остатками цистеина содержится только четыре, а не шесть других. Пептид проявляет свойства лектина и взаимодействует с сахаридами, содержащими сиаловые кислоты, с умеренным сродством, при этом важную роль играют ароматические а.о. (649). Какое перечисленные свойства имеют отношение к биологической функции SHLP-I, в настоящее время сложно судить.

1.13.4.4. Противомалярийные пептиды

Интересно, что из яда как пауков, так и скорпионов получены пептиды с антималярийными свойствами. В яде паука *P. cambridgei* найдены псалмопеотоксины I и II (PcFK I и II; P0C201, P0C202) (650), *in vitro* они подавляют развитие малярийных плазмодиев *Plasmodium falciparum* внутри зараженных эритроцитов и не проявляют гемолитической, цитолитической или антимикробной активности; молекулярная мишень их действия неизвестна. А в яде императорского скорпиона *Pandinus imperator* (семейство Scorpionidae) обнаружен скорпин (P56972), который подавляет образование гамет и оокинет *Plasmodium berghei*, поражающего мышей (651). Он проявляет также цитолитическую и антимикробную активность в сопоставимых микромолярных концентрациях (652), поэтому его активность против плазмодиев вряд ли является следствием специфичного взаимодействия с каким-то рецептором, а служит проявлением мембранной активности. Скорпин относится к т.н. «двудоменным» токсинам (β-KTx), см. подробнее в соответствующем разделе ниже.

1.13.4.5. Синтетические аналоги с новыми свойствами

Очевидной кажется возможность использовать «токсиновые» типы укладки в целях скаффолд-инженерии — рационального проектирования белков с заданными свойствами путем внесения модификаций в структурные шаблоны, представляющие собой стабильные типы укладок. Действительно, минидомены, наблюдаемые в мире токсинов, на первый взгляд, ничем не уступают тем укладкам, которые находят применение в биоинженерии, типа фиб-

ронектиновых доменов или анкириновых повторов. Принципиальная возможность подобного подхода была показана, к примеру, А. Мене (Научно-исследовательский центр Комиссариата по атомной энергии в Сакле, Франция) на CSα/β укладке токсинов скорпионов. В частности, удалось получить искусственный блокатор связывания ВИЧ с рецепторами лимфоцитов на основе CTX путем переноса в его β-шпильку а.о. из CD4 (653).

Технология фагового дисплея была использована для поиска пептидов с мотивом ICK, связывающихся с протонным каналом человека hH_v1 (654). В качестве шаблона был выбран ProTx II (см. подробно об этом токсине в разделе «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков»), его структуру разделили на три сегмента, каждый из которых случайным образом был заменен на соответствующую часть другого известного или предсказанного токсина (из списка 110 штук). В результате была получена библиотека из ≈1 млн искусственных пептидов, из которой был получен пептид Corza6 (C6), связывающийся с целевым каналом с высокой аффинностью ($K_d \approx 1$ нМ) и представляющий собой химеру ProTx II с ω-HXTX-Hv1b и Hm-2, охарактеризованным нами (см. раздел «Токсины из яда паука *Heriaeus melloteei*» Результатов).

1.14. Двудоменные токсины из яда паукообразных

Как отмечалось неоднократно выше, главным компонентом яда паукообразных являются небольшие белки, пептиды-нейротоксины. Другой распространенный компонент — это цитолитические пептиды, наиболее характерные для яда перепончатокрылых. В структурном отношении первые формируют дисульфид-богатые укладки ICK и CSα/β, в то время как вторые обычно не упорядочены в водной среде и образуют амфифильные α-спирали при взаимодействии с мембранами; при этом и те и другие являются сравнительно просто устроенными небольшими (обычный размер ~30 а.о.) однодоменными белками. Появляется всё больше работ, указывающих на достаточно широкое распространение токсинов большего размера (>60 а.о.), составленных из двух частей, каждая из которых соответствует «обычному» однодоменному токсину — нейротоксину или цитолитическому пептиду. Такие токсины мы называем двудоменными или «модульными». У скорпионов в настоящее время обнаружены только токсины, сочетающие в своей структуре модули АМП и CSα/β, и бóльшая часть разнообразия представлена компонентами яда пауков, исследованных в рамках нашей работы (таблица 20).

Таблица 20. Разнообразие двудоменных токсинов паукообразных. *Примеры, охарактеризованные нами.

Тип структуры	Токсины	Источник	Литература
АМП-АМП*	Цитоинсектотоксины (CIT)	*Lachesana tarabaevi*	(281)
АМП-CSα/β	β-KTx (включая скорпины)	*Tityus serrulatus*, *Pandinus imperator* и другие скорпионы	(651, 655)
АМП-ICK*	Спайдерины (OtTx)	*Oxyopes takobius*	(656)
ICK-АМП	Латартоксины (LtTx)*	*Lachesana tarabaevi*	(657)
	Пуротоксин-2 (PT2)*	*Alopecosa marikovskyi*	(658)
	CSTX-1	*Cupiennius salei*	(659)
CSα/β-CSα/β	LVP1	*Buthus occitanus tunetanus*	(660)
ICK-ICK	CpTx*	*Cheiracanthium punctorium*	(661)
	DkTx ("double-knot" toxin)	*Cyriopagopus schmidti*	(594)
	Hi1a	*Hadronyche infensa*	(604)

1.14.1. Двудоменные токсины скорпионов

Первым примером двудоменных токсинов паукообразных служат так называемые β-токсины скорпионов, блокаторы K^+ каналов (β-KTx). В отличие от α-KTx, они относятся к длинным токсинам скорпионов (содержат ~45–75 а.о.), а в их структуре можно выделить С-концевой домен с типичной укладкой CSα/β и протяженную N-концевую область, лишенную

остатков цистеина. Первым среди токсинов такого типа был описан TsTX-Kβ (P69940; β-KTx 1.1; 60 a.o., 3 S-S) из яда *T. serrulatus* (655), а в настоящее время в яде разных скорпионов найдено около 15 β-KTx, кроме того, найдено много последовательностей мРНК (кДНК), предположительно кодирующих β-KTx (662). При этом лишь для некоторых β-KTx была показана (слабая) активность в отношении K^+ каналов, а для большинства такой активности не обнаружено.

К β-KTx относятся также «скорпины», первый представитель которых (собственно скорпин; P56972; β-KTx 3.1; 73 a.o., 3 S-S) был выделен из яда *P. imperator* (651). Скорпины проявляют цитолитическую и антимикробную активность в микромолярных концентрациях (652). Подобно множеству однодоменных цитотоксинов из яда паукообразных, их линейная N-концевая область формирует амфифильную α-спираль в средах, имитирующих мембранное окружение (по данным спектроскопии КД и ЯМР), именно этот участок у большинства скорпинов отвечает за их цитолитическую и антимикробную активность (334, 662); при этом пространственная структура полноразмерного β-KTx разрешена не была. Интересно, что для MeuTXKβ1 из *M. eupeus* показано, что С-концевой домен также обладает цитолитической и антимикробной активностью (663).

β-KTx формируют три группы по сходству аминокислотных последовательностей, к одной относят близкие гомологи TsTX-Kβ, к другой — скорпины, а к третьей — полипептиды, близкие по структуре к BmTXKβ (Q9NJC6; β-KTx 2.1; 61 a.o., 3 S-S) из *M. martensii* (664). Все три группы имеют сходные С-концевые домены, напоминающие по последовательности дефензины беспозвоночных. А вот N-концевая область полипептидов типа BmTXKβ не похожа на другие; таким образом, по крайней мере, эта группа токсинов эволюционировала независимо.

Для некоторых β-KTx [например, HgeScplp1 (Q0GY40; β-KTx 3.2; 76 a.o., 3 S-S; таблица 7) из яда скорпиона *Hoffmannihadrurus gertschi*, семейство Caraboctonidae] показана как ингибиторная активность в отношении K^+ каналов (K_v1.1–1.3; $IC_{50} \approx 100$ нМ), так и цитолитическая или антимикробная активность (в субмикромолярных концентрациях) (334). Для других (например, TsTX-Kβ) показана только активность в отношении K^+ каналов; для третьих (например, скорпин) — только цитолитическая активность. Наконец, ряд β-KTx (например, LaIT2 из яда карликового древесного скорпиона *Liocheles australasiae*) не обладал активностью в тех же тестах (665).

В некоторых случаях в яде обнаруживаются фрагменты β-KTx с частично или полностью удаленным N-концевым модулем; такие пептиды обычно сохраняют способность угнетать токи, опосредованные K^+ каналами, но утрачивают цитолитические свойства (334, 666). В одной работе для укороченного на один N-концевой а.о. β-KTx предполагается способ-

ность селективно потенцировать токи, опосредованные некоторыми изоформами каналов K_v7, однако приведенные данные по характеристике молекулярного состава исследованных фракций яда не позволяют сделать однозначный вывод в пользу высказанного предположения, поскольку помимо идентифицированного β-KTx содержат примеси (409). В другой работе авторы сообщают об идентификации в транскриптоме ядовитых желез *M. eupeus* последовательности, соответствующей мРНК β-KTx с однонуклеотидной заменой, приводящей к появлению раннего стоп-кодона. В результате, по предположению авторов, синтезируется только N-концевая область токсина; соответствующий искусственно синтезированный пептид, названный меуцином-24, проявлял слабую цитолитическую активность (249). Поскольку других сообщений о подобном РНК-редактировании у скорпионов не было, предполагаемого пептидного продукта в яде не обнаружено, а его биологическая активность не установлена, указанная публикация не пользуется большим доверием.

Таким образом, биологическая роль β-KTx в настоящее время неизвестна. Несмотря на достаточно высокое содержание некоторых β-KTx в яде, в отношении их цитолитической активности актуальны те же соображения, что были высказаны для однодоменных цитолитиков выше (см. раздел «Цитолитические и антимикробные пептиды»). Для их CSα/β-модуля молекулярная мишень не установлена; K^+ каналы, в отношении которых была показана активность, вряд ли служат природной мишенью, поскольку действующие концентрации β-KTx слишком велики по сравнению с α-KTx из яда тех же скорпионов.

В яде скорпиона *Buthus occitanus tunetanus* обнаружен необычный двуцепочечный полипептид LVP1 (P84809 и P84810) (660). Его цепи (73 и 69 а.о.) имеют сходные, но не идентичные, последовательности и удерживаются дисульфидным мостиком. Интересно, что обе цепи гомологичны α и β-NaTx, при этом содержат шесть «коровых» остатков цистеина и еще один непарный — для димеризации. LVP1 стимулировал липолиз в адипоцитах крысы, оцениваемый по накоплению глицерина в культуральной среде, и потому получил название «липолиз-активирующего пептида». Это название распространилось в литературе, и сходные белки, в том числе предсказанные по нуклеотидным последовательностям, стали называть так же без экспериментальной проверки и даже подтверждения наличия в яде (667). По сути, LVP1 — двудоменный токсин, состоящий из двух CSα/β-модулей, соединенных S-S-связью. Биологическая функция подобных соединений вряд ли состоит в индукции липолиза и нуждается в выяснении.

Сообщалось также о выделении из яда *M. martensii* гомодимерного полипептида, цепи которого по последовательности сходны с одной из цепей LVP1 (668). Однако представленные данные неубедительны, вероятно, на самом деле был получен аналогичный гетеродимер.

1.14.2. Двудоменные токсины пауков

В отличие от скорпионов, в яде пауков обнаружены двудоменные токсины разнообразного строения. Если же не учитывать модульные токсины, исследованные в рамках данной диссертационной работы (о них детально речь пойдет ниже), то останется упомянуть три группы: содержащие два АМП-модуля, два ICK-домена и ICK-домен с АМП-модулем.

1.14.2.1. Цитоинсектотоксины

Первыми токсинами пауков, которым было приписано модульное строение, стали цитоинсектотоксины (CIT) из паука-муравьеда *L. tarabaevi*, изученные нами (99, 281). В ходе исследования молекулярного состава яда этого паука обнаружилось, что большую его часть занимают полипептиды с Мм ≈ 8 кДа, проявляющие высокую неизбирательную цитолитическую и антимикробную активность в (суб)микромолярных концентрациях. Более того, высокая токсичность яда в отношении насекомых также обусловлена этими соединениями ($ЛД_{50}$ для личинок мясной мухи *Sarcophaga carnaria* ≈ 20 мкг/г, для взрослых мух ≈5 мкг/г), потому и названными цитоинсектотоксинами. В яде *L. tarabaevi* мы находим 12 CIT, объединяемых в четыре семейства (CIT 1–4; см. последовательности в таблице 49, подробное описание в главе Результатов «Яд паука *Lachesana tarabaevi* — уникальный источник мембраноактивных токсинов»).

В аминокислотной последовательности CIT (61–79 а.о.) отсутствуют остатки цистеина, для них характерен большой положительный заряд (от +7 у CIT 2c до +21 у CIT 3a при нейтральном pH), неупорядоченная структура в водном растворе и склонность к формированию α-спиралей в имитирующих мембрану средах. Размер и заряд CIT приблизительно вдвое превосходят таковые у «средних» цитолитических пептидов [средняя длина 3000 пептидов из базы данных APD (http://aps.unmc.edu/AP/statistic/statistic.php; 28 июля 2018 г.) составляет 32,5 а.о., а средний заряд +3,3], при этом в структуре CIT можно выделить две области, которые согласно алгоритмам предсказания вторичной структуры [например, JPred (669): http://www.compbio.dundee.ac.uk/jpred/] и являются спиралеобразующими: это N- и C-концевые фрагменты молекул (~30–35 а.о.), похожие на «обычные» короткие цитолитические пептиды, соединенные коротким линкером. Последовательность линкера у CIT 1 и 2 (4 а.о.) напоминает сайт процессинга предшественников токсинов пауков (см. раздел «Биосинтез токсинов паукообразных») с заменой ключевого остатка аргинина. Данные наблюдения позволили предположить, что CIT возникли в эволюции как результат мутации мотива процессинга в «двойных» предшественниках цитолитических пептидов. Образовавшиеся гигантские линейные токсины, в отличие от коротких, обладают сравнительно высокой инсек-

тотоксичностью, что могло послужить причиной закрепления данной мутации как дающей конкурентное преимущество.

1.14.2.2. Токсины с двумя ICK-доменами

В настоящее время такие токсины известны из яда трех видов пауков (см. таблицу 20). Мы (см. раздел «Модульные токсины из яда паукообразных» Результатов) называем их модульными или двудоменными; Д. Джулиус, а вслед за ним и австралийские коллеги используют термин «двухузловые токсины» (англ. double-knot toxins).

С применением той же системы, что была использована для обнаружения ваниллотоксинов (см. рисунок 24 в разделе «Токсины, воздействующие на болевые рецепторы»), из яда *C. schmidti* был выделен компонент, активирующий TRPV1 ($EC_{50} \approx 0{,}2$ мкМ) (594). Им оказался полипептид, содержащий 75 а.о. и получивший название DkTx (P0CH43; 6 S-S, 2 ICK). В отличие от тех же ваниллотоксинов, DkTx селективен в отношении TRPV1 и не воздействует на целый ряд других исследованных ионных каналов, включая $K_v2.1$. Авторы установили полную аминокислотную последовательность токсина с помощью секвенирования соответствующей кДНК, однако в открытых базах данных имеется лишь фрагмент (GenBank ID: HM015001), кодирующий зрелый токсин и С-концевой профрагмент (4 а.о.), до стоп-кодона. Структура DkTx отличается от «обычных» токсинов пауков тем, что содержит сразу два ICK мотива (отсюда его название): K1 (а.о. 1–35) и K2 (43–75), соединенные коротким линкером (рисунок 27). Модули K1 и K2 похожи: они содержат три инвариантных S-S-мостика и ряд других идентичных а.о. (всего 60%).

Уникальным свойством DkTx служит фактическая необратимость действия: если другие агонисты TRPV1 быстро отмываются (например, для капсаицина $\tau_{off} \approx 10$ с, для ваниллотоксинов $\tau_{off} \approx 1{,}5$–$2{,}5$ мин), то действие DkTx не прекращается спустя несколько минут (экспрессия рецептора крысы в HEK293). Авторы открытия предположили, что имеет место эффект авидности, ввиду наличие в структуре двух доменов, способных связывать рецептор (как у антител). Для доказательства этого предположения был синтезирован искусственный аналог DkTx с введенным в линкер между K1 и K2 селективного сайта протеолиза, в результате гидролиза были получены индивидуальные ICK модули. Изолированные K1 и K2 были в 50 и 5 раз менее активны полноразмерного DkTx в отношении TRPV1, соответственно, а их действие было быстро обратимым при отмывке; совместное же приложение к рецептору не давало синергетического эффекта. Кроме того, был синтезирован еще один искусственный аналог DkTx — с удвоенным модулем K1. Такой аналог (K1-K1) был менее активен, чем DkTx, однако его эффект медленно спадал при отмывке. Аналог K2-K2, полученный в другой работе (670), был эффективнее K1-K1, а его эффект так же необратим, как у DkTx.

Рисунок 27. Сравнение аминокислотных последовательностей двух модулей DkTx. Разрывы и прочерки добавлены для удобства. Линкер выделен курсивом. А.о. раскрашены в соответсвии со свойствами (как в таблице 8). Справа указана длина последовательностей. Символы снизу указывают на идентичность (*) или сходство (:, .) а.о. (согласно конвенции: https://www.ebi.ac.uk/seqdb/confluence/display/JDSAT/Bioinformatics+Tools+FAQ#BioinformaticsToolsFAQ-WhatdoconsensussymbolsrepresentinaMultipleSequenceAlignment?).

```
K1    DCAKEGEVCSWGKKCCDLDNFYCPMEFIPHCKKYKPYVPVTT   42
K2    NCAKEGEVCGWGSKCCH--GLDCPLAFIPYCEKYR-------   33
      :********.**.***.  .: **: ***:*:**:
```

Для картирования сайта связывания DkTx был применен любопытный подход: оказалось, что рецептор TRPV1 *X. laevis* нечувствителен к токсину, что позволило получить набор химерных белков, у которых части рецептора крысы были заменены на гомологичные участки рецептора лягушки и наоборот, а их чувствительность к токсину указывала на область связывания. В результате оказалось, что токсин взаимодействует со внеклеточной петлей между трансмембранными сегментами S5 и S6. Дополнительно было проведено аланиновое сканирование этой петли, и установлены наиболее вероятно участвующие в связывании токсина а.о. канала.

Структура мишени DkTx — канала TRPV1 — была исследована с помощью метода крио-ЭМ в комплексе с токсином и еще одним активатором — резинифератоксином (RTX) из молочая, являющимся чрезвычайно эффективным функциональным аналогом капсаицина. Интересно, что в этом случае были использованы две альтернативные среды, имитирующие мембрану. В первой работе были применены амфиполы (сокр. от амфифильные полимеры), разработанные Ж.-Л. Попо (Институт физико-химической биологии, Париж, Франция) (671), в результате получена структура комплекса с разрешением ≈ 3,8 Å, при этом некоторые участки, такие как линкеры между K1 и K2 не были разрешены.

Отдельные модули DkTx были исследованы с помощью спектроскопии ЯМР; в соответствии с предположениями, в пространстве оба пептида образуют укладку типа цистинового узла (670). Затем полученные пространственные структуры K1 и K2 были использованы для улучшения модели взаимодействия DkTx с TRPV1, созданной на основе данных крио-ЭМ (671), при помощи программы ROSETTA. Экспериментальные ЯМР-структуры были вписаны в карту плотности, полученную с помощью крио-ЭМ, после чего симулировались наиболее энергетически выгодные модели комплекса — с учетом ЯМР-ограничений и карты плотности. В результате авторы предположили, что две молекулы DkTx взаимодействуют с одним тетрамерным каналом TRPV1, модули K1 и K2 расположены против часовой стрелки, если смотреть на комплекс со внеклеточной стороны, и имеют похожую ориентацию: с каналом взаимодействуют главным образом петли 2 (взаимодействует с N-концом спирали S6) и

4 (взаимодействует с N-концом P-петли соседней субъединицы) цистинового узла, а их верхушки, содержащие гидрофобные а.о., при этом погружаются в мембрану. Роль этих петель была убедительно продемонстрирована путем получения химер с пересадкой соответствующих областей из K2 в K1, активность которых увеличивалась по сравнению с исходным модулем K1; при этом замена а.о. петли 3 не влияла на активность.

Мембранная активность полноразмерного DkTx и его модулей была исследована с помощью титрования раствора полипептидов липидными везикулами [100 нм; ПОФХ / 1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-(фосфо-rac-(1-глицерин)) (ПОФГ), 1 : 1] и регистрации собственной флуоресценции триптофана (которая претерпевает сдвиг в коротковолновую область при переходе в неполярную фазу). Она оказалась сопоставимой с похожими соединениями (рассчитанная свободная энергия распределения ≈ −8,5 ккал/моль для DkTx, −7,5 ккал/моль для K1 и −6 ккал/моль для K2; для сравнения см. разделы «Цитолитические и антимикробные пептиды» и «Ингибиторы активации K_v из яда пауков»).

В другом исследовании канал TRPV1 был встроен в искусственные нанодиски (фрагменты бислоя, стабилизируемые модифицированным аполипопротеином A1) большого диаметра (≈150 Å), и удалось достичь сравнительно высокого разрешения структуры комплекса (≈2,9 Å; рисунок 28) (672). Две молекулы DkTx связываются с каналом, по-видимому, в антипараллельной ориентации и располагаются против часовой стрелки, как и предсказывалось ранее: K1 и K2 частично погружаются в мембрану (верхушками петель 2 и 4, тоже как предсказывалось) и встраиваются между двумя ПД так, что одновременно взаимодействуют еще и с S1–S4-доменом. Линкеры находятся в вытянутой конформации — создается впечатление, что они идеально подходят по длине. В отличие от Na^+ каналов, для которых модель тройного комплекса канал–токсин–липиды является в настоящее время скорей гипотезой, в случае DkTx и TRPV1 сомнений в адекватности такого представления почти нет: оба ICK домена токсина взаимодействуют с молекулами липидов, которые также формируют специфические контакты с молекулой канального белка (рисунок 28B).

Полипептиды Hi1a–d, кодируемые кДНК *H. infensa*, состоят из 75–77 а.о. и содержат два ICK домена, похожие друг на друга и PcTx1 (71% и 50% идентичных а.о. у N- и C-концевого домена Hi1a соответственно и PcTx1; рисунок 29) (604). Рекомбинантные Hi1a (A0A1L1QJU3; 75 а.о., 6 S-S, 2 ICK) и его составные домены (а.о. 1–35 и 36–75) были получены в *E. coli* (для отщепления от белка-помощника использовалась TEV-протеаза вируса гравировки табака, поэтому у всех продуктов на N-конце имелся дополнительный остаток серина).

Рисунок 28. Структура комплекса TRPV1 крысы с DkTx и резинифератоксином (RTX; PDB ID: 5IRX). (А) Вид «сверху», т.е. на плоскость мембраны со внеклеточной стороны. Мономеры TRPV1, модули K1 и 2 и линкеры двух молекул DkTx окрашены разными цветами; K1 — пурпурным и голубым, K2 — розовым и бирюзовым, линкеры — темно-розовым и бледно-голубым. DkTx представлен ленточной моделью, окруженной полупрозрачной молекулярной поверхностью. Четыре молекулы RTX показаны оранжевыми стержневыми моделями. (Б) Вид «сбоку», т.е. со стороны мембраны, приблизительное положение полярных головок липидов обозначено пунктирными отрезками справа. (В) Увеличенное изображение сайта связывания K1. Показаны: один мономер TRPV1 в виде ленточной модели, две молекулы липидов, дисульфидные мостики, а также боковые цепи а.о. токсина и канала, участвующие в образовании тройного комплекса. Представлены две молекулы липидов в виде стержневых моделей фосфатидилэтаноламина с короткими ацильными цепями; тяжелые атомы раскрашены: азот синий, кислород красный, сера желтая, углерод зеленый, фосфор оранжевый.

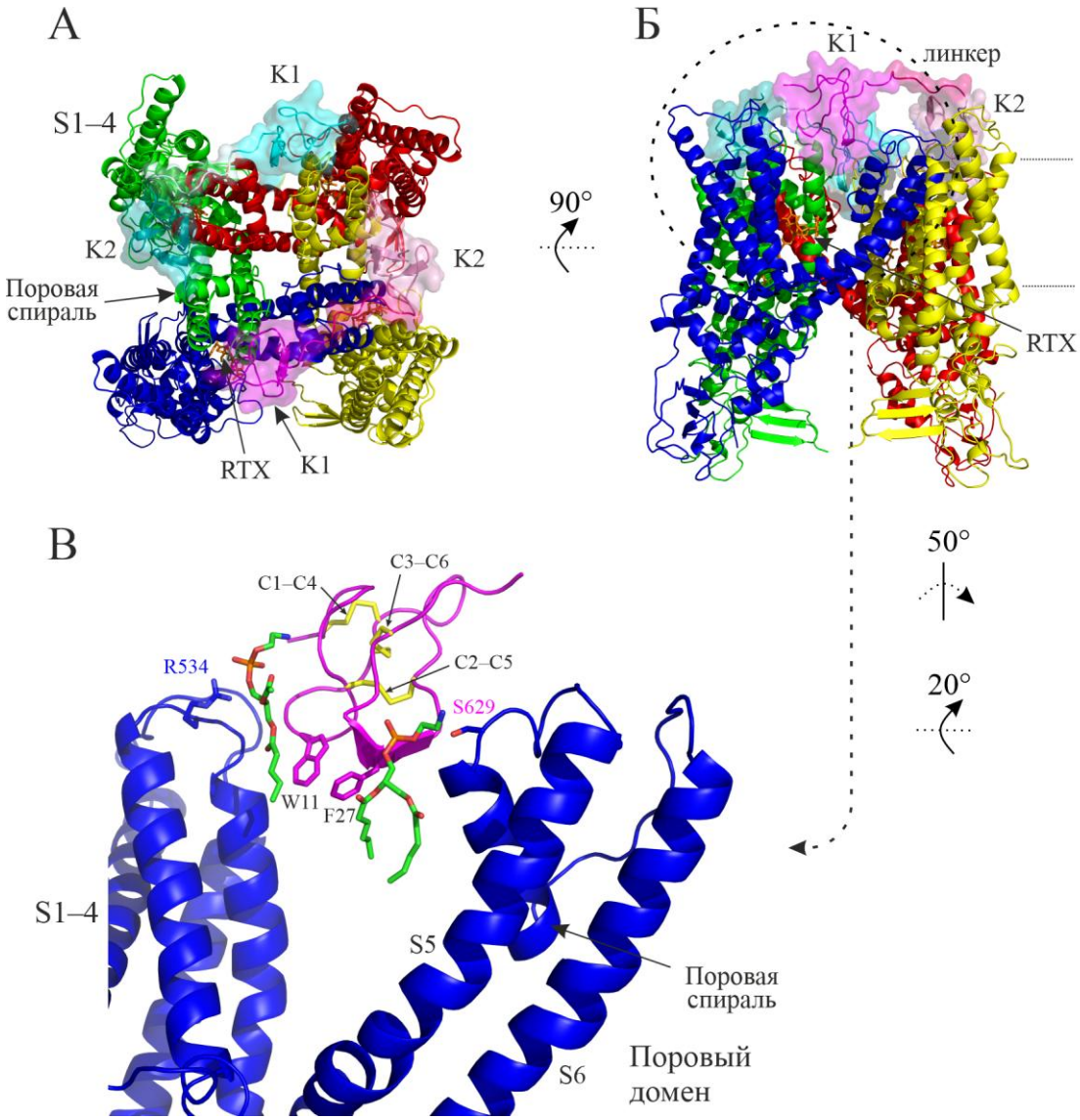
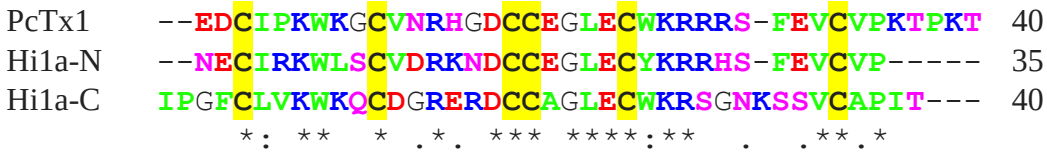


Рисунок 29. Сравнение аминокислотных последовательностей PcTx1 и двух модулей Hi1a. Окраска и обозначения как на рисунке 27.



Hi1a селективно ингибировал ASIC 1a как крысы, так и человека (экспрессия в ооцитах *X. laevis*; $IC_{50} \approx 0{,}5$ нМ, при этом даже в насыщающей концентрации блок не был полным, только около 80%), не влиял на ASIC 2a и ASIC 3 и слабо потенцировал ASIC 1b (на ≈30%) крысы в концентрации 1 мкМ. Интересная особенность Hi1a состоит в том, что его эффект прекращался при отмывке очень медленно ($\tau_{off} \approx 32$ мин в отношении канала человека), в отличие от других модуляторов ASIC 1a, в том числе PcTx1 ($\tau_{off} \approx 1$ мин). Исследования кинетики активации и инактивации каналов (экспрессия в HEK293) показали, что Hi1a, опять же в отличие от PcTx1, увеличивает время активации канала и не влияет на десенситизацию (т.е. стабилизирует закрытое состояние канала).

Отдельные домены Hi1a были значительно менее эффективны полноразмерного токсина: $IC_{50} \approx 1$ мкМ для N-концевого домена (при этом блок был полным и легко обратимым, $\tau_{off} \approx 1$ мин), а C-концевой домен лишь слабо потенцировал ASIC 1a в концентрации 1 мкМ. Авторы показали также, что простое «удвоение» PcTx1 (получение двудоменного полипептида PcTx1-PcTx1) не приводит к воспроизведению свойств Hi1a, а лишь к падению активности, а вот присоединение к PcTx1 C-концевого домена Hi1a приводит к высокоэффективному ($IC_{50} \approx 1$ нМ) и неполному блокированию ASIC 1a. Сайт связывания Hi1a во всяком случае частично перекрывается с PcTx1: замена F350A в канале крысы приводит к потере активности обоих веществ.

1.14.2.3. Токсины, содержащие линейный и ICK-домен

Весьма любопытно, что пауки производят токсины, напоминающие по строению рассмотренные выше модульные токсины скорпионов (β-KTx). Только в данном случае различаются не только дисульфид-богатые домены (CSα/β у скорпионов и ICK у пауков), но и их взаимное расположение с линейным модулем (АМП-CSα/β у скорпионов и ICK-АМП у пауков).

Примером служит CSTX-1 (P81694; 74 a.o., 4 S-S) — главный компонент яда *C. salei*, обладающий инсектицидной активностью ($ЛД_{50} \approx 3$ мкг/г на *D. melanogaster*) (161, 659). Вдобавок к «обычному» S-S-богатому ICK-домену он содержит достаточно протяженный C-концевой линейный участок (a.o. 45–74). Синтетический пептид, соответствующий этому

участку, способен образовывать амфифильную α-спираль и обладает цитолитической активностью — характерными признаками АМП. Полноразмерный токсин тоже показывает цитолитическую активность, хотя и сниженную в сравнении с С-концевым АМП-модулем, а также мембрано-активные свойства (659). Интересно, что С-концевой модуль важен и для инсектицидной активности CSTX-1: в яде *C. salei* обнаружены укороченные формы этого токсина, названные CSTX-2a и 2b (а.о. 1–61 и 1–60, соответственно), со значительно сниженной токсичностью (для CSTX-2b $ЛД_{50}$ в отношении *D. melanogaster* ≈ 0,45 мг/г). При этом сам по себе он не является мощным инсектотоксином ($ЛД_{50}$ ≈ 0,3 мг/г), то есть для биологической активности CSTX-1 важны оба модуля. Представлены данные, что CSTX-1 ингибирует Ca^{2+} каналы насекомых и проявляет селективность в отношении Ca^{2+} каналов L-типа у млекопитающих (673), однако нет уверенности, что эти каналы — его основная мишень.

Приоритет в исследовании модульных токсинов пауков принадлежит нашей команде, что будет раскрыто подробно в Результатах (раздел «Модульные токсины из яда паукообразных»).

1.15. Белковые токсины паукообразных

В любой работе, посвященной исследованию состава яда с помощью методов протеомики, будет отмечено высокое разнообразие или даже приведен внушительный список обнаруженных белков. Надо понимать при этом, что протеомике вообще свойственна высокая доля ложноположительных результатов. Что касается яда паукообразных, то обнаружение в них белковых компонентов само по себе вовсе не означает, что эти компоненты важны для биологической функции яда. Совсем наоборот, белки, как правило, играют в составе яда второстепенную роль. По-видимому, распространенным явлением служит случайное попадание белков в яд: это может произойти вследствие неаккуратного отбора яда и загрязнения полученного образца, например пищеварительным соком. Кроме того, в яд могут попадать белки из клеток ядовитых желез, не предназначенные специально для функционирования в составе яда, ввиду апо- или голокринового типа секреции.

Похожие проблемы у работ, сосредоточенных на анализе транскриптома ядовитых желез. Дело в том, что сама по себе экспрессия какого-либо гена в ядовитой железе не означает, что данный ген кодирует токсин: к примеру, это может быть ген «домашнего хозяйства». Подходы, позволяющие выявить гены, экспрессия которых специфична для ядовитых желез, позволяют значительно сузить диапазон предполагаемых токсинов, однако так же не гарантируют успеха.

В яде паукообразных обнаружен целый спектр ферментов (15, 674): протеаз (178, 675-678), гликозидаз (679-681), липаз (682-684). При этом не всегда собственно ферментативная активность показана, еще реже установлен специфический субстрат, и совсем редкость — это понимание (хотя бы в общих чертах) биологической функции ферментов в яде. К сожалению, желание исследователей опубликовать свои результаты, придав им высокую значимость, иногда превалирует над обязанностью критического анализа данных. Поэтому в литературе имеются примеры описания ферментативной активности яда с далеко идущими рассуждениями о биологической значимости, когда при этом сами данные свидетельствуют лишь об очень слабой или неспецифической активности.

В яде нескольких скорпионов, относящихся к разным семействам, обнаружены PLA_2 (EC 3.1.1.4, фосфатидилхолин-2-ацилгидролазы) (685-687). По аминокислотной последовательности они близки PLA_2 из яда пчелы, но имеют интересную структурную особенность: в ходе созревания происходит отщепление короткого фрагмента белка-предшественника так, что зрелый фермент состоит из двух цепочек, удерживаемых дисульфидным мостиком. PLA_2 — важный компонент яда змей и медоносной пчелы, во многом обусловливающий их токсичность (240, 688); по-видимому, наличие PLA_2 в яде скорпионов служит примером конвергенции.

Предполагается, что функция некоторых протеаз и гликозидаз в яде паукообразных состоит в разрушении компонентов внеклеточного матрикса в теле жертвы. Тем самым эти ферменты служат «фактором распространения» для других токсинов, помогая им достичь мишени (15, 689). В частности, в яде многих животных обнаружены гидролазы, способные разрушать гликозаминогликаны и обычно называемые гиалуронидазами (EC 3.2.1.35, гиалуроноглюкозаминидазы) (679-682, 690, 691). По-видимому, эти ферменты вносят вклад в отравление ядом пауков-отшельников *Loxosceles* spp. (см. подробнее ниже): показано, что совместное интрадермальное введение кроликам гиалуронидазы из яда *L. intermedia* (UniProt ID: R4J7Z9) с некротоксином существенно усиливало поражение (692). А совместная инъекция гиалуронидазы из яда *C. salei* (A0A0S4JYH2) и основного токсина CSTX-1 мухам приводила к заметному увеличению токсичности (680). Стоит отметить, что гиалуроновая кислота не характерна для насекомых, которые однако содержат хондроитинсульфат. Показано, что гиалуронидазы из яда пауков гидролизуют этот субстрат, и хотя их активность в его отношении оказывается ниже, чем к гиалуроновой кислоте, есть основания полагать, что именно хондроитинсульфат служит главной мишенью (680). Роль гиалуронидаз как фактора распространения не уникальна для яда паукообразных: аналогичную функцию этих ферментов предполагают, к примеру, у ядозубов и змей (693, 694).

Протеазы, найденные в некоторых ядах, способны разрушать коллаген или фибронектин (675, 677, 695, 696). Некоторые из них сами по себе могут вызывать симптомы отравления; например, металлопротеаза из яда *Hippasa partita* (Lycosidae) при интрадермальном введении мышам вызывала геморрагию (696). Распространенность металлопротеаз в яде пауков-отшельников *Loxosceles* spp. наводит на мысль об их вкладе в токсичность (675, 677), однако убедительных данных не получено. При желании можно увидеть сходство с ядом гадюковых змей, где металлопротеазы являются мажорным компонентом и вызывают геморрагию (697), однако ни одна паучья протеаза в настоящее время не считается сильнодействующим токсином.

Лучше других исследованы две группы белковых токсинов паукообразных: некротоксины из яда пауков-отшельников и нейротоксины из яда пауков-вдов. Это не случайно: интерес к данным токсинам продиктован тем, что именно они обусловливают симптомы наиболее опасных для человека пауков.

1.15.1. Некротоксины из яда Loxosceles

Выше (в разделе «Медицинское значение яда паукообразных») говорилось о локсосцелизме (некротическом арахнозе / арахнидизме), вызываемом укусами пауков-отшельников *Loxosceles* spp. Активный компонент их яда — это белковые некротоксины, которые облада-

ют фосфолипазной активностью; конкретней это PLD, проявляющие селективность в отношении сфингомиелина, поэтому часто в литературе они называются «сфингомиелиназы D» (EC 3.1.4.12; сфингомиелин-фосфодиэстеразы) (30, 31, 698, 699). Интересно, что вопреки ожиданиям эти ферменты не гидролизуют сфингомиелин, а продуктами реакции служат холин и циклический церамид(1,3)фосфат (700, 701).

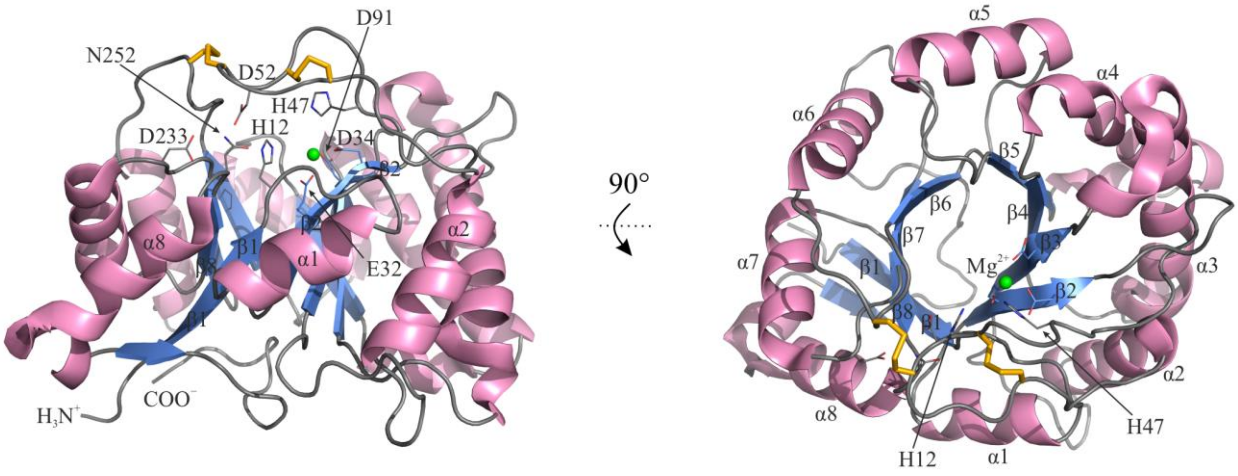
Некоторые некротоксины были очищены с помощью хроматографических методов, к примеру, исследователи из Института Бутантан (Бразилия) в качестве анализа биологической активности фракций, полученных в ходе разделения яда, использовали гемолитический тест: оказалось, что помимо способности индуцировать образование язв эти токсины обладают гемолитической активностью (что вполне ожидаемо для фосфолипаз) (702, 703). Некротоксинами оказались белки с Мм ≈ 35 кДа и общим содержанием в яде ≈15–20% сухого веса (данные предоставлены Д. Тамбурги, Институт Бутантан, Бразилия); интересно, что в одном и том же яде могут содержаться несколько родственных белков, при этом не все из них обладают фосфолипазной активностью или способны приводить к некрозу.

Были клонированы гены ряда некротоксинов *Loxosceles* spp., они были экспрессированы в гетерологичных системах, и, что наиболее важно, рекомбинантные белки обладали активностью природных токсинов и содержащих их цельных ядов (704-706). Не менее важно, что с использованием рекомбинантного токсина была получена антисыворотка, по эффективности превосходящая полученную против цельного яда. Кроме того, антисыворотка, полученная против одного некротоксина, проявляла кросс-реактивность против токсинов из яда других видов *Loxosceles*.

Исследована пространственная структура сфингомиелиназ D из яда *Loxosceles laeta* и *L. intermedia*, а также *Sicarius levii* — с помощью PCA (UniProt IDs: Q8I914, P0CE80 и A0A0D4WV12; PDB IDs: 1XX1, 3RLH и 4Q6X, соответственно; рисунок 30) (707-709). Оказалось, что фермент формирует весьма распространенную укладку TIM-бочонка, которая относится к α/β-типу архитектуры и построена β-α-β-повторами так, что внутренняя поверхность стенки бочонка образована β-листом из восьми параллельных β-тяжей, а внешняя — восемью α-спиралями. Активный центр расположен (как и у других TIM-бочонков) на крышке бочонка с C-конца β-тяжей и N-конца α-спиралей. Отличительной чертой служит принимающая в формировании активного центра протяженная петля β2-α2, консервативная для некротоксинов *Loxosceles* и стабилизированная дисульфидными связями. По аналогии с родственными ферментами, а также на основании данных мутагенеза сфингомиелиназы D из *L. intermedia* (710), предполагается, что непосредственно в реакции участвуют два консервативных остатка гистидина (H12 и H47 по нумерации белка из *L. laeta*), которые вовлечены в сеть водородных связей с другими каталитически важными а.о. (D34, D52, D233, N252); для

функции фермента также необходим ион Mg^{2+}, который связывается в активном центре (хелатирован E32, D34 и D91; см. рисунок 30). Структура фермента из *S. levii* была также изучена в комплексе с субстратом и продуктом (использовался мутантный аналог с заменой одного из гистидинов, H47N; PDB IDs: 9OZS и 9DIE) (701). Молекулы сфинголипида и цераміd(1,3)фосфата занимают положение в активном центре, которое согласуется с представлением о ведущей роли остатка гистидина в кислотно-основном катализе лиазной реакции и необходимости Mg^{2+} для стабилизации фосфата. Интересно, что в этих структурах обнаруживаются еще два (не каталитических) сайта связывания липидов — сбоку от основного. Авторы исследования предполагают, что эти сайты показывают, как фермент взаимодействует с мембраной.

Рисунок 30. Пространственная структура сфингомиелиназы D из *L. intermedia* (PDB ID: 3RLH). Структура показана в ленточном представлении, ион Mg^{2+} — в виде зеленого шара. Слева указаны N- и C-концы цепи; дисульфидные мостики, стабилизирующие петли вблизи активного центра, показаны желтым; спиральные участки — розовым, β-тяжи — голубым, петлевые участки — серым (восемь β-тяжей и восемь α-спиралей, составляющие укладку TIM-бочонка, пронумерованы справа). Боковые заместители функционально важных а.о. (подробности в тексте) показаны линиями.



Молекулярный механизм действия некротоксинов *Loxosceles* много изучался, однако до сих пор до конца не выяснен. Местные кожные эффекты, приводящие к дермонекрозу (отек, расширение сосудов и разрушение их стенок, геморрагия, отслоение эпидермиса, повреждение базального слоя кератиноцитов), связывают со способностью некротоксинов активировать: а) комплемент (как классический, так и альтернативный пути) (711, 712) и б) матриксные металлопротеиназы (путем повышения уровня экспрессии соответствующих

генов или секреции) (713). Отличительной особенностью патогенеза отравления после укуса *Loxosceles* spp. является инфильтрация полиморфонуклеарных лейкоцитов; предполагается, что их активность (в том числе опосредованная активацией комплемента) служит развитию дермонекроза. При этом терапия, направленная на снижение инфильтрации, приводит к побочным эффектам и может даже увеличивать повреждение ткани (699).

Что касается системных эффектов, в том числе потенциально смертельных (гемолиз, коагуляция и острая почечная недостаточность), то их связывают с уже упомянутой активацией комплемента, а также способностью некротоксинов индуцировать протеолиз ряда белков на поверхности клеток (например, гликофорина в эритроцитах, тромбомодулина и рецептора белка С в эндотелии) (714) и экспонирование фосфатидилсерина во внешнем монослое клеточных мембран (715). Принципиальной находкой в отношении терапии укусов *Loxosceles* spp. служит факт ингибирования активности некротоксинов тетрациклином и родственными соединениями (716), в настоящее время именно на этот подход возлагаются надежды.

Как говорилось выше (в разделе «Медицинское значение яда паукообразных»), PLD присутствуют и в яде представителей двух других родов семейства Sicariidae (*Hexophthalma* и *Sicarius*), и в настоящее время их считают характеристическим признаком этого семейства. Интересно, что сходный токсин обнаружен в яде скорпиона *Hemiscorpius lepturus* (Hemiscorpiidae) — одного из немногих за пределами семейства Buthidae, представляющего угрозу здоровью человека (717). Яд *H. lepturus* цитолитический, а симптомы отравления сходны с *Loxosceles* spp.: эритема, изъязвление, дермонекроз в месте укуса, в тяжелых случаях добавляются системные симптомы, такие как гемолиз, гематурия и почечная недостаточность. Активный компонент яда назвали геминекролизином, это белок с Мм ≈ 35 кДа, обладающий активностью сфингомиелиназы. Аминокислотная последовательность этого токсина проявляет значительное сходство с некротоксинами *Loxosceles*.

Отдельного упоминания заслуживает сходство некротоксинов и экзотоксинов некоторых патогенных бактерий из родов *Corynebacterium* и *Arcanobacterium* (718). Это обстоятельство даже подтолкнуло некоторых исследователей предположить их близкое родство и горизонтальный перенос генов бактерий паукам (719); в настоящее время эту гипотезу можно считать опровергнутой: эволюция PLD из *Loxosceles* достаточно хорошо прослеживается в линии эукариот, и горизонтальный перенос от бактерий мог иметь место только очень давно (см. ниже раздел «Происхождение токсинов») (720).

1.15.2. Латротоксины

Вне всякого сомнения, наибольший интерес представляют белковые компоненты яда каракурта и других пауков-вдов (род *Latrodectus*), называемые латротоксинами. Яд этих пауков стимулирует нейроэкзоцитоз, и латротоксины служат его действующим началом (28). Выше (в разделе «Медицинское значение яда паукообразных») говорилось о латродектизме — заболевании, вызванном укусом этих пауков и обусловленном наличием в их составе латротоксинов. Наши сегодняшние представления о структуре и механизме действия этих белков — результат работы коллектива под руководством Е.В. Гришина в ИБХ РАН и его учеников.

В яде каракурта (*L. tredecimguttatus*; ранее в литературе назывался также *Latrodectus mactans tredecimguttatus*) найдено семейство латротоксинов — это белки с Мм ≈ 110–130 кДа, различающиеся специфичностью: α-LTX, воздействующий на позвоночных (721, 722); пять латроинсектотоксинов (α, β, γ, δ и ε-LIT), активных на насекомых (106); и α-латрокрустотоксин (α-LCT), воздействующий на ракообразных (723) (таблица 21). Содержание их в яде варьирует от долей до нескольких процентов белковой фракции; α-LTX получается с выходом ≈ 1% сухого веса яда (724). Интересно, что латротоксины характеризуются высокой избирательностью действия: латроинсектотоксины активны против личинок большой восковой моли *Galleria mellonella* ($ЛД_{50}$ ≈ 15–1000 нг/г), но не воздействует на мышей или голубого кубинского рака *Procambarus cubensis* в дозе 5 мг/кг (106); α-LCT проявляет высокую токсичность на *P. cubensis* и широкопалом речном раке *Astacus astacus* ($ЛД_{50}$ ≈ 100 мкг/кг), однако в дозе 5 мг/кг не токсичен для мышей или *G. mellonella* (723); α-LTX высокотоксичен для мышей, но неэффективен против насекомых или ракообразных (таблица 21).

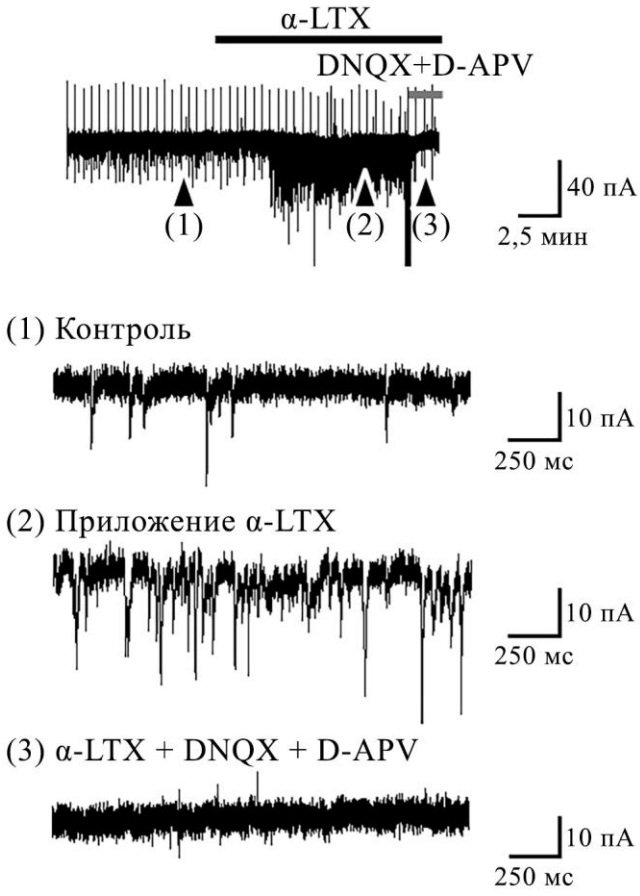
Таблица 21. Свойства латротоксинов.

Токсин	UniProt ID	Мм, кДа	Длина предшественника, а.о.	Токсичность ($ЛД_{50}$, мкг/кг)
α-LTX	P23631	130	1401	20 (п/к, мыши)
α-LIT	Q02989	130	1411	15 (личинки *Galleria mellonella*)
δ-LIT	Q25338	110	1214	60 (личинки *G. mellonella*)
α-LCT	Q9XZC0	130	1413	100 (*Procambarus cubensis*)

Молекулярный механизм действия всех латротоксинов, независимо от специфичности, сходен: он состоит в провоцировании выброса нейромедиатора из нервных окончаний. На клеточном уровне эффект токсинов проявляется в опустошении запаса синаптических везикул — выброс нейромедиатора происходит до полного истощения (721). Кроме того, регистрируется падение сопротивления мембраны нейрона. На тканевом уровне характерно

повышение частоты миниатюрных постсинаптических потенциалов (в ответ на выброс квантов нейромедиатора, см. рисунок 31), сменяющееся полной блокадой нервной передачи (в результате истощения запасов) (725, 726). Специфичность латротоксинов проявляется на клеточном уровне: к примеру, α-LIT в низких наномолярных концентрациях в 100 раз увеличивает частоту миниатюрных потенциалов концевой пластинки в нервно-мышечном препарате личинок мух *Calliphora vicina,* однако в концентрации 50 нМ не проявляет никакой активности на нервно-мышечном сочленении травяной лягушки *Rana temporaria*; α-LTX показывает противоположную картину, а меченые α-LIT и α-LTX не конкурируют друг с другом за связывание в препаратах мембран из мозга крыс или голов мух (725, 726).

Рисунок 31. Влияние α-LTX на частоту спонтанных возбуждающих постсинаптических токов (ВПСТ) в пирамидных нейронах префронтальной коры крыс.



Показан весь диапазон записи, а также в увеличенном масштабе:
(1) контроль,
(2) приложение α-LTX и
(3) последующее приложение 10 мкМ 6,7-динитрохиноксалин-2,3-диона (DNQX) и 100 мкМ D(−)2-амино-5-фосфонопентановой кислоты (D-APV).
α-LTX провоцирует сильное увеличение частоты спонтанных ВПСТ, а селективные антагонисты ионотропных GluR блокируют этот эффект.

Рисунок заимствован из (71), с изменениями.

Клонированы гены четырех латротоксинов из яда каракурта: α-LTX, α-LIT, δ-LIT и α-LCT (идентичность белковых последовательностей ≈ 35%, в паре α-LIT и α-LCT ≈65%) (727-731). Разнообразие латротоксинов в яде может быть существенно выше, на что указывает транскриптомный и протеомный анализ родственного вида *Latrodectus hesperus*, где обнаружено, по крайней мере, 20 гомологичных белков (732). Интересно, что в генах латротоксинов

L. tredecimguttatus не обнаружено интронов, что необычно для столь крупных белков; при этом у *L. hesperus* интроны найдены (733), что указывает на их недавнее происхождение.

Анализ первичной структуры латротоксинов приводит к интересным наблюдениям. Они могут быть разделены на две части: N-концевую с уникальной последовательностью, не похожей на другие белки (≈35% общей длины), и С-концевую (≈65%) с тандемно расположенными повторами (длина каждого ≈ 33 а.о.). Число повторов различно: от 15 у δ-LIT до 22 у α-LTX. Последовательность повторов имеет сходство с белком цитоскелета анкирином, а также с большим разнообразием аналогичных элементов у различных белков. Анкириновые повторы служат одним из распространенных белковых мотивов, используемых для образования комплексов. Не все повторы строго консервативны, и некоторые имеют очень низкое сходство с анкирином.

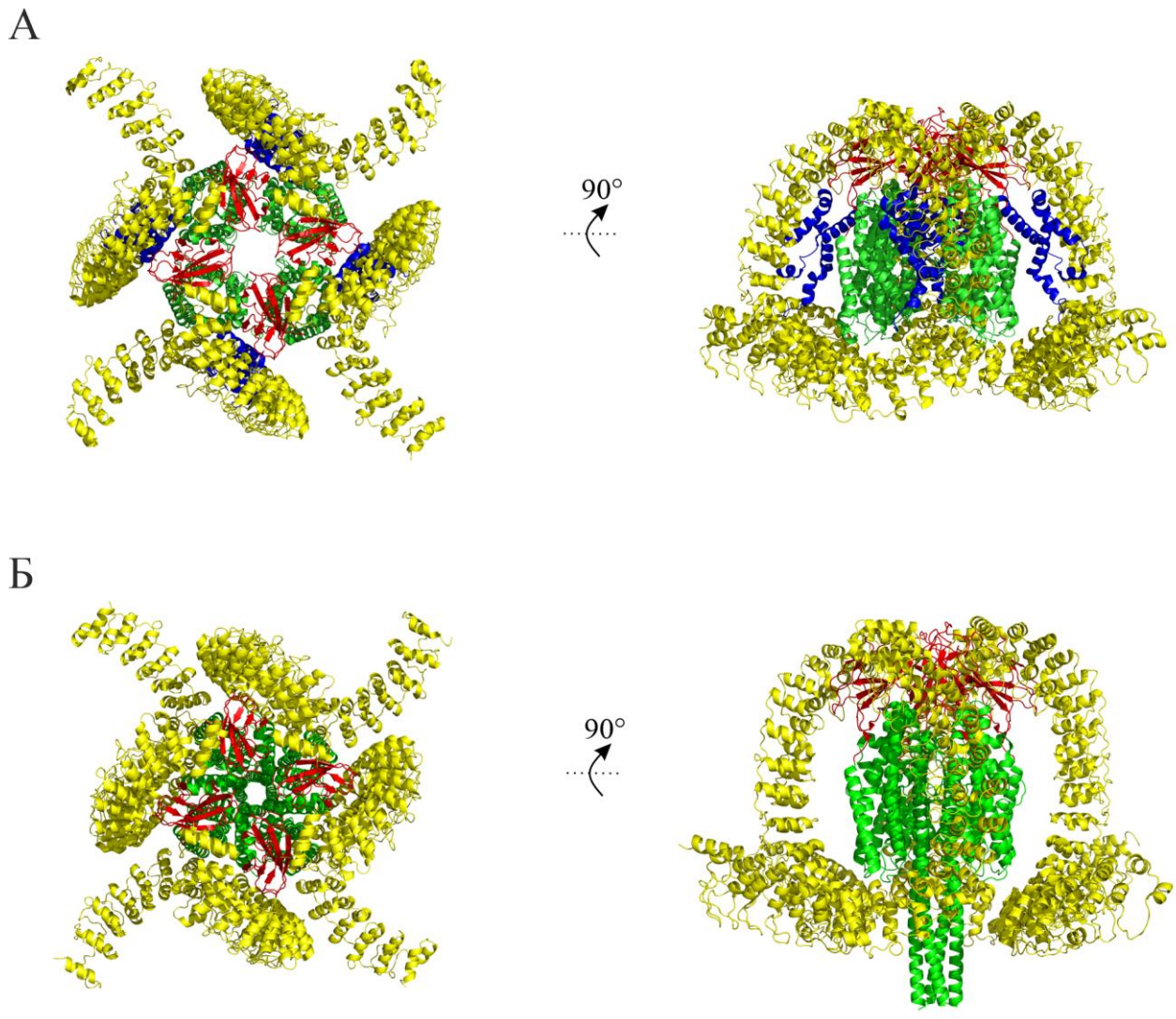
По всей видимости, в составе яда латротоксины присутствуют в олигомерной форме: α-LTX и δ-LIT образуют димеры, а в присутствии ионов двухвалентных металлов (≈2 мМ Ca^{2+} или Mg^{2+}) α-LTX формирует тетрамер, который по современным представлениям служит активной формой токсина. Для других латротоксинов предполагается аналогичный механизм действия.

В 2021 г. методом крио-ЭМ была изучена структура рекомбинантных α-LCT (а.о. 16–1240; разрешение 4 Å) и δ-LIT (1–1214, разрешение 4,6 Å; это неактивный предшественник, зрелый токсин составлен а.о. 29–1036), полученных в линии клеток насекомых High Five (734). Мономер α-LCT похож на морского конька (длина ≈ 130 Å, ширина ≈ 30 Å), его опущенная вниз голова образована N-концевой областью последовательности (а.о. 16–452) и состоит из трех доменов: четырехспирального, шестиспирального и β-структурного, содержащего два слоя антипараллельных тяжей. С-образное тело и хвост конька образованы 22 анкириновыми повторами (а.о. 453–1240), из которых 18 первых были разрешены. Структура мономера δ-LIT аналогична, но содержит меньше анкириновых повторов (15, из них 14 разрешены) и представляется более «открытой» (больше расстояние между головой и хвостом). Удалось получить структуру димера δ-LIT: в его составе протомеры токсина повернуты друг к другу на 90°, и β-структурный домен одного компактно размещается в выемке, образованной шестью первыми анкириновыми повторами другого. Интересно, что в том же образце отмечались также тримеры и тетрамеры, что указывает на стадийность олигомеризации.

Пространственная структура α-LTX тоже изучалась с помощью крио-ЭМ. Вначале были получены структуры низкого разрешения (≈4 нм и ≈14 Å для тетрамера и ≈18 Å для димера) (735, 736). А в 2024 г. той же исследовательской группой, что представляла структуру α-LCT и δ-LIT, был изучен тетрамер α-LTX уже с высоким разрешением (рисунок 32) (737). Для этого образцы готовили в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+}; наблюдали как мономеры, так

и все варианты олигомеров (от одной до четырех субъединиц токсина). Отметим, что общий вид тетрамера похож на тот, что был предложен при анализе структуры низкого разрешения: он напоминает пропеллер, а части токсина, расположенные в центре, образуют пору. Вместе с тем, важно и отличие: анализ новых структур показывает, что центральные части сформированы N-концевыми участками последовательности, в то время как использование антител, специфичных к N-концевому фрагменту α-LTX (а.о. 81–218), в более ранней работе локализовало этот фрагмент во внешних частях «лопастей». Тетрамеры присутствовали в двух конформациях, структура обеих была изучена. Более заселенная (разрешение 3,1 Å), по-видимому, соответствует неактивной форме, в то время как менее заселенная (разрешение 3,7 Å) — активированной, образующей пору.

Рисунок 32. Пространственная структура α-LTX из *L. tredecimguttatus*. Представлены «неактивная» (PDB ID: 9GO9; А) и «активированная» (9GOA; Б) тетрамерные формы. Структуры показаны в ленточном представлении. Домены раскрашены: N-концевой четырехспиральный — синим, шестиспиральный — зеленым, β-структурный — красным, анкириновые повторы — желтым.



Структура субъединицы α-LTX в неактивном тетрамере (рисунок 32А) аналогична описанным выше для α-LCT и δ-LIT и содержит четырехспиральный (а.о. 21–115), шестиспиральный (а.о. 116–350) и β-структурный (а.о. 351–453) домены в N-концевой области и 22 анкириновых повтора (а.о. 454–1195). При активации тетрамер токсина претерпевает значительные перестройки (рисунок 32Б). Они прежде всего затрагивают шестиспиральные домены, которые формируют протяженные перевитые спирали («ось» пропеллера), и четырехспиральные домены (к сожалению, не разрешены в активном тетрамере), которые перемещаются наружу и, по-видимому, встраиваются в мембрану с образованием поры. Метод крио-ЭМ был также использован для изучения структуры α-LTX в комплексе с липосомами. Оказалось, что в высокой концентрации токсин способен встраиваться в мембраны в отсутствие специфических рецепторов (738). При этом центральная часть пропеллера, содержащая пору, пронизывает мембрану насквозь, а «лопасти» локализуются латерально на внешней поверхности мембраны. Предполагается, что такая — встроенная в мембрану — тетрамерная форма токсина представляет его активную конформацию.

Как именно активируются латротоксины, как они взаимодействуют с рецепторами и формируют пору — предмет дальнейших исследований. Предполагается, что N-концевые участки отвечают за специфичность латротоксинов, на что указывают эксперименты с получением химер, в которых эти части меняли между α-LTX и α-LIT (739).

Причина высокой специфичности латротоксинов — наличие высокоаффинных белковых рецепторов этих токсинов в синапсах соответствующих животных (K_d комплекса ≈ 0,1–1 нМ) (740). Достаточно подробно были охарактеризованы только рецепторы α-LTX у млекопитающих. Ими оказались разнообразные белки, характерные для синаптического пространства. Первым был обнаружен нейрексин-1α, а затем оказалось, что существует обширное семейство нейрексинов, но только один из них выступает высокоаффинным рецептором токсина (741-744). Нейрексин-1α связывает α-LTX в присутствии Ca^{2+}, однако при удалении этого катиона из среды активность токсина сохраняется.

Ca^{2+}-Независимый рецептор α-LTX был обнаружен позднее и получил название латрофилина (или в некоторых публикациях CIRL, от англ. Ca^{2+}-independent receptor for LTX) (745-747). Этот рецептор относится к т.н. «адгезивному» семейству рецепторов, сопряженных с G-белком (GPCR), с протяженной внеклеточной частью (748). Из трех изоформ у млекопитающих только одна (латрофилин-1) способна связывать α-LTX с высокой аффинностью (K_d комплекса ≈ 0,1 нМ; латрофилин-2 показал в 15 раз меньшую аффинность) (749). У нематоды *Caenorhabditis elegans* был обнаружен ген, кодирующий гомолог латрофилинов, его нокдаун приводит к устойчивости животного к действию яда каракурта (заявляется раз-

личие в переносимых дозах >100 000 раз); при этом действующим началом, по-видимому, служит ε-LIT ($ЛД_{50}$ против червей дикого типа ≈ 1 нг/г) (750).

Впоследствии был найден еще один Ca^{2+}-независимый рецептор α-LTX, которым оказалась тирозин-фосфатаза σ (751). По-видимому, этот белок играет второстепенную роль в связывании α-LTX, поскольку выделяется в минорных количествах из экстракта мозга в сравнении с нейрексином и латрофилином. Исследование нокаутных мышей показывает, что именно нейрексин-1α и латрофилин-1 служат главными рецепторами α-LTX (752).

Молекулярный механизм действия латротоксинов состоит в связывании с белковым рецептором в синапсе, встраивании в пресинаптическую мембрану и образовании поры, проницаемой для ионов Ca^{2+}, вход которых в окончание нейрона стимулирует выброс нейромедиатора. При этом роль рецепторов сводится к облегчению встраивания токсина в мембрану, конкретный тип рецептора не имеет значения для данного процесса, и мутантные формы рецепторов с дефектной сигнальной функцией сохраняют свою эффективность как акцепторы токсина (738). Важно также, что отсутствует какая-либо выраженная специфичность латротоксинов в отношении нейронов, синапсов или выбрасываемых нейромедиаторов, по всей видимости, ввиду широкого распространения их рецепторов, являющихся практически вездесущими синаптическими белками.

Примечательно, что, помимо формирования пор, α-LTX индуцирует выброс нейромедиатора иным способом — это показано на мутантном токсине, который не способен к порообразованию (753, 754). Предполагают, что токсин, связываясь с рецепторами, запускает каскад внутриклеточных сигналов, приводящий в итоге к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+}, вероятно, за счет высвобождения из депо (754). Интересно, что α-LTX провоцирует также секрецию гормонов железами, к примеру, он индуцирует выброс инсулина β-клетками поджелудочной железы, которые экспрессируют латрофилин (755).

1.16. Биосинтез токсинов паукообразных

Необходимо сразу оговориться, что в настоящее время биосинтез низкомолекулярных компонентов яда практически не изучен, этому вопросу не уделяется внимание исследователей. Поэтому можно лишь высказывать предположения о возможных источниках тех или иных соединений в яде. И если биосинтез сравнительно просто устроенных компонентов, например аминокислот или нейромедиаторов, не представляется большой загадкой и скорей всего аналогичен уже известным реакциям, хорошо изученным в других системах, то продукция более сложных соединений, особенно не встречающихся в иных источниках, является сложной и интересной проблемой. К примеру, ничего не известно о биосинтезе ацилполиаминов, при этом очевидно, что их образование — результат согласованной работы множества ферментов, можно даже предположить существование «ферментных фабрик» наподобие описанных у бактерий и работающих для синтеза антибиотиков (756).

Лучше всего изучен биосинтез пептидных токсинов. Поскольку это секретируемые пептиды, для них характерны общие для эукариот механизмы биосинтеза таких соединений. Все они синтезируются в виде более крупных предшественников, содержащих N-концевой сигнальный пептид (лидерную последовательность), который обусловливает котрансляционный сортинг растущей полипептидной цепи в ЭПР и отщепляется сигнальной пептидазой. Ввиду специфических функций структура сигнальных пептидов имеет определенные необходимые элементы; разработаны правила и автоматизированные алгоритмы предсказания их последовательностей и места отщепления, наибольшее признание получили работы Г. фон Хейне и программа SignalP (757), с помощью которой сигнальные пептиды в структуре предшественников токсинов паукообразных определяются в большинстве случаев легко (см. примеры в Результатах). Многие токсины скорпионов кодируются генами в виде препептидов, т.е. их предшественники, помимо последовательности зрелого токсина, содержат сигнальный пептид (рисунок 33А). Структура предшественников большинства токсинов пауков более сложная: они являются препропептидами, т.е. вдобавок к сигнальному пептиду содержат еще пропоследовательность, отщепляемую посттрансляционно (рисунок 33Б). При этом пропоследовательность препропептидов у пауков почти всегда расположена между сигнальным и зрелым пептидами; в случае некоторых токсинов скорпионов (интересно, что линейных) пропоследовательность находится в С-концевой части препропептида.

Что касается С-концевой части токсинов, то здесь имеют место традиционные для секретируемых пептидов посттрансляционные модификации:

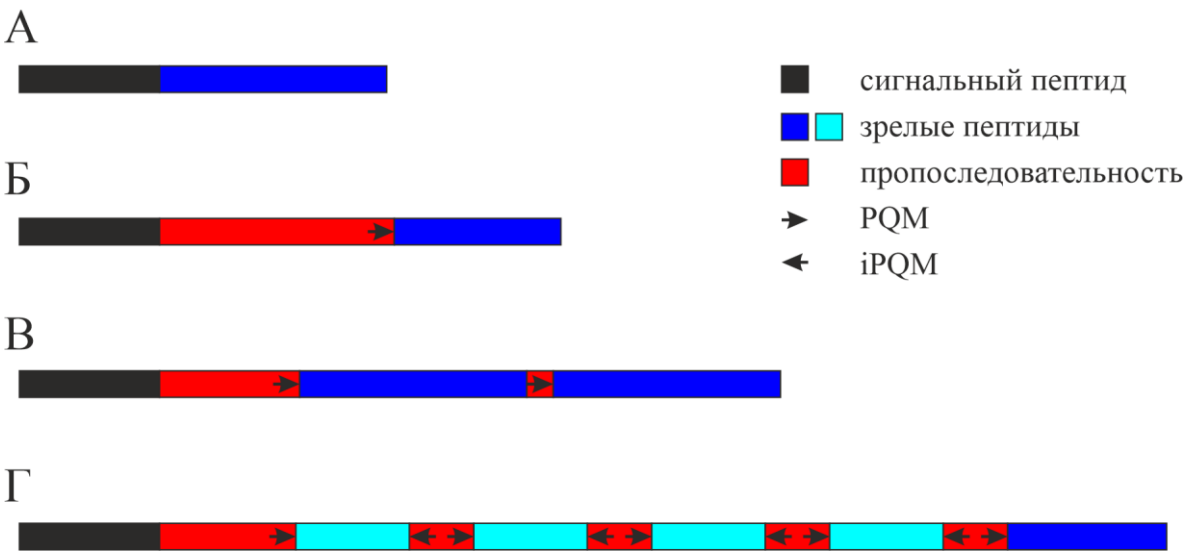
(1) удаление положительно заряженных а.о. — под действием ферментов с субстратной специфичностью, подобной карбоксипептидазе В, аналогичных хорошо известной кар-

боксипептидазе E, участвующей в созревании гормонов и нейропептидов у млекопитающих (758);

(2) превращение C-концевого остатка глицина в -NH_2 амидной группы предыдущего а.о., т.е. осуществлении C-концевого амидирования — по-видимому, консервативным аппаратом пептидилглицин α-амидирующей монооксигеназы (759, 760).

Выше (раздел «Разнообразие дисульфид-содержащих пептидов из яда паукообразных») нами были обсуждены два мотива (PSM и ESM), которые описывают расположение остатков цистеина в зрелых пептидных токсинах пауков (158). В дополнение к ним С.А. Козловым был также обнаружен мотив, содержащий четыре подряд расположенных а.о. и всегда завершающийся остатком аргинина: $X_1X_2X_3R$, где хотя бы один X является остатком глутаминовой кислоты. Этот мотив получил название «квадруплетного мотива процессинга» (англ. processing quadruplet motif, PQM) (124). Он определяет положение N-концевого а.о. зрелого токсина: следующий за PQM а.о. является первым в зрелой цепи. Иначе говоря, совместное применение алгоритма предсказания сигнального пептида и обнаружение в структуре предшественника PQM позволяет однозначно локализовать пропоследовательность, которая отщепляется посттрансляционно в ходе созревания токсина (рисунок 33Б).

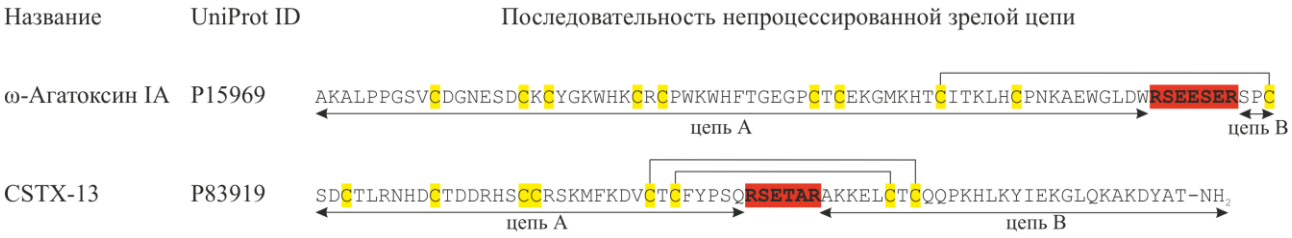
Рисунок 33. Строение белков-предшественников токсинов паукообразных. Аминокислотная последовательность условно представлена прямоугольником. Составные элементы: сигнальный пептид, пропоследовательность и зрелые цепи — показаны прямоугольниками различных цветов. Мотивы PQM и iPQM обозначены стрелками. (А) Простейшее строение препептида. (Б) Стандартное строение препропептида. (В) «Двойной» предшественник, содержащий две гомологичные зрелые цепи. (Г) «Сложный» предшественник, содержащий различные (как гомологичные, так и негомологичные) зрелые цепи. На панелях (В, Г) изображены предшественники латарцинов (99, 107).



У пауков встречаются еще более сложные случаи, когда один ген кодирует не один, а два или даже сразу несколько зрелых токсинов (рисунок 33В, Г). Интересно, что известные в настоящее время такого рода примеры относятся только к цитолитическим пептидам. Насколько это просто случайность — предмет выяснений в будущем. Так или иначе, здесь возникает проблема точной локализации С-концевого а.о. зрелых цепей, за исключением С-концевой. Если использовать только мотив PQM, это накладывает ограничения на структуру С-концевой области таких зрелых цепей, поскольку она должна содержать необходимые остатки глутамата. Оказывается, что в структуре таких предшественников имеет место другой мотив, очень похожий на PQM, но с «обратным» расположением ключевых а.о. Этот мотив получил название iPQM, где “i” означает “inverted” (инвертированный): $RX_1X_2X_3$, где хотя бы один X является остатком глутаминовой кислоты. Использование PQM и iPQM решает задачу: теперь все служебные а.о. локализованы в отщепляемой части и не входят в состав зрелых цепей (рисунок 33Г).

Больше того: в яде пауков встречаются двуцепочечные токсины, в составе которых полипептидные цепи удерживаются S-S-мостиками. Оказывается, что их структуру можно надежно предсказать с помощью мотивов PQM и iPQM, которые точно обозначают места внесения разрывов в полипептидную цепь (рисунок 34).

Рисунок 34. Процессинг двуцепочечных токсинов пауков. Показана аминокислотная последовательность токсинов после отделения сигнального пептида и пропоследовательности, но до разделения на две цепи. Зрелые цепи указаны стрелками, остатки цистеина отмечены желтым фоном, отщепляемая последовательность — красным, межцепочечные дисульфидные связи показаны линиями.



Важным событием стало обнаружение в составе яда *C. salei* протеазы, способной узнавать и вносить разрывы по мотивам PQM/iPQM (761). Предполагается, что этот белок, названный PQM-протеазой, служит тем самым процессирующим ферментом, ответственным за созревание токсинов. Во всяком случае, приводится целый ряд аргументов в пользу такого заключения: специфичность в отношении мотивов процессинга; способность гидролизовать последовательности, содержащие не только PQM, но и iPQM; активность в отношении субстратов, имитирующих незрелые токсины; pH-оптимум ≈ 6, соответствующий кислотности

яда; распространенность генов гомологов у пауков. В настоящее время не известно, где именно происходит процессинг: еще внутриклеточно в секреторном пути или уже внеклеточно в составе яда, ведь наличие в нем PQM-протеазы может быть просто результатом совместной секреции со зрелыми токсинами.

Известны исключения из общего строения предшественников токсинов пауков и правила мотивов PQM/iPQM. К примеру, предшественник токсина PnTx3-2 из яда *Ph. nigriventer* (UniProt ID: O76201) отличается от зрелого пептида, помимо обычных N-концевых сигнального пептида и пропоследовательности, также короткой C-концевой пропоследовательностью, при этом мотивы PQM/iPQM здесь отсутствуют, зато имеется кексин-фуриновый сайт. Несколько нобычен пример токсина ω-ACTX Hi2a из яда австралийского воронкового паука *H. infensa*: его зрелая форма амидирована, но в структуре предшественника помимо стандартных глицина и аргинина на C-конце имеются еще два а.о. (566).

Процессинг латротоксинов тоже необычен: дело в том, что в N-концевой области их предшественников вместо ожидаемых типичных сигнальных пептидов обнаруживаются короткие гидрофильные последовательности, отделенные от зрелых цепей типичными кексин-фуриновыми двухосновными сайтами. Таким образом, синтезированные на рибосоме латротоксины локализованы в цитоплазме. По всей видимости, они секретируются голокриновым механизмом. Более того, процессинг коротких N-концевых последовательностей не объясняет Мм зрелых латротоксинов; в этой связи были предположены дополнительные сайты процессинга в C-концевых областях предшественников латротоксинов, которые могли бы распознаваться кексин / фурин-подобными ферментами. Важно, что предшественник δ-LIT неактивен (729), а рекомбинантные белки, соответствующие предполагаемым процессированным продуктам с N и C-концов, неотличимы от природных токсинов (729, 753, 762). Предполагается, что процессинг латротоксинов происходит уже после секреции, в просвете ядовитой железы.

Посттрансляционные модификации, за исключением «обычных» C-концевого амидирования, удаления пропоследовательностей и образования дисульфидных мостиков (скорей котрансляционно), редки у токсинов паукообразных. Наиболее известны два примера. Первый — это наличие D-аминокислоты (S46) в структуре ω-Aga IVB из яда *A. aperta* (у близкого по структуре ω-Aga IVA в этом положении глицин). Зрелый токсин образуется из предшественника, названного ω-Aga IVC и содержащего только L-аминокислоты. Реакция эпимеризации катализируется специальным ферментом, обнаруженным в составе яда паука и имеет вполне значимые последствия: эффективность ингибирования $Ca_v2.1$ токсином возрастает согласно данным одной группы в ≈4–5 раз (763) и согласно данным другой — в 80–90 раз (764).

Второй пример — O-ацилирование пальмитиновой кислотой C-концевого треонина у PLTX-II (P34079) из яда паука *P. tristis*, который ингибирует Ca_v в эмбриональных нейронах дрозофилы (765). Наличие модификации принципиально важно для его биологической активности: приложение 5 мкМ синтетического пептида без остатка жирной кислоты не имело эффекта на нервно-мышечном синапсе личинки дрозофилы, тогда как добавление 5 нМ пептида с этим остатком приводило к блоку синаптической передачи (766). Аналогичная модификация была впоследствии обнаружена у другого токсина из яда того же паука, названного δ/ω-PLTX-Pt1a (P0DL38) и проявляющего менее выраженную активность против Ca_v, зато являющегося мощным активатором Na_v (767). В этом случае модификации подвергается остаток серина, расположенный за один до C-конца. Вполне возможно, что ацилированы и другие токсины в яде *P. tristis*.

Сообщалось о фосфорилировании остатков серина / треонина и N-гликозилировании многих токсинов *T. serrulatus* (768), однако не приводилось данных о представленности модифицированных токсинов в яде или их активности, так что судить о биологической значимости таких модификаций не представляется возможным. Напротив, вполне вероятно, что модификации произошли случайно или же это артефакт исследовательских манипуляций.

Стоит отметить, что модификации типа изомеризации, не приводящие к изменению Мм как расмотренные выше для ω-Aga IVB (в этом разделе) и PcaTX-1 (см. «Другие токсины пауков, воздействующие на Na^+ каналы»), сложно обнаружить, их не детектируют при рутинном анализе состава яда и даже при установлении первичной структуры токсинов. Вполне возможно поэтому, что распространенность таких модификаций существенно шире, чем представляется нам теперь, и их содержат даже некоторые из уже изученных токсинов.

1.17. Эволюция токсинов паукообразных

Автор не является специалистом в области эволюционной биологии, молекулярной эволюции или геномики, поэтому воздерживается от детального рассмотрения возможных механизмов и их критической оценки. Однако он всё же делает попытку обобщить существующую специальную литературу.

В настоящее время эволюционный аспект разнообразия токсинов паукообразных мало исследован. Это связано прежде всего с недостаточностью накопленных данных, в частности полных секвенированных геномов (таблица 22), а также качеством их обработки.

Таблица 22. Секвенированные геномы пауков и скорпионов. Поиск в NCBI Genome по запросу "Arachnida[Organism]" 28 декабря 2019 г.

Отряд	Семейство	Вид	NCBI Genome ID	Литература
Пауки	Dysderidae	*Dysdera silvatica*	82280	(769)
	Eresidae	*Stegodyphus mimosarum*	12925	
	Lycosidae	*Pardosa pseudoannulata*	83627	(770)
	Nephilidae	*Trichonephila clavipes*	80095	(771)
	Theraphosidae	*Acanthoscurria geniculata*	22960	(772)
	Theridiidae	*Anelosimus studiosus*	83943	
		Latrodectus hesperus	14107	
		Parasteatoda tepidariorum	13270	(773)
	Sicariidae	*Loxosceles reclusa*	14028	
Скорпионы	Buthidae	*Mesobuthus martensii*	14571	(80)
		Centruroides sculpturatus	14105	

Очевидно, что для создания убедительной картины эволюции токсинов в идеале необходимы хорошо аннотированные полногеномные данные высокого качества с информацией о тканеспецифичности экспрессии генов для нескольких близкородственных видов ядовитых животных, а также их более дальних родственников, включая неядовитых; очень желательны данные о предковых формах. Более того, эволюцию токсинов нельзя рассматривать в отрыве от эволюции ядовитых желез, яда как смеси токсинов, знания выполняемых ими функций, т.е. каковы именно природная мишень и механизм действия, а также коэволюции с организмами, против которых нацелен яд. Не будет преувеличением сказать, что мы располагаем лишь очень фрагментарной картиной. Тем не менее, некоторые вопросы, долгое время будоражившие умы токсинологов, в настоящее время всё же решены. К примеру, можно уверенно утверждать, что разнообразие полипептидных токсинов в яде одного животного

есть результат экспрессии семейств генов и формируется по схеме «один ген — один токсин» в большинстве случаев; другие способы увеличения разнообразия редки и вносят небольшой вклад. Сравнение протеомных, транскриптомных и геномных данных для американского домового паука *Parasteatoda tepidariorum* (Theridiidae) позволило предположить существенный вклад образования альтернативных транскриптов в разнообразие токсинов (774), однако речь идет только о двух-трех реальных компонентах яда, и требуется дополнительное подтверждение — как на уровне транскриптов, так и путем очистки соответствующих белков.

Для рассмотрения процесса формирования современного состава яда разумным представляется выделить следующие основные этапы, которые необязательно следуют строго последовательно: (1) первоначальное происхождение токсинов из каких-то предковых соединений; (2) образование мультигенных семейств, кодирующих токсины; (3) дальнейшая оптимизация состава яда. Стоит отметить также, что почти ничего не известно об эволюции низкомолекулярных компонентов яда паукообразных, хотя бы по той причине, что нет данных о механизме их биосинтеза, а следовательно и о генах, кодирующих соответствующие ферменты.

1.17.1. Происхождение токсинов

Наличие ядовитых желез — плезиоморфный признак отряда пауков, т.е. общий предок современного видового разнообразия, по всей видимости, был ядовит. Во всех исследованных на этот счет ядах пауков обнаружены токсины с укладкой ICK; представляется поэтому, что они так же происходят от общего предка и являются характерной чертой яда пауков. При этом компоненты с другим типом структуры менее универсальны и были найдены не у всех исследованных видов.

Похожая ситуация наблюдается в случае яда скорпионов: у всех исследованных видов были обнаружены токсины с укладкой CSα/β. Однако в данном случае встречаются две большие и хорошо различимые группы токсинов (короткого и длинного типов — KTx и NaTx, воздействующие на K^+ и Na^+ каналы, соответственно). В настоящее время предполагается независимое происхождение этих двух групп, так что у предкового скорпиона, по-видимому, уже имели место оба типа токсинов. При этом две группы токсинов длинного типа, воздействующих на Na^+ каналы, а именно α и β-NaTx, вероятно, разделились уже в ходе эволюции скорпионов: как отмечалось выше, для обитателей Старого Света более характерны α-NaTx, в то время как у животных Нового Света встречаются преимущественно β-NaTx. В геноме современных видов обнаруживаются гены полипептидов с предполагаемыми ха-

рактеристиками общего предка α и β-NaTx: удлиненными N- и C-концевыми последовательностями, но только тремя «коровыми» S-S-мостиками (775).

Общепринятой является точка зрения, что пептидные и белковые токсины, выполняющие экзогенную функцию, гены которых экспрессируются в (ядовитых) железах внешней секреции, происходят от соединений, имевших эндогенную функцию у предковых организмов. К примеру, знаменитые α-нейротоксины змей, по всей видимости, родственны эндогенным модуляторам nAChR (776). Аналогично предполагают, что токсины паукообразных родственны каким-то полипептидам, имеющим какую-то функцию внутри организма пауков или скорпионов. В настоящее время плохо изучен вопрос происхождения токсинов пауков с укладкой ICK. А вот токсины скорпионов с укладкой CSα/β с большой вероятностью происходят от дефензинов — ЗП, представляющих собой эффекторное звено врожденного иммунитета (777). В частности, наблюдается сходство аминокислотной последовательности и пространственной организации KTx и дефензинов беспозвоночных. Предполагаемую эволюцию удается смоделировать: путем внесения небольшой модификации в структуру дефензина паразитоидной осы *Nasonia vitripennis* был получен блокатор K^+ каналов (778). Для создания модулятора Na^+ каналов в структуру дефензина необходимо внести более существенные изменения (779), однако предполагается, что обе большие группы токсинов скорпионов — KTx и NaTx — происходят от дефензинов.

Что касается непосредственно механизма превращения «физиологичного» соединения с эндогенной функцией в токсин для экзогенного применения — процесса т.н. «вооружения» (англ. weaponisation), то в литературе, посвященной животным ядам, наибольшее внимание уделяется двум сценариям, и обсуждаются они главным образом для токсинов змей. (а) При генном «рекрутинге» (recruitment) вначале предполагается дупликация исходного «физиологичного» гена, одна из копий которого «высвобождается» из-под давления отбора и может мутировать, случайно найденные «удачные» мутации, сообщающие соединению функцию токсина, закрепляется положительным отбором. В таком случае говорят, что произошла «неофункционализация» (780) — у существовавшего ранее соединения появилась новая функция токсина. (б) При генной «рестрикции» предполагают иную последовательность событий: изначально плейотропный ген после дупликации и мутации образовавшихся копий с утратой части функций превращается в два гена с меньшим функционалом — происходит «субфункционализация» (781), и токсин теперь производится независимо от «физиологичного» соединения. Возможны и другие сценарии, например просто смена тканеспецифичности экспрессии (т.н. «совместительство», англ. moonlighting) (782), а рекрутинг, по-видимому, может проходить и в обратную сторону (783).

Соблазнительно думать, что ацилполиамины — наиболее изученные низкомолекулярные компоненты яда паукообразных — происходят от эндогенных полиаминов, ввиду сходства строения и активности в отношении ионных каналов (784). Любопытно, что среди диаминных звеньев в составе ацилполиаминов встречается кадаверин (например, в составе аргиопина). Этот диамин образуется из лизина под действием лизиндекарбоксилазы (EC 4.1.1.18), однако такой фермент у животных не найден. Поэтому заманчивая гипотеза заключается в том, что его ген получен от бактерий горизонтальным переносом или даже что сами соединения синтезируются симбионтами. До получения хотя бы каких-то данных о биосинтезе ацилполиаминов или геноме их продуцентов это всё лишь фантазии.

Лучше дело обстоит с наиболее изученными белковыми токсинами. PLD, гомологичные некротоксинам *Loxosceles* spp., широко, но фрагментарно представлены в живой природе. Предполагается, что их общий предок бактериального происхождения, а эволюция включала акты горизонтального переноса генов между бактериями и эукариотами, многочисленные дупликации и потерю генов. Гомологи токсинов, по всей видимости, выполняют какие-то «физиологичные» функции — как у неядовитых организмов, так и у самих *Loxosceles* spp. (720, 785).

Расшифровка генома *P. tepidariorum* преподнесла сюрприз: оказалось, что он богат генами гомологов латротоксинов с признаками недавних дупликаций (786). При этом важны различия с *Latrodectus* spp.: только некоторые гены характеризуются тканеспецифичной экспрессией в ядовитых железах, их транскрипты составляют лишь малую долю от всех транскриптов ядовитых желез, среди этих генов не обнаружено ортолога α-LTX. Всё это согласуется с существенно более низкой токсичностью яда *P. tepidariorum* для человека (29), а также отсутствием на электрофореграмме яда выраженной полосы с характерной для латротоксинов подвижностью (787) [в другом исследовании соответствующие полосы обнаружены (774)]. По всей видимости, возникновение α-LTX в результате дупликации гена латроинсектотоксина — недавнее событие, высокая токсичность яда для позвоночных — адаптация более крупных *Latrodectus* spp. по сравнению с другими представителями семейства для охоты, а опасность для человека — просто дело случая (786, 788). За пределами Theridiidae латротоксины не обнаружены, однако гомологичные гены найдены у *Diplorickettsia massiliensis*, бактериального эндосимбионта клещей *Ixodes ricinus*, что наводит на мысль о горизонтальном переносе генов (786). К этой гипотезе стоит относится осторожно, во всяком случае до накопления достаточного объема геномных данных родственников пауков-тенетников.

1.17.2. Эволюция состава яда

После «вооружения» — возникновения токсинов — следует цепочка событий, приводящая к становлению общего состава яда. Токсины паукообразных, как правило, кодируются мультигенными семействами, и для их возникновения и дальнейшей эволюции свойственны некоторые закономерности. Наиболее часто при рассмотрении животных токсинов упоминают две модели, они обсуждаются, в основном, для яда морских анемон и змей: (а) «согласованной эволюции» (англ. concerted evolution) (789) и (б) «инновации-амплификации-диверсификации» (innovation-amplification-diversification) (790). Первая подразумевает увеличение дозы генов токсинов и консервативность их последовательностей в результате генной конверсии или неравного кроссинговера. Вторая содержит элементы моделей возникновения токсинов (нео- или субфункционализации): предковый ген наделяется слабой дополнительной активностью, что приводит к увеличению его дозы за счет дупликаций, зачастую множественных, приводящих к своеобразной экспансии генов токсинов. Гены получившегося семейства затем могут специализироваться и приобретать новые функции, а также превращаться в псевдогены. Появление новых генов в семействе и утрату старых обозначают как «рождение и смерть», а диверсификацию объясняют действием положительного отбора.

В литературе отмечают ряд факторов дальнейшей оптимизации яда паукообразных. При этом стоит оговориться, что в большинстве случаев речь идет об умозаключениях общего характера, сделанных на основе наблюдаемого состава, и предположениях, касающихся возможных биологических функций токсинов, — без экспериментальной проверки. Потому ко всему содержанию этого раздела стоит относиться как к дискуссионным гипотезам.

1. Селективность и эффективность: отбор токсинов как высокоточного оружия, действующих наиболее специфично и мощно. По-видимому, благодаря такому отбору в руках исследователей и оказались молекулы, селективно узнающие определенные мишени (см. подробней о токсинах паукообразных как молекулярных инструментах исследования нервной системы в специальном разделе ниже; в таблице 23 приведен список мишеней, селективно узнаваемых токсинами паукообразных). Что касается биологического смысла такого отбора и вопроса о том, имеет ли он отношение к реальности, то тут необходимы оговорки. С одной стороны, такое предположение кажется очевидным: чем более селективно и эффективно воздействие на мишень в организме жертвы или обидчика, тем лучше функция яда. С другой стороны, не всё так просто. Во-первых, как мы подчеркивали выше, яд паукообразных содержит сразу много токсинов, поэтому его функция не сводится к какому-то одному, и отбор вряд ли направлен на модификацию только одного токсина. Во-вторых, молекулярный механизм действия токсинов в большинстве случаев изучен на мишенях, не являющихся

биологически релевантными. Строго мы должны бы исследовать их на тканях, клетках и молекулах, характерных для тех организмов, с которыми встречается паук или скорпион и против которых использует свой яд. Однако чаще всего исследуют попросту доступные и наиболее распространенные материалы и объекты, поэтому биологическую значимость полученных результатов можно лишь предполагать. В-третьих, в идеале нужно рассматривать процесс в динамике: сравнивать современные токсины с предковыми формами. Информацию о последних можно было бы получить из палеогенетических данных (геномов древних пауков или скорпионов; таких в настоящее время нет) или путем реконструкции (в результате сравнения генов токсинов представителей разных таксонов; такие работы становятся возможными). Наконец, в-четвертых, эволюцию яда необходимо рассматривать в рамках коэволюции ядовитых животных и тех организмов, против которых яд используется.

Выше (раздел «Молекулярный состав яда паукообразных») мы упоминали, что, по общему убеждению, т.н. «метаболические затраты» производства яда высоки. В этой связи традиционно говорят об «эволюционных компромиссах» (англ. “trade-offs”) между ядом (его эффективностью, количеством выработки) и другими признаками, такими как размер животного, производство ловчей сети, специализация кормовой базы. Считается общепризнанным наличие такого компромисса у скорпионов — между размерами и эффективностью использования клешней педипальп и тельсона с жалом (791). Интересно, что недавняя работа не выявила похожих компромиссов в случае пауков, например между размерами тела или использованием паутины и эффективностью яда (91).

2. Функциональное разнообразие, т.е. продукция молекул, действующих на различные мишени. Оно обеспечивает резкое возрастание числа потенциальных жертв и снижает вероятность выработки ими устойчивости к яду. Очень хорошо изучен в этом отношении яд *A. aperta*, состав которого обсуждался нами подробно выше и в котором содержатся α-агатоксины (ацилполиамины, блокирующие GluR и препятствующие сокращению мышечных клеток насекомых), μ-агатоксины (пептидные нейротоксины, модуляторы-активаторы Na^+ каналов в мембранах нейрональных клеток насекомых, способствуют выбросу нейромедиаторов) и ω-агатоксины (пептидные нейротоксины, ингибиторы Ca^{2+} каналов в нейронах, препятствуют выбросу нейромедиаторов), по-разному действующие на различные ионные каналы (см. соответствующие разделы выше). Другие хорошо изученные яды паукообразных показывают похожее функциональное разнообразие компонентов. К примеру, в составе яда *Ph. nigriventer* обнаружены разнообразные токсины, воздействующие на Na^+ и Ca^{2+} каналы, в яде *H. versuta* — лиганды K^+, Na^+ и Ca^{2+} каналов, а в яде скорпионов обычно находят разнообразные блокаторы K^+ каналов и активаторы Na^+ каналов (см. соответствующие разделы выше).

3. Синергизм: различные по структуре и механизму действия компоненты усиливают функции друг друга при совместном использовании. При этом эффективная действующая концентрация отдельных компонентов значительно снижается. Убедительно продемонстрирован синергизм действия между компонентами яда пауков *A. aperta* (α и μ-агатоксинами, а также различными ω-агатоксинами; см. рисунки 19 и 21) (100) и *C. salei* (солями калия, гистамином, цитолитическими и нейротоксическими пептидами) (161, 165, 634). Эти случаи обсуждались выше.

Для токсинов моллюсков конусов Б. Оливера разработал концепцию «групп заговорщиков» (англ. cabals), подразумевающую согласованность действия нескольких типов компонентов яда для достижения определенного физиологического эффекта (139). На наш взгляд, эта концепция подходит и для описания действия яда паукообразных. Например, α и μ-агатоксины из яда паука *A. aperta* образуют одну группу заговорщиков, вызывающую быстрый паралич. Другая группа сформирована медленно действующими ω-агатоксинами, которые вызывают длительный вялый паралич (100).

4. Биомолекулярное разнообразие: этот термин мы предложили для описания продукции ядовитыми животными целых множеств компонентов со сходной функцией и структурой, отличающихся специфичностью и/или механизмом действия (792, 793). В настоящее время в литературе закрепилось представление о «комбинаторных библиотеках» токсинов, которые находят в природных ядах. Это явление рассмотрено нами подробнее в следующем разделе.

5. Наконец, общим местом в рассуждениях об эволюции токсинов служит упоминание т.н. **«ускоренной эволюции»** (794, 795). Зачастую предполагают, что гены токсинов относятся к наиболее быстро меняющимся. Как правило, упоминают два соображения. Во-первых, считают, что пары «ядовитое животное–жертва / обидчик» вступают в т.н. «гонку вооружений». В этом случае предполагают действие т.н. «принципа Черной королевы»: гены мишеней токсинов мутируют, чтобы выработать устойчивость, а гены токсинов — с тем, чтобы продолжать эффективно работать, и в этом цикле обратных связей происходит ускорение. Стоит отметить, что несмотря на привлекательность, экспериментально гонка вооружений для яда паукообразных не показана, что связано с трудностью проведения подходящего исследования. Среди других ядовитых животных подобную ситуацию усматривают для пары «подвязочные змеи–тритоны»: в этом случае показано, что в популяциях змей, симпатричных с тритонами, накапливающими тетродотоксин, возникают мутации в генах Na^+ каналов, обусловливающие устойчивость. Однако даже для этого наиболее исследованного случая получение, а особенно интерпретация экспериментальных данных оказывается сложной задачей, и утверждать с уверенностью, что мы наблюдаем гонку вооружений, нельзя (796).

Во-вторых, очень часто аргументируют, что гены токсинов находятся под действием положительного отбора, что нами уже отмечено выше. В качестве критерия используют наиболее распространенный и простой — отношение числа несинонимичных замен у родственных генов к синонимичным (точнее: отношение числа несинонимичных замен на несинонимичный сайт к синонимичным на синонимичный сайт; d_N/d_S). Важно при этом понимать ограничения этого сравнительного метода: он не дает информации о том, какой именно отбор имеет место (например, балансирующий или направленный положительный), и не может сказать, продолжает ли отбор действовать или же он имел место в прошлом.

1.17.3. Яд как комбинаторная библиотека токсинов

Компоненты, особенно пептидные, яда многих пауков, скорпионов, анемон, моллюсков и змей составляют т.н. «природные комбинаторные библиотеки» биологически активных молекул, отобранных в процессе эволюции. Действительно, если сравнить аминокислотные последовательности всех токсинов, выделенных из одного яда, выведенных из транскриптома ядовитых желез или геномных данных, то окажется, что большинство родственны друг другу и содержат консервативные элементы (чаще всего остатки цистеина), определяющие общность пространственной укладки. При этом для неконсервативных частей свойственна повышенная или даже гипервариабельность, которая в конечном итоге и определяет разнообразие мишеней токсинов.

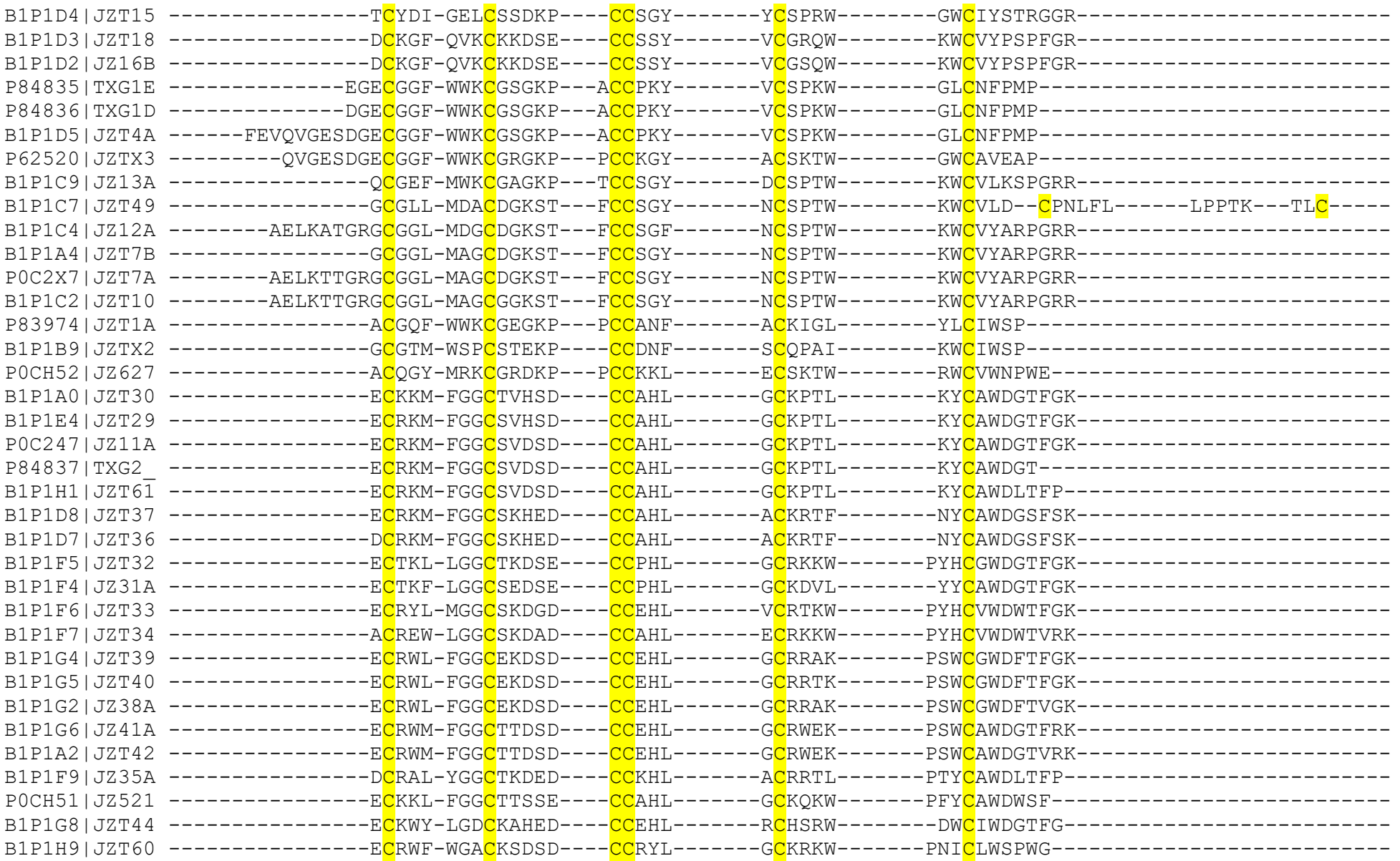
Пример такого сравнения приведен на рисунке 35 для токсинов паука *Ch. guangxiensis*, достаточно подробно изученного китайскими исследователями под руководством С. Ляна (Хунаньский педагогический университет, Китай) (797). Хорошо видны перечисленные особенности: большинство обнаруженных последовательностей токсинов родственны и содержат инвариантный мотив цистинового узла; петли между консервативными остатками цистеина (гипер)вариабельны, в результате при сравнении всех токсинов абсолютно консервативными оказываются только остатки цистеина. Отметим, что при таком сравнении также проявляются другие рассмотренные нами выше особенности токсинов пауков: N-концевая область значительно более консервативна, петля между первыми двумя остатками цистеина почти всегда содержит шесть а.о. (мотив PSM), для С-концевой области характерна высокая вариабельность, стабилизация структуры осуществляется за счет введения дополнительных S-S-мостиков, в частности мотива ESM.

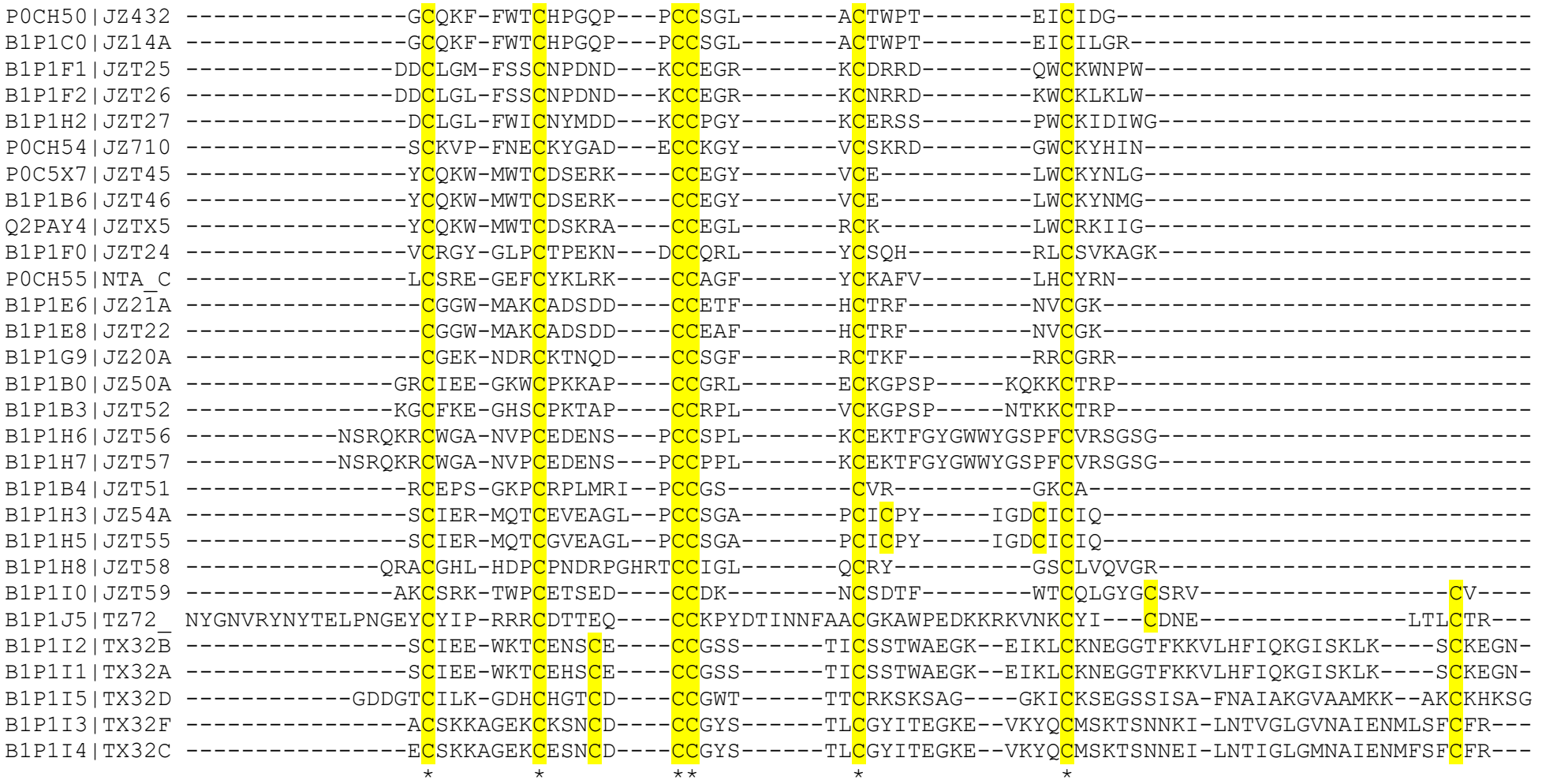
Иногда под комбинаторной библиотекой понимают не множество компонентов одного яда, а семейство или суперсемейство (группу родственных) токсинов, например из яда пауков, содержащих цистиновый узел. Можно считать, что мы имеем дело с громадной природной библиотекой, которая была отредактирована эволюцией. Если принять эту логику, то

аргументированным кажется поиск селективных лигандов ионных каналов и нейрорецепторов в природных ядах: ведь в ядах содержатся именно такие компоненты (подробно описывались в нашем обзоре), а эволюционный отбор придает поиску дополнительные шансы.

Комбинаторика наиболее ярко проявляется в случае пептидных нейротоксинов, однако характерна и для других компонентов яда (отмечалась выше для ацилполиаминов). Механизм формирования такого биомолекулярного разнообразия, по-видимому, универсален для пептидных нейротоксинов и цитолитических пептидов из яда паукообразных и основан на существовании мультигенных семейств, кодирующих токсины. Биосинтез пептидных компонентов яда протекает по общей схеме, рассмотренной нами в предыдущей главе: для большинства характерна «стандартная» организация молекул-предшественников в виде прео или препропептидов. Как правило, пре(про)участки предшественников консервативны, а зрелые цепи отличаются большей вариабельностью — мутации как будто концентрируются в тех областях генов, которые соответствуют зрелым токсинам.

Рисунок 35. Сравнение аминокислотных последовательностей токсинов паука *Ch. guangxiensis*.





Выбраны все аннотированные последовательности белков *Ch. guangxiensis* (из базы Swiss-Prot; всего 105 штук на 7 августа 2021 г.), удалены не содержащие мотив цистинового узла (14 шт.), для предшественников проведено процессирование по мотиву PQM в N-концевой области, после чего убраны идентичные и содержащие нечетное число остатков цистеина (1 шт.) последовательности. Сравнение выполнено в программе MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform, версия 7.471; https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/) с пользовательскими установками (Matrix: BLOSUM30; Gap open penalty: 2.0; Gap extention penalty: 1; Order: aligned; Tree rebuilding number: 5; Maxiterate: 5), вручную внесены незначительные изменения — для оптимального выравнивания B1P1C7, B1P1H3, B1P1H5, B1P1I0 и B1P1J5. Остатки цистеина выделены желтым.

1.18. Токсины паукообразных как молекулярные инструменты исследования нервной системы

Как видно из таблицы 23, разнообразие мишеней, на которые воздействуют токсины из яда пауков и скорпионов, велико. Это и наиболее «обычные» мишени природных ядов — потенциал-чувствительные и хемовозбудимые ионные каналы, участвующие в распространении и передаче нервного импульса, и другие ионотропные рецепторы, и другие белки мембран нейронов. Более того, разнообразием отличаются и способы воздействия токсинов на их мишень. В этом смысле наиболее разнообразны токсины, воздействующие на Na_v: среди них обнаруживаются как блокаторы поры, так и различные модификаторы активации и инактивации. По-видимому, причина в том, что для выполнения своей задачи — обездвиживания жертвы — яд может по-разному нарушать функцию именно Na_v, имеющих принципиальное значение для электровозбудимости нейронов и миоцитов.

Таблица 23. Разнообразие молекулярных мишеней токсинов паукообразных.

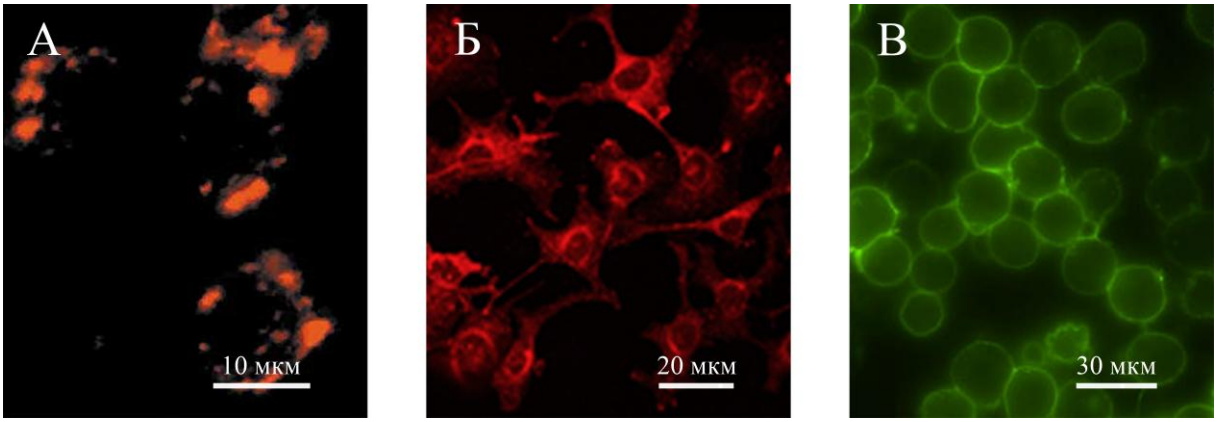
Мишень	Токсин	Механизм	Литература
K^+ каналы	CTX	Поровый блокатор	(336)
	HaTx1	Ингибитор активации	(365)
Na^+ каналы	PnTx1	Поровый блокатор	(480)
	ProTx II	Ингибитор активации	(379)
	Css IV	Способствует активации	(419)
	Aah II	Ингибитор инактивации	(419)
Ca^{2+} каналы	ω-Aga IIIA	Поровый блокатор	(550)
	ω-Aga IVA	Ингибитор активации	(553)
GluR	Аргиопин	Поровый блокатор	(798)
ASIC	PcTx1	Способствует инактивации	(606)
	Hi1a	Ингибитор активации	(604)
Piezo	GsMTx-4	Ингибитор активации	(644)
TRPA	WaTx	Способствует активации	(362)
TRPV	DkTx	Активатор	(594)
Молекулы клеточной адгезии	α-LTX	Связывается и встраивается в мембрану	(799)

Нахождение в ядах активаторов болевых рецепторов объясняют их значением для отпугивания агрессоров. А вот присутствие некоторых других соединений, например ингибиторов болевых рецепторов, сложно объяснить; по-видимому, их природная мишень другая, или здесь дело в случайности: в результате работы механизмов, приводящих к образованию

комбинаторных библиотек токсинов, среди них встречаются и такие, что воздействуют на разнообразные случайные рецепторы. Так или иначе, доступными оказываются соединения, селективно и определенным образом воздействующие на молекулярные компоненты нервной системы и других органов, тканей и клеток. Неудивительно, что в руках исследователей такие соединения превращаются в инструменты изучения соответствующих объектов.

Два способа применения селективных лигандов рецепторов наиболее интуитивны: (1) с целью управления функцией соответствующего рецептора и (2) для его обнаружения и/или визуализации путем использования меченых лигандов (рисунок 36). Метка может быть различной, например: (а) радиоактивной, (б) флуоресцентной, (в) фотоактивируемой, (г) кросс-сшивающей (800). На этом возможности не исчерпываются; к примеру, лиганды могут использоваться в структурной биологии для изучения строения рецептора в определенном функциональном состоянии. Меченые токсины можно использовать в скрининговых системах для идентификации новых лигандов интересующих рецепторов. Наконец, некоторые токсины продемонстрировали значительный потенциал в качестве диагностических инструментов.

Рисунок 36. Примеры визуализации ионных каналов с помощью флуоресцентно-меченых токсинов и их аналогов. (А) Локализация Na^+ каналов с помощью Ts 1-Alexa Fluor 568 на поверхности клеток линии GH3 (801). (Б) Клетки линии PC12, обработанные STX-DCDHF (802). (В) Клетки линии HEK293, экспрессирующие каналы $K_{Ca}1.1$, обработанные биотинилированным IbTx и визуализированные с помощью стрептавидина-Alexa Fluor 488 (803). Разрешения у Elsevier и Springer получены для обзорной статьи (804), из которой заимствован рисунок.



Примеры возможностей применения токсинов паукообразных в исследовании нервной системы приведены в таблице 24. Ниже мы рассмотрим некоторые из них подробнее.

Таблица 24. Области применения токсинов паукообразных в исследованиях.

Исследовательская задача	Примеры	Литература
Идентификация, очистка и реконструкция рецепторов	[^{125}I]Lqq V [^{125}I]CTX α-LTX	(805) (806) (742, 745)
Различение рецепторов и их изоформ	[^{125}I]CTX [^{125}I]HgTX1* HmTx1 ProTx II ω-Aga IVA	(807, 808) (809) (506) (810) (811-814)
Изучение субъединичного состава рецепторов	[^{125}I]Lqq V AgTx-2 ProTx II GxTx-1E	(805) (815) (816) (817)
Исследование лиганд-рецепторных взаимодействий	[^{125}I]Css2 LqqV-DACA	(818) (819)
Структурные исследования рецепторов	AgTx-2 BeKm-1 ProTx II Aah II DkTx	(342, 343, 346) (820) (516) (418) (672)
Скрининговые анализы для поиска новых лигандов	AgTx-2-TAMRA	(821)
Локализация молекулярной мишени в клетках и тканях	[^{125}I]CTX Ts 1-Alexa Fluor 568 HgTX1-Cy3* IbTx-Alexa Fluor 488*	(807, 808) (801) (822) (823)
Наблюдение за динамикой рецепторов	Ts 1-TMR GxTx-1E-TMR	(824) (825)
Управление активностью мишени	HWTX-IV-Nvoc* HmTx1 ω-Aga IVA	(826) (506) (827, 828)
Диагностика заболеваний и разработка лекарств	HsTx1-Cy5* [^{125}I]ClTx, [^{131}I]ClTx ClTx-Cy5.5 HWTX-IV-Cy5	(829) (623) (621) (830)

Сокращения: DACA, 7-диметиламинокумарин-4-ацетильная группа; HgTX1, хонготоксин-1 (P59847; α-KTx 2.5); Nvoc, 4,5-диметокси-2-нитробензилоксикарбонильная группа; TAMRA, 5(6)-карбокситетраметилродамин; TMR, тетраметилродамин. *Помимо метки в структуру пептидов вносились другие модификации.

1.18.1. Изучение Na^+ каналов

Наиболее известен первый пример использования нейротоксина как молекулярного исследовательского инструмента, а именно — применение α-BgTx из южнокитайского многополосого крайта *Bungarus multicinctus* для идентификации nAChR (831, 832). В мире токсинов паукообразных с этой работой может соперничать пример использования α-NaTx для идентификации Na_v. С помощью α-NaTx [по всей видимости, использовался препарат Lqq V

(22), см. таблицу 10], модифицированного одновременно радиоактивной и фотоактивируемой метками, удалось показать, что Na_v содержат основную α (≈250 кДа) и дополнительную β-субъединицу (≈35 кДа) (805).

Современный пример использования фотоактивируемой метки — получение производного HWTX-IV с фотолабильной группой, присоединенной к остатку лизина (826). Это производное обладает значительно (в сотни раз) сниженной активностью в отношении Na_v, его облучение УФ-светом приводит к отсоединению метки и восстановлению активности токсина. Показано, что такое производное можно использовать для точного контролируемого ингибирования Na_v в срезах мозга мыши с помощью облучения лазером интересующей области.

Известное сегодня разнообразие лигандов Na_v позволяет идентифицировать отдельные изоформы каналов и изучать их функции. Токсин HmTx1 из яда птицееда *H. maculata*, проявляющий селективность в отношении изоформы $Na_v1.1$ (см. раздел «Ингибиторы инактивации Na_v из яда пауков»), был использован для демонстрации роли этих каналов в восприятии боли, связанной с механочувствительностью. Было показано, что среди нейронов спинальных ганглиев мышей чувствительность к токсину проявляют преимущественно формирующие волокна среднего диаметра (Aδ) и отвечающие на механическое раздражение. Кроме того, интраплантарное введение токсина приводило к сенситизации в отношении механических стимулов, но не термического раздражения. Применение токсина HmTx1 также показало, что $Na_v1.1$ экспрессируется в механочувствительных афферентах, иннервирующих пищеварительный тракт и демонстрирующих сенситизацию в модели синдрома раздраженного кишечника (506). Более того, токсины могут различать сплайс-формы каналов. К примеру, ProTx II оказался в ≈25 раз более активным в отношении сплайс-формы $Na_v1.5$, характерной для взрослых людей, по сравнению с неонатальной формой (810).

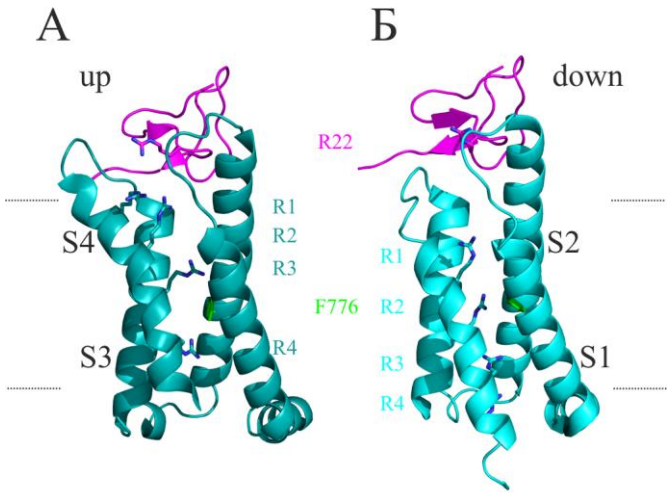
При помощи токсинов, взаимодействующих с различными ПЧД Na_v, таких как Aah II, PaurTx 3, ProTx I и II (подробно обсуждались в разделах «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы» и «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков»), удалось локализовать расположение β-субъединиц канала в комплексе еще до получения соответствующих данных структурной биологии (816). Дело в том, что эффективность действия токсинов, как оказалось, может зависеть от наличия β-субъединиц. Вместе с информацией о специфичности токсинов к различным ПЧД (396) эти данные позволили предположить, что β-субъединицы расположены в непосредственной близости от ПЧД (β1 от ПЧД III, β2 — от ПЧД I) и тем самым «защищают» их от токсинов (или иначе: токсины вынуждены конкурировать за связывание с ПЧД с β-субъединицами). Стоит отметить, что эти предсказания под-

твердились при изучении пространственной структуры каналов в комплексе с β-субъединицами (518).

Один из наиболее важных примеров использования токсинов паукообразных как исследовательских инструментов связан с изучением структуры неактивированного состояния сенсоров потенциала Na_v. Дело в том, что структурные исследования ионных каналов — как РСА, так и крио-ЭМ — по причинам пробоподготовки проводятся в отсутствие мембранного потенциала, т.е. при 0 мВ. *In vivo* в таких условиях потенциал-чувствительные каналы активируются, а состояние покоя у них наблюдается при потенциалах ниже порядка −40 мВ. Ввиду этого технического момента до самого последнего времени все изученные структуры потенциал-чувствительных каналов содержали ПЧД в активированном состоянии, а структура сенсоров потенциала в неактивированном состоянии представляла собой загадку. Полученные в 2019 г. структуры комплексов Na_v с токсинами паукообразных позволили эту загадку разгадать.

Выше упоминалось, что ≈20% крио-ЭМ изображений комплекса ProTx II с химерой бактериального Na^+ канала Na_vAb и Na^+ канала человека $Na_v1.7$ содержали ПЧД (суррогат ПЧД II $Na_v1.7$) в неактивированном состоянии (516). ProTx II относится к числу наиболее исследованных лигандов Na_v — ингибиторам их активации (см. выше раздел «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков»), предполагается, что механизм его действия состоит в препятствовании переходу ПЧД в активированное состояние. По-видимому, энергия связывания токсина оказывается достаточно большой, чтобы препятствовать активации ПЧД даже в условиях эксперимента крио-ЭМ при потенциале 0 мВ. На рисунке 37 показана пространственная организация ПЧД химеры $Na_vAb/Na_v1.7$ в активированном (up) и неактивированном (down) состояниях. Хорошо видно значительное смещение сегмента S4 и — как следствие — петли S3-S4, при этом другие части ПЧД (S1–3) остаются практически неизменными. В неактивированном состоянии сегмент S4 расположен на ≈11 Å «ниже», т.е. ближе к внутриклеточной стороне мембраны. При этом происходит перемещение воротных зарядов: если в активированном состоянии R1–3 расположены «выше» центра переноса заряда (англ. charge transfer centre; здесь F776), то в неактивированном состоянии R3 перемещается «ниже» этого центра, а R2 взаимодействует с ним. ProTx II препятствует верхнему положению S4: токсин положительно заряжен и отталкивает воротные заряды. Можно сказать, что критически важный остаток аргинина ProTx II (R22) конкурирует за сайт связывания с воротными зарядами.

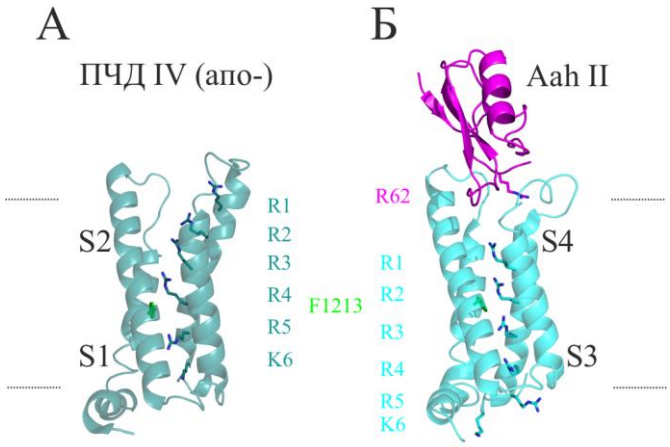
Рисунок 37. Сравнение активированного и неактивированного состояний ПЧД II Na^+ канала. (А) Ленточная модель комплекса ProTx II с ПЧД химерного канала $Na_vAb/Na_v1.7$ (пояснения см. в разделе «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков») в активированном (up) состоянии (PDB ID: 6N4Q). (Б) То же — в неактивированном (down) состоянии (6N4R) (516). Молекула ProTx II выделена малиновым. Предполагаемое положение полярных головок липидов обозначено пунктирными отрезками. Воротные заряды (остатки аргинина в S4), остаток фенилаланина в S2, формирующий центр переноса заряда, а также ключевой остаток аргинина токсина (R22) показаны линиями, их взаимное расположение схематично показано в центре.



Аналогично использование Aah II позволило «поймать» ПЧД IV в неактивированном состоянии (418). Напомним, что Aah II относится к α-NaTx, его действие на Na_v заключается в ингибировании быстрой инактивации — процесса, который контролируется активацией ПЧД IV (см. выше раздел «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы») (40, 450). На рисунке 38 показана пространственная организация ПЧД IV Na^+ канала человека $Na_v1.7$ в отсутствие («апо-» форма) и в присутствии токсина. Хорошо видно, что связывание токсина приводит к значительному смещению сегмента S4 и — как следствие — петли S3-S4, при этом другие части ПЧД IV (S1–3) остаются практически неизменными. В структуре комплекса с Aah II сегмент S4 расположен на ≈13 Å «ниже», т.е. ближе к внутриклеточной стороне мембраны. При этом происходит перемещение воротных зарядов: если в апосостоянии R1–4 расположены «выше» центра переноса заряда (здесь F1213), то при связывании Aah II R3 и R4 перемещаются «ниже» этого центра. Aah II препятствует верхнему положению S4: токсин положительно заряжен и отталкивает воротные заряды. Можно сказать, что критически важный остаток аргинина Aah II (R62) конкурирует за сайт связывания с воротными зарядами.

Из описания структуры двух комплексов (ProTx II с ПЧД II и Aah II с ПЧД IV) видно их сходство. Получается, что токсины разные, сайты связывания с каналом разные, а суть молекулярного механизма действия — одна.

Рисунок 38. Сравнение активированного и неактивированного состояний ПЧД IV Na^+ канала. (А) Ленточная модель ПЧД IV канала $Na_v1.7$ человека (в составе канала Na_vPaS, пояснения см. в разделе «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы»; PDB ID: 6NT3). (Б) То же в комплексе с Aah II (6NT4) (418); молекула Aah II выделена малиновым. Предполагаемое положение полярных головок липидов обозначено пунктирными отрезками. Воротные заряды (остатки аргинина и лизина в S4), остаток фенилаланина в S2, формирующий центр переноса заряда, а также ключевой остаток аргинина токсина (R62) показаны линиями, их взаимное расположение схематично показано в центре.



Значение полученных данных о структуре неактивированного состояния сенсоров потенциала велико. Дело в том, что теперь в деталях понятен механизм важнейшего природного процесса — электромеханического сопряжения при работе ионных каналов. Изменение электрического потенциала на мембране нервной или мышечной клетки приводит к движению заряженного сенсора потенциала каналов (сегмента S4, содержащего воротные заряды). При деполяризации положительно заряженный сенсор движется во внеклеточную сторону, увлекая за собой линкер S4-S5, связывающий ПЧД с ПД, что приводит к разведению в стороны сегментов S6, образующих ворота каналов — они начинают пропускать ток ионов. Этот процесс лежит в основе электровозбудимости нервной и мышечной ткани и обусловливает возникновение и распространение потенциалов действия.

1.18.2. Изучение K^+ каналов

Не меньшим значением для истории изучения ионных каналов обладают KTx. В частности, α-KTx были использованы как исследовательские инструменты для определения ряда важнейших структурных особенностей K^+ каналов (833). Так, олигомерная структура K^+ каналов была изучена Р. Маккинноном (тогда работал в Гарвардской медицинской школе) с применением AgTx-2 (815). Для этого он использовал мутантный ген канала дрозофилы Shaker с заменой одного а.о., которая приводит к значительному снижению аффинности токсина (в ≈250 раз). Активность AgTx-2 была измерена в отношении токов через мембрану ооцитов *X. laevis*, в которые вводилась мРНК гена *Shaker* дикого типа и мутанта в различных

соотношениях. Если в состав ионного канала входят n субъединиц, то в условиях коэкспрессии генов будут образовываться различные каналы: некоторые будут содержать n субъединиц дикого типа, другие — n мутантных субъединиц, и многие будут содержать субъединицы обоих типов. При концентрации токсина T общая доля остаточного неблокированного тока U_{mix} — это сумма остаточных токов через каналы различного типа i:

$$U_{mix} = \sum_{i=0}^{n} F_i\left(\frac{K_i}{K_i+[T]}\right) \quad (4),$$

где K_i — константа ингибирования каналов i-ого типа, а F_i — их доля во всей популяции каналов, которая, при условии одинаковой эффективности экспрессии генов и случайности образования олигомеров, определяется как:

$$F_i = \binom{n}{i} f_{mut}^{i} f_{wt}^{(n-i)} \quad (5),$$

где f_{wt} и f_{mut} — доли субъединиц дикого типа и мутантных, которые можно контролировать путем инъекции известного количества соответствующих мРНК. Оказалось, что при наличии хотя бы одной субъединицы дикого типа каналы оказываются очень чувствительны к AgTx-2 (при больших концентрациях токсина зависимость величины остаточного тока от этой концентрации совпадала с K_n, см. ниже), поэтому уравнения 4 и 5 можно объединить следующим образом:

$$U_{mix} = R + f_{mut}^{n}\left(\frac{K_n}{K_n+[T]}\right) \quad (6),$$

где R — доля остаточных токов через все каналы, содержащие хотя бы одну субъединицу дикого типа (i от 0 до $n-1$ в уравнении 4), а другой член — это доля остаточных токов через каналы, у которых все субъединицы мутантные. Константу ингибирования таких каналов K_n можно определить при экспрессии в ооцитах только мутантного гена; в этом случае доля остаточного неблокированного тока U_{mut} будет равна:

$$U_{mut} = \frac{K_n}{K_n+[T]} \quad (7).$$

Теперь подставим U_{mut} в уравнение 6, возьмем логарифм обеих частей и получим:

$$\frac{1}{\ln f_{mut}} \ln\left(\frac{U_{mix}}{U_{mut}}\right) = n - \frac{1}{\ln f_{mut}} \ln\left(1 - \frac{R}{U_{mix}}\right) \quad (8).$$

Очевидно, что при больших концентрациях токсина $R \rightarrow 0$, тогда правая часть уравнения $8 \rightarrow n$. А в левой части стоят известные или определяемые экспериментально величины. Проведя измерения остаточных токов в условиях возрастающей концентрации AgTx-2, Р. Маккиннон установил, что каналы содержат $n = 4$ субъединиц.

Этот результат хорошо согласовывался с данными альтернативного подхода, примененного П. Гессом и др. (тоже Гарвардская медицинская школа), в котором получали конкатемеры генов субъединиц $K_v1.1$ — дикого типа и мутантной с точечной заменой, приводящей к нарушению связывания ТЭА (834). Вот так с использованием селективных лигандов

различной природы удалось изучить субъединичное строение K^+ каналов, не имея данных структурной биологии о пространственной организации этих белков.

AgTx-2 был далее использован как молекулярный инструмент для изучения строения входного вестибюля K^+ канала Shaker (342, 343, 346). Дело в том, что токсин как будто оставляет «отпечаток» на поверхности канала. Поскольку взаимодействующие с высокой аффинностью белки, как правило, контактируют комплементарными поверхностями, то один из партнеров можно использовать как своеобразный слепок другого. Так, двойной мутагенез токсина и канала позволил предположить пары взаимодействующих а.о. (342, 346). Для этого были определены константы ингибирования токсином дикого типа и его производными каналов дикого типа и мутантов и вычислены коэффициенты сопряжения:

$$\Omega = \frac{K_i(wt,wt)\times K_i(mut,mut)}{K_i(wt,mut)\times K_i(mut,wt)} \qquad (9).$$

Если мутированные а.о. независимы, тогда $\Omega = 1$. Если же значение Ω отличается от единицы, это указывает на взаимодействие (пространственную сближенность) пары а.о., а энергия такого взаимодействия равна $RT\ln\Omega$. Считают, что высокой предсказательной способностью обладают значения $\ln\Omega > 1{,}5$, при этом а.о., составляющие пару, располагаются на расстоянии <4 Å. В частности, такой подход позволил показать, что ключевой остаток лизина AgTx-2 (K27) взаимодействует с тирозином селективного фильтра, определив тем самым расположение петли S5-S6 относительно центра симметрии (поры) канала (346).

Лизиновое сканирование позволило выявить три области вестибюля канала (343): (1) центральную, а.о. в которой непосредственно взаимодействуют со связавшимся токсином; (2) среднюю, где с токсином взаимодействуют а.о. только одной из четырех субъединиц канала (токсин имеет несколько вытянутую форму и сам несимметричен); (3) внешнюю, а.о. которой удалены и не образуют непосредственного контакта с токсином на расстоянии ван-дер-ваальсовых радиусов, однако могут влиять на силу связывания, например электростатически. При замене а.о. во внешней зоне аффинность токсина меняется, но не сильно. Для выявления средней зоны использовалась коэкспрессия генов каналов дикого типа и мутантных — с делецией инактивационных ворот. Такой прием позволял оценить активность токсина в отношении двух популяций каналов — с инактивацией и без. Если замену а.о. вестибюля проводить, мутируя только один из генов, возможным оказывается измерить аффинность токсина по отношению к каналам, содержащим только одну или две субъединицы с заменой.

Цистеиновое сканирование, в свою очередь, позволило выявить а.о. канала, которые оказываются «прикрыты» токсином в комплексе, и модификации тиольной группы в таком случае в присутствии токсина не происходит. Обнаруживалось две зоны: (1) полностью закрываемая токсином, (2) частично или полностью открытая. Кроме того, была проведена

оценка доступности а.о. растворителю: если данный а.о. доступен, то его замена на цистеин и последующая модификация приведет либо к потере функции канала, либо к изменению аффинности токсина.

Перечисленные данные позволили построить модель упаковки петли S5-S6 K^+ каналов: предположить погружение центральной части этой петли, содержащей селективный фильтр, вглубь мембраны, расположить ее основные элементы относительно оси симметрии и предсказать погружающуюся N-концевую α-спираль и вытянутую конформацию позади селективного фильтра. Все предсказания подтвердились затем при установлении пространственной структуры K^+ каналов (рисунок 9) (349, 835). Таким образом, использование токсина скорпиона позволило построить надежную модель входного вестибюля K^+ канала, располагая только биохимическими и электрофизиологическими данными.

Как было отмечено выше (в разделе «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов»), γ-КТх отличаются от α-КТх тем, что воздействуют на особую группу K^+ каналов, получивших название ERG (K_v11). По аминокислотной последовательности эти каналы отличаются от рассмотренных выше «обычных» K_v тем, что имеют очень протяженный S5-S6 линкер, а точнее участок S5-P: если у K_v1.2 человека (UniProt ID: P16389) он состоит из 14 а.о., то у hERG1 (K_v11.1; Q12809) — из 43 а.о. Возникает логичный вопрос: а как устроен этот линкер? Учитывая принципиальное значение каналов hERG для физиологии сердца и фармацевтики (836), их структурные особенности представляют немалый интерес. Ю.В. Королькова и др. в серии работ использовали токсин BeKm-1, селективный ингибитор каналов hERG (318), для картирования их входного вестибюля. Можно сказать, что они повторили подход, примененный американскими учеными для картирования устья K_v1, на другой паре взаимодействующих белков.

Вначале была решена пространственная структура токсина, его укладка оказалась типичной для α и γ-КТх, а также было проведено аланиновое сканирование (837). Оказалось, что в отличие от α-КТх, функционально важные а.о. сосредоточены в α-спирали и последующей петле (рисунок 8). Затем выяснилось, что BeKm-1 не свойственен такой признак типичных поровых блокаторов K^+ каналов как зависимость эффективности от концентрации солей K^+ и ионной силы (838). Цистеиновое сканирование hERG1 показало, что а.о., с которыми предположительно взаимодействует токсин, расположены как раз в участке S5-P и также в самом начале участка P-S6. Наконец, перекрестное тестирование набора производных BeKm-1 на мутированных каналах позволило вычислить коэффициенты сопряжения Ω (по формуле 8) между парами а.о. токсина и hERG1.

В результате удалось взаимно расположить элементы входного вестибюля, предсказанные на основании цистеинового сканирования и модификаций (839), исследования синте-

тического фрагмента этой области с помощью спектроскопии ЯМР, а также алгоритмов расчета вторичной структуры, а именно — две короткие спирали S5-P1 и S5-P2, которые отсутствуют у K_v1 (820). Они служат своеобразной надставкой устья канала, из-за которой BeKm-1 не может проникнуть непосредственно к селективному фильтру, и в комплексе имеет место небольшая полость. Поэтому эффективность блокирования hERG1 этим токсином не зависит от концентрации K^+. Исследователям удалось достичь очень высокой точности предсказания: если сравнить предложенную модель с недавно полученной методом крио-ЭМ структурой hERG1 (840), обнаруживается поразительное сходство в устройстве устья канала, а именно в длине и положении спирали S5-P2 (стоит оговориться, что в крио-ЭМ структуре не разрешена область предполагаемой спирали S5-P1). Таким образом, токсин скорпиона был использован в качестве молекулярного инструмента для определения тонкой структуры ионного канала сердца человека.

Отметим вместе с тем, что если вопрос о структуре участка S5-P задать программам, использующим алгоритмы построения моделей по гомологии, то они выдадут предсказание в виде длинной неупорядоченной петли. Некоторые исследователи, к сожалению, не тратят время на то, чтобы разобраться в причинах такого предсказания (в отсутствие шаблона все «избыточные» части моделируются такими алгоритмами как неупорядоченные петли, и эти программы не годятся для предсказания структуры *de novo*), и принимают его за достоверное. По сей день — несмотря на наличие структурных данных — одна группа из Китая продолжает строить модели hERG1 с неупорядоченными линкерами S5-P и развивать гипотезы на основе такого заведомо ложного моделирования (841).

В таблице 24 приведен ряд примеров использования меченых KTx. Одна из недавних работ посвящена ингибитору активации K_v из яда паука *Ch. guangxiensis*, названному GxTx-1E (см. таблицу 8). Этот токсин был модифицирован флуоресцентной меткой, подходящей для двухфотонной микроскопии. В результате удалось получить инструмент визуализации каналов K_v2, динамика изменения интенсивности флуоресценции которого коррелирует с процессом активации сенсоров потенциала этих каналов (842).

1.18.3. Изучение Ca^{2+} каналов

По-видимому, наибольшую известность среди всех токсинов паукообразных снискал ω-Aga IVA — селективный ингибитор Ca^{2+} каналов P/Q-типа ($Ca_v2.1$) (539). Сразу с момента открытия он превратился в своеобразный «золотой стандарт» селективного лиганда этих каналов, который с тех пор использовался и продолжает рутинно использоваться в качестве точного исследовательского инструмента в сотнях лабораторий по всему миру. К примеру, ω-Aga IVA был использован для демонстрации того, что активность $Ca_v2.1$ необходима для

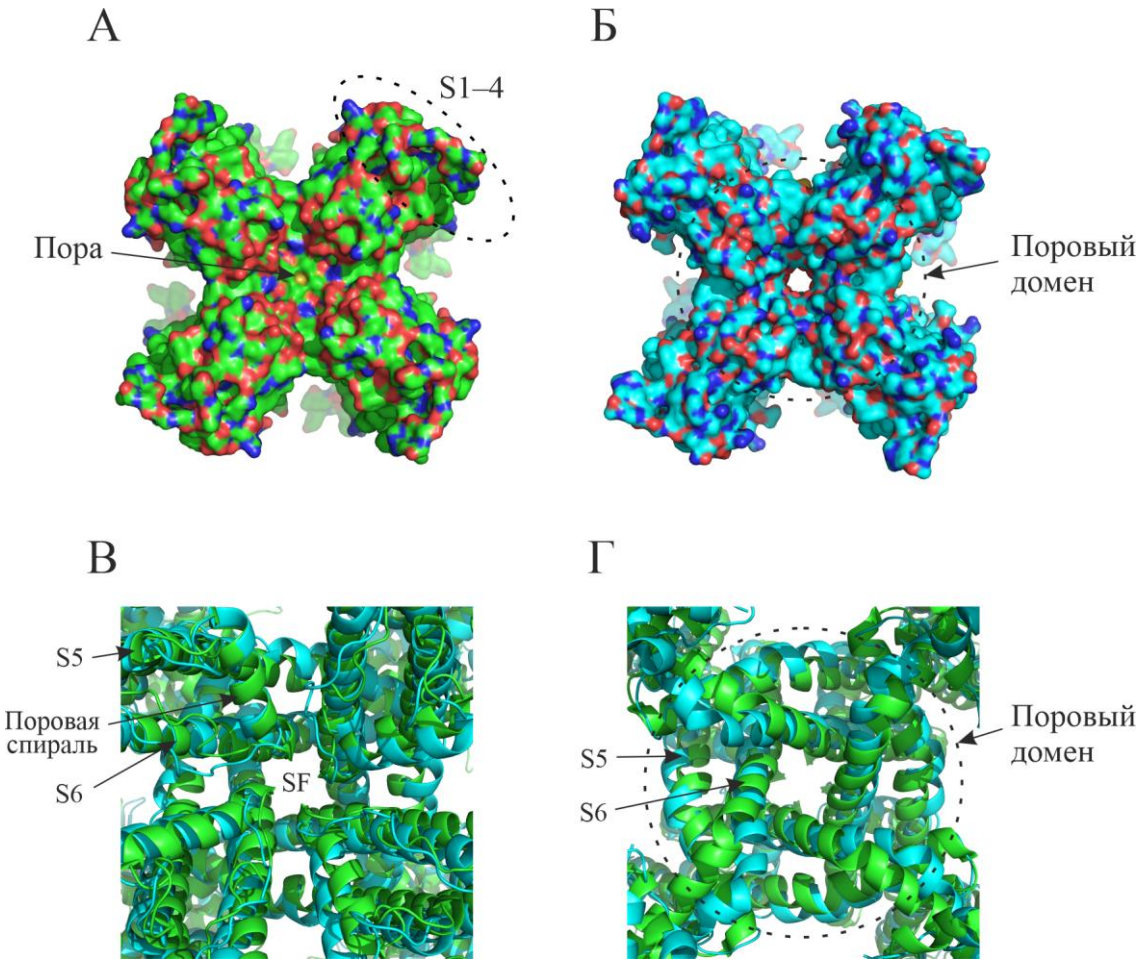
выброса нейромедиаторов в синапсах мозга млекопитающих, а его совместное использование с ω-конотоксином GVIA позволило показать участие в этом процессе комбинаций $Ca_v2.1$ (P/Q) и 2.2 (N) (811-814). Третья изоформа Ca^{2+} каналов $Ca_v2.3$, характерная для пресинаптических мембран нейронов, была идентифицирована как нечувствительная к действию указанных токсинов и потому обозначается как R-тип (от англ. resistant, т.е. устойчивый). С помощью ω-Aga IVA было установлено, что в некоторых нейронах и синапсах изоформа $Ca_v2.1$ превалирует или вообще является единственной необходимой для нейроэкзоцитоза (843-845). Дальнейшие эксперименты с использованием этого токсина позволили оценить число Ca^{2+} каналов, активации которых достаточно для стимуляции выброса (846), измерить уровень экспрессии $Ca_v2.1$ в одиночных синапсах и сопоставить его в различных условиях (828). А совместное использование ω-Aga IVA с ω-конотоксином GVIA и SNX-482 позволило оценить число Ca^{2+} каналов P/Q, N и R-типа, экспрессированных в одном синапсе (827).

1.18.4. Изучение болевых рецепторов

Активатор TRPV1 из яда юго-восточноазиатского птицееда *C. schmidti* DkTx был использован для изучения структуры канала в открытом состоянии; важно отметить однако, что для получения структуры открытого канала пришлось использовать сразу два токсина: помимо DkTx был использован RTX (670-672). При сравнении структур TRPV1 в апо- и связанном с токсинами состоянии, исследованных с помощью крио-ЭМ (рисунок 39), оказалось, что изменяется взаимное расположение S1–4 доменов и S5 с одной стороны и S6 и P-петли с другой, при этом различия внутри этих элементов между структурами минимальные. Взаимные смещения указанных частей канала приводят к расхождению S6 с внутриклеточной стороны (открытие нижних ворот; рисунок 39Г) и существенным перестройкам в области селективного фильтра (открытие верхних ворот; рисунок 39В). Эти смещения возникают из-за взаимодействия токсина с ключевыми а.о. канала, расположенными в области контакта указанных элементов — «позади» селективного фильтра, на интерфейсе S5, поровой спирали и S6 (рисунок 28). Интересно, что мутации некоторых из этих а.о. приводят к изменениям в температурной чувствительности TRPV1, но не влияют на активацию капсаицином (847, 848); возможно, здесь и расположен температурный сенсор канала.

Ингибитор кислоточувствительных каналов псалмотоксин (PcTx1) из яда *P. cambridgei* был использован в любопытном исследовании, по результатам которого кислоту («протоны») предложили включить в список нейромедиаторов (849). Конкретнее, свойство PcTx1 подавлять токи, опосредованные гомомерными ASIC 1a, но не гетеромерами с ASIC 2 было использовано, чтобы продемонстрировать ведущий вклад гетеромерных каналов в pH-зависимый постсинаптический ток.

Рисунок 39. Структура TRPV1 крысы (апоформы и в комплексе с DkTx и RTX; PDB IDs: 3J5P и 5IRX). (А–В) Вид «сверху», т.е. на плоскость мембраны со внеклеточной стороны. На панели (А) представлена апоформа, (Б) — комплекс с токсинами (токсины не показаны для простоты сравнения); молекулярная поверхность белка раскрашена в соответствии с тяжелыми атомами: азот синий, кислород красный, сера желтая, углерод зеленый на панели (А) и голубой на панели (Б). (В) Увеличенное изображение области верхних ворот, вид «сверху». Молекулы TRPV1 показаны в виде ленточной модели; апоформа окрашена зеленым, в комплексе с токсинами — голубым. Указаны спирали и область селективного фильтра (SF). (Г) Увеличенное изображение нижних ворот, вид «снизу», т.е. на плоскость мембраны с внутриклеточной стороны. Окраска как на панели (В).



Важно при этом, что токсин препятствует конформационным изменениям, необходимым ASIC 1 для перехода в инактивированное состояние (в отсутствие токсина этот сайт при понижении pH «схлопывается»), и «замораживает» канал в открытом состоянии (607). При различных pH реализуются различные варианты открытого состояния, т.е. PcTx1 выступает как чрезвычайно эффективный модулятор ASIC 1, активность которого зависит от силы активирующего стимула (pH), и позволяет обнаружить многообразие функционально открытых состояний канала — с точки зрения проводимости и селективности. Благодаря использованию PcTx1, а также MitTx (из яда змеи; упоминался выше, см. «Токсины, воздействующие на болевые рецепторы») (850), оказалось, что для каналов ASIC характерно функцио-

нальное разнообразие: у них не просто закрытое и открытое состояния, а наблюдается несколько различных открытых состояний — в зависимости от условий активации. В какой мере обнаруженные эффекты PcTx1 в отношении ASIC 1 курицы и полученные структурные данные применимы к каналам человека — предмет будущих исследований.

1.18.5. Изучение синапсов и нейроэкзоцитоза с помощью α-LTX

Пожалуй, наиболее яркий пример использования нейротоксинов паукообразных для исследования нервной системы — изучение рецепторов α-LTX. Дело в том, что интерес к молекулярному механизму действия токсина каракурта привел исследователей к открытиям, касающимся нейробиологии в широком смысле. Цитологические исследования показали, что действие нейротоксина проявляется в опустошении запаса синаптических везикул, и это наблюдение послужило важным аргументом в пользу везикулярной природы нейроэкзоцитоза (что нейромедиатор содержится в синаптических везикулах и выбрасывается в синаптическую щель за счет слияния мембраны везикулы с плазматической мембраной). Аффинная хроматография на колонках с иммобилизованным α-LTX, а затем другие методы позволили идентифицировать рецепторы токсина в нейронах (подробнее см. выше в разделе «Латротоксины»). Ими оказались мембранные белки, локализованные в синапсах: нейрексин-1α и латрофилин-1 (742, 745). Затем оказалось, что рецепторы α-LTX служат представителями крупных семейств белков с характерной синаптической локализацией.

В частности, у млекопитающих находят три гена нейрексинов, при этом каждый может транскрибироваться с двух альтернативных промоторов, в результате чего образуются длинная (α; ≈1500 а.о.) и короткая (β; ≈400 а.о.) формы; кроме того, имеются пять сайтов альтернативного сплайсинга, что приводит к широкому разнообразию этих рецепторов (851). Все нейрексины содержат протяженный N-концевой внеклеточный участок, один трансмембранный сегмент и короткий С-концевой цитоплазматический хвост. Внеклеточная часть содержит домены, характерные для молекул клеточной адгезии. Убедительно показано, что нейрексины, локализованные в пресинаптической мембране, взаимодействуют с молекулами клеточной адгезии, встроенными в постсинаптическую мембрану, например нейролигинами (852, 853). По современным представлениям такой межклеточный (транссинаптический) контакт важен для правильного функционирования, но не для первоначального формирования синапса (854). Интерес к нейрексинам не ограничивается фундаментальными аспектами: дело в том, что мутации, приводящие к их дисфункции, ассоциированы с различными заболеваниями, например шизофренией, синдромом Туретта, умственной отсталостью, эпилепсией и аутизмом. Нейрексины — наиболее исследованные синаптические молекулы клеточной адгезии, в настоящее время им отводят центральную роль в поддержании функции си-

напсов, этим белкам посвящена богатейшая научная литература (свыше 900 публикаций при поиске в PubMed по запросу "neurexin" 6 сентября 2020 г.).

У млекопитающих также находят три гена латрофилинов, у которых имеются семь сайтов альтернативного сплайсинга. Кодируемые ими белки (≈1500 а.о.) — это адгезивные GPCR, они содержат протяженный N-концевой внеклеточный участок (≈800 а.о.), семь трансмембранных сегментов и сравнительно длинный С-концевой цитоплазматический хвост (≈400 а.о.) (855). Внеклеточная часть и здесь содержит домены, характерные для молекул клеточной адгезии. Любопытно, что в ходе созревания латрофилины подвергаются протеолизу с отщеплением почти всего N-концевого участка, выступающего акцептором α-LTX (856). Этот белок однако удерживается у клеточной поверхности, вероятно, за счет гидрофобного якоря и может формировать комплекс с остальной частью латрофилина.

Поскольку латрофилин-1 был обнаружен как рецептор α-LTX, воздействующего на пресинапс, очевидной кажется нахождение этих рецепторов в пресинаптической мембране. Тем не менее, в настоящее время в литературе имеет место спор о локализации латрофилинов, поскольку были получены достаточно убедительные данные в пользу как пре-, так и постсинаптической локализации (857, 858). По-видимому, даже в случае постсинаптического расположения нет противоречия: предполагается, что латрофилины контактируют с пресинаптическими белками и вполне могут служить акцепторами α-LTX для привлечения его к пресинаптической мембране. Другое предположение состоит в том, что отщепленный N-концевой участок латрофилина, являющийся непосредственным рецептором токсина, может локализоваться вблизи пресинаптической мембраны, в то время как остальная часть белка остается заякоренной в постсинаптической мембране. В сравнении с нейрексинами латрофилины хуже изучены, однако считается, что они служат синаптическими молекулами клеточной адгезии. В частности, показано их высокоаффинное взаимодействие с нейрексинами и Lasso (для первых предполагают пре-, а для последних — постсинаптическую локализацию) (859, 860).

Исследование токсинов каракурта, изучение их механизма действия, открытие рецепторов в синапсах и дальнейшее выяснение их функции привели в конечном итоге к пониманию молекулярных основ взаимодействия нейронов в условиях сформированного синаптического контакта.

1.19. Возможности практического использования токсинов паукообразных

Выше мы привели примеры использования токсинов паукообразных в качестве мощных исследовательских инструментов. Однако сфера их применения не ограничевается фундаментальной наукой. В настоящее время особое внимание уделяется двум возможностям: (1) использованию токсинов как инсектицидов, (2) созданию на их основе лекарств.

1.19.1. Токсины паукообразных как инсектициды

Насекомые представляют главную природную мишень яда и токсинов паукообразных. Поэтому естественными кажутся попытки создания на их основе новых инсектицидных средств. Основная проблема здесь в том, что пауки и скорпионы вводят свой яд в тело жертвы посредством специального протыкающего покровы аппарата, а используемые в сельском хозяйстве инсектициды должны обладать контактной или пероральной токсичностью. Поскольку большинство изученных токсинов паукообразных имеют пептидно-белковую природу, от них сложно ожидать подобных свойств. В этой связи были предложены способы повышения их биодоступности.

В частности, в качестве белка-переносчика, обеспечивающего проникновение токсинов в гемолимфу насекомых при оральном введении, был использован манноза-селективный лектин подснежника (GNA, от лат. и англ. *Galanthus nivalis* agglutinin) (861-863). В этом случае повышенной биодоступностью обладали химерные белки токсинов и лектина, причем как сами по себе, так и в условиях экспрессии их генов в растениях. Другой подход заключается в применении бакуловирусов — вирусов насекомых с высокой видовой специфичностью к хозяевам (864, 865). В этом случае ген токсина внедряют в вирусный геном, и в результате время жизни пораженного насекомого существенно уменьшается.

В 2018 г. случился важный для всей области прогресс: Агентство по охране окружающей среды США одобрило к применению новый биоинсектицид Spear-T (производство компании Vestaron, США), содержащий в качестве активного ингредиента токсин паука. Изучение патентной литературы и консультации с научным разработчиком (основателем компании Г. Кингом) показали, что активный ингредиент инсектицида, обозначаемый в различных материалах чаще всего GS-ω/κ-HXTX-Hv1a, но также “Versitude peptide”, GS-U-ACTX-Hv1a-SEQ2, M-ACTX-HV1a+2 и торговыми названиями Spear, Spear T, VST-006325 TGAI, VST-006330 EP, не имеет отношения к ω-ACTX Hv1a (см. подробнее в разделе «Инсектотоксины из яда австралийских воронковых пауков, воздействующие на Ca_V»), вопреки распространенному заблуждению, что связано с попытками компании скрыть истинную структуру токсина (после наших обращений первое название пептида появилось и на официальном сайте компании). Это заблуждение, к сожалению, распространилось сверх меры: в

базе данных UniProt ссылка на Spear-T содержится в записи именно ω-ACTX Hv1a. Сопоставление опубликованных материалов Агентства по охране окружающей среды США, в которых приводятся Мм токсина и число а.о., с материалами Комитета по действиям в отношении устойчивости к инсектицидам (Insecticide Resistance Action Committee, IRAC) (866), в которых говорится о мишени действия GS-ω/κ-HXTX-Hv1a — nAChR насекомых — и приводится ссылка на исследование активности на этой мишени ряда токсинов (567), а также с патентами, обладателем которых являяется Vestaron (например, US 7,880,060 и 9,567,381), показывает, что искомый токсин — это ω/κ-HXTX-Hv1h (UniProt ID: S0F209) с двумя дополнительными N-концевыми а.о. (GS), которые были добавлены в начале исследования этих пептидов для получения рекомбинантных аналогов и расщепления гибридных белков с помощью тромбина.

Ген этого же токсина был использован для получения трансгенного штамма энтомопатогенного гриба *Metarhizium pingshaense* (867), который оказался более эффективным против комаров *Anopheles coluzzii* и *Anopheles gambiae* в сравнении с нетрансформированными грибами, в том числе в полуполевых испытаниях, проведенных в Буркина-Фасо (868). Предполагается, что такой подход можно применить для контроля над распространением малярии. Другим токсином, использованным для этой же цели, стал скорпин: экспрессия его гена в *Metarhizium anisopliae* (syn. *robertsii*) эффективно подавляла развитие спорозоитов *P. falciparum* в комарах *A. gambiae* (869). Особенно эффективна была одновременная экспрессия двух трансгенов: помимо скорпина использовали его гибрид с повторами пептида SM1, связывающегося со слюнными железами комаров, или одноцепочечное антитело, агглютинирующее спорозоиты. Отметим различия в механизме действия двух токсинов паукообразных, предложенных к использованию против малярии: то время как ω/κ-HXTX-Hv1h является инсектотоксином и убивает переносчика, мишенью скорпина служит сам малярийный плазмодий.

1.19.2. Потенциал компонентов яда паукообразных для разработки лекарств

В специальной литературе общим местом является утверждение, что яд паукообразных представляет богатейший источник фармакологически активных веществ, которые могут найти применение в области разработки лекарств. При этом, однако, в настоящее время подобных лекарств на рынке не представлено, несмотря на многолетние усилия многих международных исследовательских коллективов. Остановимся на некоторых наиболее ярких примерах разработок.

1.19.2.1. Болевые синдромы и анальгетики

Вслед за успехом команды Дж. Мильянича (Elan Corporation, Ирландия) в разработке обезболивающего средства на основе ω-конотоксина MVIIA, блокирующего Ca^{2+} каналы N-типа (международное непатентованное наименование ziconotide, торговое название Prialt) (870), исследователи других токсинов, воздействующих на Ca^{2+} каналы, приложили немало усилий, чтобы повторить это достижение. В частности, бразильские ученые показали антиноцицептивную активность нескольких токсинов из яда паука *Ph. nigriventer* в целом ряде моделей; наибольшее внимание уделялось PnTx3-6 (871). Дальше доклинических исследований этого пептида дело не пошло: всё-таки в дозах, превосходящих терапевтические менее, чем на порядок, проявляется токсичность (872).

В 2005 г. было показано, что мутация гена $Na_v1.7$, с приобретением функции (происходит сдвиг зависимости активации от потенциала в сторону гиперполяризации и сдвиг зависимости стационарной инактивации — в сторону деполяризации), вызывает эритромелалгию — вследствие повышенной возбудимости чувствительных нейронов (873). А в следующем году были опубликованы данные о врожденной нечувствительности к боли в трех семьях из Северного Пакистана; поводом к исследованию стал печальный анекдотический случай: народная молва приписывала удивительные способности мальчику, показывавшему уличные фокусы (прокалывание рук ножами, хождение по раскаленным углям) и скончавшемуся в 14 лет после прыжка с крыши до обследования (590). У членов этих семей диагностировалась полная нечувствительность к боли — ни в какое время, ни в какой части тела, при этом в норме были реакции на прикосновение, высокую и низкую температуру, щекотание, давление, а также проприоцепция и умственное развитие. Для картирования мутантных генов была применена стратегия позиционного клонирования. Оказалось, что во всех случаях имеет место нонсенс мутация гена $Na_v1.7$, приводящая к потере функции.

После этих публикаций подавление активности $Na_v1.7$ для обезболивания стало одним из наиболее тщательно исследуемых подходов, а токсинологи потратили немало усилий для поиска селективных ингибиторов этого канала. Наиболее исследованными в этом отношении стали подробно обсуждавшиеся выше паучие токсины ProTx II и HWTX-IV (см. раздел «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков») (874-876). При моделировании ожоговых ранений у грызунов повышается уровень экспрессии $Na_v1.7$ в сенсорных нейронах и маркеров активации нейронов в дорзальных рогах спинного мозга в ответ на болевые сигналы, а токсин ProTx II снижает уровень экспрессии этих маркеров и частоту активации нейронов поверхностного слоя дорзальных рогов (877). Противоречивы данные о способности ProTx II проникать к мишени: некоторые авторы утверждают, что он не проникает к $Na_v1.7$ в нормальных миелинизированных нейронах и не преодолевает гематоэнцефалический барьер

(510). Другие исследования свидетельствуют в пользу такой способности при внутрибрюшинном (для периферических нейронов) (877) или интратекальном введении (для спинного мозга) (878). Так или иначе утверждается, что ProTx II приобретает такую способность в патологических состояниях.

Важное замечание: несмотря на первоначальный оптимизм и задор, а также многочисленные попытки как научных групп, так и исследовательских отделов крупных фармацевтических компаний, в настоящее время ни один селективный лиганд $Na_v1.7$ не нашел применения в клинике, и настроения сменились на близкие к унынию (879). Причина отсутствия успеха стандартная для фармы: низкая эффективность в фазе 2 клинических исследований. Что касается объяснений различий в экспериментах *in vitro* (высокая аффинность и селективность лигандов к $Na_v1.7$) с клиническими данными (нет эффективного обезболивания), то высказываются различные предположения. Одним из наиболее исследуемых служит обнаружение взаимосвязи между экспрессией $Na_v1.7$ и эффективностью внутриклеточных сигналов, инициируемых опиоидными рецепторами, в чувствительных нейронах (880). Как следствие предполагается, что комбинированная терапия опиоидами и ингибиторами $Na_v1.7$ будет значительно более эффективна (881). Необходимо отметить и обоснованную критику «опиоидной гипотезы»: у пациентов с потерей функции $Na_v1.7$ не воспроизводились ее ключевые необходимые элементы — не повышалась экспрессия гена проэнкефалина и не действовал антагонист опиоидных рецепторов налоксон (882). Другое предположительное объяснение касается непосредственной роли и конкретного места экспрессии $Na_v1.7$ в чувствительных нейронах: последнее время накапливаются данные, что функция этой изоформы может быть компенсирована другими (в основном, $Na_v1.8$) на стадиях инициации сигнала и проведения потенциала действия, однако она абсолютно необходима для выброса нейромедиатора в спинном мозге (883). Таким образом, клиническая эффективность препаратов ингибиторов $Na_v1.7$, по-видимому, зависит от их способности преодолевать гематоэнцефалический барьер.

При этом нельзя сказать, что усилия разработчиков были потрачены зря, ведь по ходу дела были получены важнейшие данные о механизме действия лигандов Na_v. К примеру, первые структуры комплексов Na_v с токсинами паука и скорпиона (подробно обсуждалась выше в разделах «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков», «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы» и «Токсины паукообразных как молекулярные инструменты исследования нервной системы») были изучены в компании Genentech в рамках проводившихся разработок ингибитора $Na_v1.7$ (418, 516).

1.19.2.2. Ишемия и кардиопротекторы

Ингибиторы ASIC, помимо разработки новых анальгетиков, по-видимому, могут быть использованы для терапии инсультов и реперфузионного синдрома. На мышиных моделях показано участие ASIC 1a в патогенезе инсульта: нокаут гена этого канала приводил к сокращению зоны инфаркта на 60% при окклюзии центральной церебральной артерии (884). Предполагается, что развивающаяся при инсульте ишемия затрагивает не только «коровую» часть, в которой происходит необратимый некроз ткани, но и периинфарктную зону, где смерть клеток происходит по апоптотическому пути в течение часов и даже дней (885). Из-за прекращения нормального снабжения кислородом при ишемии клетки мозга вынуждены использовать преимущественно гликолитический путь синтеза АТФ, и внеклеточный pH может снижаться до 6,0 и даже меньше. pH_{50} для ASIC 1a составляет 6,6, считается, что это главный мозговой сенсор pH и ключевой посредник между ишемией и отмиранием нейронов (886). Введение крысам PcTx1 в малых дозах (1 нг/кг, i.c.v.) спустя 2 ч после окклюзии центральной церебральной артерии сокращало зону инфаркта на 70% (887). А двудоменный токсин Hi1a был еще более эффективен: зона инфаркта сокращалась даже при введении его в дозе 2 нг/кг (i.c.v.) спустя 8 ч после инсульта; наблюдались увеличение выживаемости нейронов и восстановление нормальных поведенческих реакций (604). Кроме того, оба токсина были эффективны *in vitro* при окислительном стрессе и значительно увеличивали выживаемость клеток в первичной культуре нейронов и астроцитов при обработке перекисью водорода.

Эти же токсины были использованы в качестве инструментов для демонстрации важной роли ASIC 1a в патогенезе реперфузионного синдрома миокарда (888). Они показывали кардиопротекторный эффект в модели острой ишемии сердца *ex vivo*. Hi1a был эффективен в мышиной модели реперфузионного синдрома миокарда *in vivo* и оказывал кардиопротекторный эффект при пересадке сердца у крыс. В настоящее время компанией Infensa Bioscience (Австралия) начаты клинические испытания короткого пептида IB409; публично заявляется, что он создан на основе данных о Hi1a. Однако по аминокислотной последовательности (отыскивается в международной заявке WO2026080980) сходство практически отсутствует.

1.19.2.3. Эпилепсия и противосудорожные

Мутации гена $Na_v1.1$ с потерей функции выступают причиной большинства случаев синдрома Драве (тяжелой миоклонической эпилепсии раннего детского возраста), при этом, как правило, затронутым оказывается один аллель (889). Механизм патогенеза связан со снижением уровня экспрессии этого канала в ГАМКергических интернейронах и, как следствие, их пониженной возбудимостью (890); в коре это объясняет эпилепсию, в мозжечке — атаксию, в случае базальных ганглиев и мотонейронов — характерную походку, в гипотала-

мусе — нарушения терморегуляции и сна, а дисфункция всех этих структур способствует задержке психомоторного развития. Токсин HmTx1 из яда птицееда *H. maculata*, селективный модулятор $Na_v1.1$ (см. раздел «Ингибиторы инактивации Na_v из яда пауков»), показал высокую эффективность в модели синдрома Драве — мышах с нокином мутантного гена человека (891). Во-первых, токсин в концентрации 10 нМ восстанавливал способность интернейронов гиппокампа генерировать потенциалы действия как у мышей дикого типа, при этом не влияя на функцию интернейронов у нормальных мышей или пирамидных нейронов у мутантных животных. Во-вторых, внутримозговое введение HmTx1 мутантным мышам снижало их гипервозбудимость, частоту припадков и смертность.

1.19.2.4. Эректильная дисфункция

В разделе «Ингибиторы инактивации Na_v из яда пауков» упоминалось, что токсины PnTx2-5 и 6 обусловливают характерный для отравления ядом паука *Ph. nigriventer* симптом у мужчин — приапизм (495, 496). В обоих случая показана центральная роль активации нейрональной синтазы оксида азота (nNOS), при этом эффект не зависит от ингибирования фосфодиэстеразы-5 (PDE5) (495, 892). На основе структуры PnTx2-6 был предложен линейный (без дисульфидов) пептид PnPP-19 (от англ. *Phoneutria nigriventer* Potentiating Peptide, содержащий 19 а.о.; см. таблицу 13), который сохранил активность в отношении эрекции. Так, введение пептида крысам в дозе 12 мкг/кг (s.c.) приводило к возрастанию отношения внутрикавернозного давления к среднему артериальному при стимуляции тазового ганглия. А приложение раствора PnPP-19 с концентрацией 10 нМ к препаратам пещеристых тел *ex vivo* приводило к усилению расслабления гладкой мускулатуры при электростимуляции. При этом пептид утратил активность полноразмерного токсина в отношении Na_v: для PnPP-19 не отмечено активности в концентрации 3 мкМ на панели изоформ каналов млекопитающих, в то время как PnTx2-6 в такой концентрации проявлял выраженный эффект ингибирования инактивации. Кроме того, введение гораздо большей дозы пептида (5 мг/кг, i.p.) мышам не приводило к токсичности (494). PnPP-19 представляется интересной разработкой в области эректильной дисфункции.

1.19.2.5. Глиомы и противоопухолевые препараты

Основным методом лечения глиом в настоящее время является удаление опухоли хирургическим путем. При этом принципиально необходимо: (а) удалить как можно больший массив опухолевых клеток и (б) затронуть как можно меньше здоровых клеток. После обнаружения специфического связывания ClTx с клетками глиом (623) было выполнено множество работ, посвященных возможностям разработки на основе этого токсина средств диагно-

сти или лечения опухолей. В частности, было показано, что ClTx и другие короткие инсектотоксины из яда скорпионов обладают способностью снижать подвижность клеток глиом разных линий, и при этом они не проявляют цитотоксичности (624-627). Удивительно, но ClTx распознает больше опухолевых клеток, чем антитела, специфичные к антигенам, которые рассматриваются в качестве мишеней для терапии глиом (893). Принципиально важно, что конъюгаты ClTx преодолевают гематоэнцефалический барьер (621, 894). Было предложено широкое разнообразие модификаций ClTx (ниже рассмотрим некоторые): (а) меток с целью диагностики и визуализации глиом, (б) цитотоксических агентов для их селективной доставки к клеткам глиом, (в) часть модификаций позволяла достигать обеих целей и потому служит примером тераностики (895).

Первым типом используемых меток были радиоактивные изотопы йода: ^{125}I и ^{131}I (623). Предполагалось, что в этом случае конъюгат ClTx может использоваться как для диагностики и визуализации опухоли — с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) — так и для радиотерапии. Очевидный минус данного подхода — вред ионизирующего излучения здоровым клеткам. Меченный йодом-131 ClTx (^{131}I-TM-601), разработанный компанией TransMolecular (США), прошел 1 фазу клинических испытаний (624). В качестве цитотоксических агентов, конъюгированных с ClTx, — для доставки к опухолевым клеткам — использовались, к примеру, цисплатин (896), криптофицин (631) и гелонин (897). Другой тип меток — т.н. «суперпарамагнитные» наночастицы, применяемые в методе магнитно-резонансной томографии (МРТ). Так, были получены наночастицы с ClTx на основе оксида железа (898, 899). К наночастице может быть присоединен цитотоксический агент, например малая интерферирующая РНК (900). Возможен подход с использованием липосом, которые содержат малую интерферирующую РНК, а поверхность которых модифицирована ClTx (901).

Особенно популярны для оптического картирования флуоресцентные метки, излучающие в области красного и ближнего инфракрасного света (≈600–900 нм). В частности, получены конъюгаты ClTx с цианиновой меткой Cy5.5 (“Tumor Paint”) (621) и индоцианиновым зеленым (BLZ-100 или “tozuleristide”; разрабатывается компанией Blaze Bioscience, США) (894). Tumor Paint селективно окрашивает клетки не только глиом, но и саркомы, рака простаты и толстого кишечника (621). В настоящее время завершены клинические испытания 1 фазы (902) и 2/3 фазы BLZ-100 со статусом “Fast track”, присвоенным FDA: меченый токсин применяли для селективной окраски опухолей клеток в нейрохирургии.

И наконец, ClTx был использован для получения Т-клеток с химерными рецепторами антигена (англ. chimeric antigen receptor, CAR): он выступал в качестве антиген-распознающего домена. Такие CAR Т-клетки проявляли высокую цитотоксичность и специ-

фичность в отношении клеток глиом и были эффективны в мышиной ортотопической модели ксенотрансплантата глиомы человека (893).

1.19.2.6. Аутоиммунные заболевания и иммуносупрессоры

Среди K^+ каналов, помимо hERG1 ($K_v11.1$), наибольшее внимание токсинологов было уделено изоформе $K_v1.3$. Дело в том, что высокая экспрессия этого канала характерна для определенной популяции Т-лимфоцитов [$CD45RA^-$ $CCR7^-$, эффекторные Т-клетки памяти (T_{EM})], и существует богатая литература, показывающая его роль в аутоиммунных заболеваниях; для терапевтического эффекта требуется ингибирование $K_v1.3$ (359, 903, 904).

В яде скорпионов находят токсины, проявляющие достаточно высокую специфичность в отношении $K_v1.3$ (356, 905). Кроме того, получены более специфичные искусственные производные. В частности, для этого была использована технология фагового дисплея (355), а совместная работа коллективов Л. Поссани (Национальный автономный университет Мексики) и Р. Лернера (Исследовательский институт Скриппс, США) показала возможность использования лентивирусных библиотек (906). Наиболее исследован пептид HsTX1[R14A], представляющий собой природный токсин HsTX1 (P59867; α-KTx 6.3) из яда скорпиона *H. spinifer* с одиночной заменой (361). К примеру, он снижал воспаление в модели гиперчувствительности замедленного типа и в модели ревматоидного артрита (907). Обнаружилось также, что HsTX1[R14A] способен преодолевать гематоэнцефалический барьер и, по-видимому, ингибировать $K_v1.3$ в клетках микроглии при нейровоспалении (908-910).

Наконец, последовательность $K_v1.3$-селективных блокаторов была привнесена в петли вариабельных доменов антител. Полученные рекомбинантные химеры обладали активностью в отношении $K_v1.3$ и подавляли активацию лимфоцитов (911).

1.20. Заключительные комментарии

В представленном обзоре мы постарались обобщить известные сведения, касающиеся различных аспектов токсинов паукообразных. В некоторых случаях автор не мог обойтись без упоминания собственных работ, вошедших в экспериментальную часть диссертации, тогда делались необходимые ссылки. Частично результат анализа специальной литературы, представленного здесь, был опубликован в обзорных статьях, посвященных:

1) составу яда пауков (793, 912);
2) лигандам K^+ каналов (913);
3) лигандам болевых рецепторов (914);
4) разнообразию строения белков-предшественников АМП (915);
5) меченым токсинам как молекулярным исследовательским инструментам (804).

2. Материалы и методы

2.1. Программное обеспечение

Анализ белковых последовательностей, расчет состава, Мм с учетом модификаций, поиск фрагментов проводили в программе GPMAW разных версий (Lighthouse data, Дания).

Построение и аннотацию карт плазмид осуществляли в программе SnapGene версии 6.0.2 (GSL Biotech, США).

Расчет температуры отжига олигонуклеотидных затравок выполняли с помощью программ New England Biolabs (США; https://tmcalculator.neb.com/#!/main) и Thermo Fisher Scientific (США; https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html).

Преобразование белковых и нуклеотидных последовательностей проводили на сервере The Sequence Manipulation Suite (https://www.bioinformatics.org/sms2/).

Для поиска по регулярным выражениям использовали программу Notepad++ (версия 5.9, разработчик Don Ho; Стандартная общественная лицензия GNU).

Сравнение и выравнивание белковых последовательностей осуществляли с помощью программ ClustalW2 (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) или Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/).

Для поиска и сравнения с известными аминокислотными последовательностями использовали алгоритм BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).

Поиск возможных сайтов сплайсинга проводили с помощью сервиса Fruitfly Splice Predictor (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) (916).

Для идентификации предполагаемых N-концевых сигнальных пептидов применялась программа SignalP (различных версий; http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) (757, 917).

Филогенетические деревья были построены в программе MEGA6 (918).

Поиск сближенных а.о. в комплексах белков осуществляли на сервере ContPro (http://procarb.org/contpro/) (919).

Анализ масс-спектров проводили в программах MassLynx (Micromass, Великобритания), Data Analysis, Data Analysis Viewer (Bruker, США), flexAnalysis (Bruker Daltonik, Германия), Mascot (Matrix Science, Великобритания) и PEAKS Studio (Bioinformatics Solutions, Канада) разных версий.

Анализ спектров КД проводили на сервере DichroWeb (http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml) (920).

ЯМР-спектры обрабатывали с помощью программного обеспечения TopSpin (Bruker) и анализировали с помощью программы CARA (921). Расчет пространственной структуры проводили в программе CYANA (922).

Для сбора и анализа данных крио-ЭМ использовали программы Leginon (923), MotionCor2 (924), gCTF (925), RELION-2 (926), blocres (927), Coot (928), PHENIX (929).

Данные электрофизиологии анализировали с помощью программ Clampfit, pClamp (Axon Instruments, Molecular Devices, США) и Origin (OriginLab, США) разных версий.

Для работы с флуоресцентными изображениями использовали программное обеспечение CellA Imaging (Olympus, Япония), Cellomics HCS Studio (Thermo Fisher Scientific) и ImageJ (Национальные институты здравоохранения, США).

Структурные формулы химических соединений нарисованы в программе ChemDoodle (версия 10.2.0; iChemLabs, США).

Аннотацию элементов вторичной структуры и распространенных белковых мотивов проводили с помощью базы данных PDBsum (https://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/pdbsum/) (930).

Модели пространственной структуры белков и их комплексов получали с использованием AlphaFold Server (https://alphafoldserver.com/) (931).

Иллюстрации с моделями пространственной структуры белков и пептидов подготовлены с помощью программы PyMOL (версия 1.8.6.2 для Mac; Schrodinger, США).

2.2. Приборы общего назначения

Для очистки воды / получения льда / дегазации растворов:

- Milli-Q (Millipore, США);
- Simplicity (Merck Millipore / MilliporeSigma, США);
- льдогенератор Bar Line BF 80 AS (Scotsman Ice, Италия);
- ультразвуковая баня 8892 (Cole-Parmer Instrument Company, США).

Для концентрирования и высушивания образцов:

- вакуумный испаритель Savant SpeedVac SVC 100, снабженный конденсационной ловушкой Refrigerated Condensation Trap RT100 (Thermo Fisher Scientific) и мембранным насосом MD 4C NT (Vacuubrand, Германия);
- вакуумный испаритель Acid-Resistant CentriVap Vacuum Concentrator (#7810033), снабженный ловушкой CentriVap −84° C Cold Trap (#7460030) и насосом Rotary Vane Vacuum Pump (модель 117, Labconco, США);
- лиофильная сушка FreeZone 2.5 Liter Benchtop Freeze Dry System (#7670530, Labconco), подключенная к насосу Welch W Series 5 Vacuum Pump (модель 8912Z-02, Gardner Denver, США).

Для центрифугирования:

- микроцентрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия);
- центрифуга 5804 R (Eppendorf).

Для работы с бактериями:

- автоматический паровой стерилизатор (автоклав) ВКа-75-ПЗ (Касимовский приборный завод, Россия);
- ламинарный шкаф BSB4A (Gelaire, Австралия);
- орбитальный шейкер-инкубатор ES-20/60 (Biosan, Латвия);
- орбитальный шейкер с открытой платформой Innova 2000 (New Brunswick Scientific, США);
- ультразвуковой дезинтегратор 750-Watt Ultrasonic Homogenizer with Temp Controller (#EW-04711-45, Cole-Parmer Instrument Company);
- пресс Френча EmulsiFlex-B15 High Pressure Homogenizer (AVESTIN, Канада);
- электропоратор Celljet (Eurogentec, Бельгия).

2.3. Материалы

2.3.1. Коллекция ядов

В нашем распоряжении имеется богатая коллекция ядов разнообразных видов животных, собранная главным образом под руководством Е.В. Гришина. Яды скорпионов *M. eupeus* и *O. scrobiculosus* были получены в 1980–84 гг. из Среднеазиатского зоокомбината, *L. quinquestriatus* — приобретен у Sigma-Aldrich (V-5251; США). Большинство ядов пауков были приобретены в компании Fauna Laboratories (Алматы, Казахстан). Все яды хранятся в лиофилизованном виде при −80 °C.

2.3.2. Бактериальные штаммы

Штаммы *E. coli* XL1-Blue (Евроген, Россия), BL21(DE3), Origami B(DE3) (Novagen, США) и SHuffle T7 Express (New England Biolabs).

Штаммы, полученные из Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ; Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрябина РАН, Пущино) и Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection, ATCC; Манассас, США): *Arthrobacter globiformis* (Conn) Conn and Dimmick (ВКМ Ac-1112), *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn (ВКМ B-501), *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder) Schleifer and Kilpper-Balz (ATCC 29212), *Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chalmers (ATCC 25922), DH5α, *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter) Migula (ATCC 27853), *Pseudomonas fluorescens* Migula (ВКМ B-894), *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Rosenbach (ATCC 29213), 209-P.

Штамм *Chlamydia trachomatis* D/UW-3/Cx (ATCC VR-885) был предоставлен Е. Хельм (Уппсальский университет, Швеция).

2.3.3. Клеточные линии

Клетки нейробластомы мыши Neuro-2a (ATCC CCL-131) приобретены в Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

Клетки GH_4C_1, экспрессирующие α7 nAChR человека, предоставлены компанией Eli Lilly (Великобритания).

Другие линии имелись в наличии в лабораториях и использовались по назначению долгое время, подробности могут быть найдены в публикациях.

2.3.4. Животные

2.3.4.1. Метод двухэлектродной фиксации потенциала

Электрофизиологические эксперименты проводили на ооцитах лягушки *X. laevis*. Сами животные в экспериментах не участвовали. Ооциты отбирали путем извлечения части

яичника. Все операции проводились специально обученным персоналом при полной анестезии животных с использованием MS222 на ледяной бане. Величину надреза минимизировали, его зашивали биосовместимой рассасывающейся нитью. Прооперированные животные проходили период восстановления (4–5 ч) в отдельных камерах. Все операции регистрировали в журнале.

2.3.4.2. Токсичность, тест отдергивания хвоста

Использовали инбредных мышей линии BALB/c (самцы) возрастом 8–12 недель, полученных из филиала «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» России (Чехов). Животных содержали группами по 5–6 особей при 12-часовом световом цикле и с неограниченным доступом к стандартному корму и воде.

2.3.4.3. Болевые тесты

Животные, свободные от специфических патогенов (SPF, от англ. specific-pathogen-free), были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала ИБХ РАН (Пущино). В работе использовали аутбредных мышей линии ICR (самцы) и аутбредных крыс линии Wistar (самцы и самки) возрастом 6 недель.

Животные акклиматизировались в течение 2 недель до экспериментальных процедур, их содержали в двухкоридорных барьерных комнатах в контролируемой среде: температура 20–24 °C, относительная влажность 30–60% и 12-часовой световой цикл. Животных размещали в стандартных поликарбонатных клетках типа 3 (820 $см^2$, мыши) или типа 4 (1450 $см^2$, крысы) на подстилке (LIGNOCEL BK 8-15; JRS, Германия), с неограниченным доступом к корму (V1534-300, ssniff Spezialdiäten, Германия) и фильтрованной водопроводной воде. Клетки для крыс были снабжены древесными волокнами (LIGNOCEL nesting, JRS), а в клетки для мышей помещали прозрачные пластиковые укрытия (Mouse House; TECNIPLAST, Италия).

Животных объединяли в группы случайным образом. Каждая группа, включая отрицательный контроль (носитель, физиологический раствор) и положительный контроль, состояла из 6–8 животных. Контрольные группы тестировали в каждый экспериментальный день вместе с группами животных, которым вводили препараты. В конце экспериментов животных усыпляли в CO_2-камере.

2.3.4.4. Невралгия тройничного нерва

Использовали крыс линии Wistar (самцы) возрастом 8–10 недель, полученных из Charles River Laboratories (Зульцфельд, Германия). Крыс содержали в блоке передержки животных виварно-экспериментального комплекса ООО «НИИ Митоинженерии МГУ» при температуре 20–24 °C, относительной влажности 30–70% и 12-часовом световом цикле с неограниченным доступом к стандартному комбикорму (Тосненский комбикормовой завод, Россия) и стерильной очищенной обратным осмосом воде.

2.3.4.5. Срезы мозга и спинальные ганглии

Для изучения Ca^{2+} каналов и P2X3 рецепторов использовали крыс линии Wistar (WAG/GSto; обоих полов) возрастом 9–15 дней, полученных из вивария Института физиологии имени А.А. Богомольца Национальной академии наук Украины. В случае GluR использовали крыс линии Wistar (обоих полов) возрастом 18–21 день, полученных из вивария ИЭФБ РАН. Животных содержали в вентилируемых пластиковых клетках при температуре 22–24 °C, влажности 65–75% и 12-часовом световом цикле с неограниченным доступом к пище и воде.

2.3.4.6. Спинальные ганглии для микроскопии

Использовали крыс линии Sprague Dawley (самцы) возрастом 8–16 недель, полученных от компании Envigo (США). Животных содержали при 12-часовом световом цикле с неограниченным доступом к пище и воде.

2.3.4.7. Срезы языка

Использовали крыс линии Wistar (обоих полов) возрастом 8–10 недель, полученных из вивария ИБХ РАН.

2.3.5. Химические соединения, растворители

Растворы готовили, как правило, с использованием деионизованной воды («типа 1») с удельным сопротивлением 18,2 МОм×см, полученной на установке Milli-Q или Simplicity.

Ацетонитрил для хроматографии приобретали у Panreac Química (Испания), трифторуксусную кислоту (ТФУ) — у Sigma-Aldrich (оба соответствующей чистоты, “HPLC grade”).

Реактивы и растворы особой чистоты для секвенирования по Эдману, а также наборы фенилтиогидантоинов аминокислот приобретали у компаний: Applied Biosystems (США), Shimadzu (Япония) или FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation (Япония).

Реактивы и растворы особой чистоты для МС (“MS grade”, “LiChrosolv LC-MS grade”) приобретали у Sigma-Aldrich.

Все липиды приобретали у компании Avanti Polar Lipids (США).

$^{2}H_2O$ и дейтерированный додецилфосфохолин (ДФХ; d_{38}) приобретали у компании Cambridge Isotope Laboratories (США).

2.3.6. Ферменты

Все препараты ферментов для селективного гидролиза полипептидов при установлении аминокислотной последовательности были особой чистоты (“sequencing grade”), их приобретали в компаниях F. Hoffmann-La Roche (Швейцария) и Sigma-Aldrich.

Ферменты для практической молекулярной биологии и соответствующие буферные растворы приобретали у компаний «Евроген», «СибЭнзайм» (Россия), Fermentas (США), New England Biolabs, Promega (США).

2.3.7. Антитела

Куриные поликлональные против убиквитин-С-концевой гидролазы L1 (UCHL1; 1 : 2000; #NB110-58872, Novus Biologicals, США), кроличьи моноклональные против фосфорилированной регуляторной субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы (PKA) типа II-α (pRII, S96; 1 : 1000; #ab32390, клон 151, Abcam, Великобритания), мышиные моноклональные против фосфорилированных митоген-активируемых протеинкиназ (MAP-киназ, MAPK) анти-фосфо-p44/42, т.е. против фосфорилированных классических MAP-киназ (киназ, регулируемых внеклеточными сигналами ERK1/2; pERK1/2; T202/Y204; 1 : 250; #9106, клон E10, Cell Signaling Technology, США). Вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor 647, 555 и 488 (Thermo Fisher Scientific). Мышиные моноклональные антитела к белковому антигену хламидий, конъюгированные с флуоресцеином (набор ХлаМоноСкрин-2; НИАРМЕДИК ПЛЮС, Россия).

2.4. Методы

В этом разделе описаны типичные методики, использованные в работе. В некоторых случаях допускались модификации приводимых здесь протоколов, например, времени или температуры инкубации, концентрации компонентов смесей. Эти вариации не указываются, если они не имели принципиального значения. Автор мог упустить какие-то детали, они приводятся в публикациях по результатам работы.

2.4.1. Спектрофотометрия

2.4.1.1. Измерение концентрации полипептидов

Концентрацию полипептидов определяли УФ-спектрофотометрически. В работе использовали спектрофотометры U-3210 (Hitachi, Япония) и UV-1800 (Shimadzu); длина оптического пути (толщина кюветы) составляла 1 см, раствором сравнения служила чистая вода или чистый раствор, использованный для получения образца. Поглощение измеряли при 280, 274,5 и 205 нм для полипептидов, которые содержат триптофан, или тирозин, но не триптофан, или не содержат ни того, ни другого, соответственно. Для полипептидов, содержащих триптофан, молярные коэффициенты поглощения при 280 нм рассчитывали с использованием программного обеспечения GPMAW. Для полипептидов, содержащих тирозин, но не триптофан, рассчитывали молярные коэффициенты поглощения при 274,5 нм, принимая значение $\varepsilon_{274,5}$ = 1340 $М^{-1}см^{-1}$ для каждого остатка тирозина (932). Наконец, для полипептидов, не содержащих ни тирозина, ни триптофана, молярные коэффициенты поглощения при 205 нм рассчитывали, как описано в (933). Концентрацию определяли, используя формулы:

$$C = \frac{A_{280} - A_{320}}{\varepsilon_{280}} \quad (10),$$

$$C = \frac{A_{205} - A_{320}}{\varepsilon_{205}} \quad (11),$$

$$C = \frac{A_{274,5} - A_{320}}{n_{Tyr} \times 1340} \quad (12),$$

где C — концентрация полипептида в моль/л; A_{205}, $A_{274,5}$, A_{280}, A_{320} — оптическая плотность раствора при 205, 274,5, 280 и 320 нм, соответственно; ε_{205}, ε_{280} — расчетные (десятичные) молярные коэффициенты поглощения (экстинкции) полипептида при 205 и 280 нм; n_{Tyr} — число остатков тирозина в молекуле полипептида.

Концентрацию препаратов FP-Tx рассчитывали с использованием ε_{489} = 55 000 $М^{-1}см^{-1}$ для eGFP-OSK1 и eGFP-α-CbTx, ε_{555} = 100 000 $М^{-1}см^{-1}$ для RFP-AgTx-2.

В случае, когда нужно было оценить концентрацию белков с неизвестной структурой или не требовалась высокая точность, измеряли поглощение раствора при 260 и 280 нм и использовали формулу:

$$C_1 = 1{,}55 \times A_{280} - 0{,}76 \times A_{260} \quad (13),$$

где C_1 — концентрация белка в мг/мл, A_{260} — оптическая плотность раствора при 260 нм.

2.4.1.2. Измерение концентрации нуклеиновых кислот

Концентрацию ДНК и РНК тоже определяли УФ-спектрофотометрически. Для нужд данной работы измеряли поглощение растворов при 260 и 320 нм и использовали приближенные формулы:

$$C_2 = 50 \times (A_{260} - A_{320}) \quad (14),$$

$$C_3 = 40 \times (A_{260} - A_{320}) \quad (15),$$

где C_2 — концентрация двуцепочечной ДНК в мкг/мл, C_2 — концентрация одноцепочечной РНК в мкг/мл.

2.4.2. Флуоресцентная спектроскопия

Спектры поглощения, возбуждения флуоресценции и испускания FP-Tx измеряли при концентрации 0,5 мкМ в 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5). Использовали спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian, Agilent Technologies, США). Ширина щелей монохроматоров составляла 5 нм. В случае eGFP спектр эмиссии измеряли при возбуждении на длине волны 460 нм, спектр возбуждения — для эмиссии на длине волны 540 нм. В случае TagRFP спектр эмиссии измеряли при возбуждении на длине волны 500 нм, спектр возбуждения — для эмиссии на длине волны 620 нм.

2.4.3. Круговой дихроизм

Очищенные и высушенные полипептиды растворяли в концентрации ≈ 1 мг/мл в воде, 50% ТФЭ, буферном растворе, суспензии мицелл, бицелл или липидных везикул. Спектры КД получали в лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН на спектрополяриметре J-810 (Jasco, Япония) в диапазоне длин волн 190–250 нм (область поглощения амидного хромофора) с шагом 0,2 нм при 20 °C. Использовали кварцевые (Suprasil) кюветы (Hellma, Германия) с длиной оптического пути 0,1 мм, куда вносили 30 мкл растворов исследуемых полипептидов. Спектры КД приведены в единицах молярной эллиптичности [Θ]. Оценку содержания элементов вторичной структуры проводили на сервере DichroWeb; в большинстве случаев использовали современную модификацию программы CONTIN (934) и набор референсных спектров SP175. Нормализованное среднеквадратическое отклонение (NRMSD), характеризующее качество анализа, было <0,1.

2.4.4. Ядерный магнитный резонанс

Большинство экспериментов выполнены в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии, эксперименты с токсином Hm-3 — в лаборатории структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН. Лиофилизированный порошок полипептида растворяли в $^{1}H_2O$ / $^{2}H_2O$ (9 : 1 или 19 :1) или 100% $^{2}H_2O$ до конечной концентрации ~1 мМ, значение pH варьировало (~3–7). Спектры ЯМР получали обычно при 30 °C на спектрометрах Avance III 600 МГц, Avance 700 Мгц или Avance III 800 МГц, (Bruker Biospin, США), оснащенных сверхчувствительными четырехканальными криогенными датчиками тройного резонанса (H/C/N/D). Получали следующие гомоядерные 2D ЯМР-спектры: DQF-COSY, TOCSY с изотропным периодом смешивания DIPSI-2 60–80 мс и NOESY со временем смешивания 40–400 мс. Для подавления сигнала растворителя использовали технику WATERGATE (935). Время релаксации составляло 1,2–1,5 с. Получали также гетероядерные 2D и 3D ЯМР-спектры: ^{13}C-HSQC, ^{15}N-HSQC, ^{15}N-TROSY, ^{15}N-TROSY-HNCO, ^{13}C-HMBC, ^{13}C-HSQC-TOCSY, ^{15}N-NOESY-HSQC со временем смешивания 60 мс, ^{15}N-TOCSY-HSQC, ^{15}N-DIPSI-2-rc-HSQC, HNHA, HNHB, HNCA, HN(CO)CA, HN(CA)CO, HNCACB, CBCA(CO)NH, HCCH-TOCSY, (H)CCH-COSY, (HB)CB(CGCC)H (при необходимости при естественном содержании ^{15}N и ^{13}C). Для регистрации спектров тройного резонанса применяли методы BEST (936) и BEST-TROSY (937).

Для получения спектров в среде, имитирующей мембрану, лиофилизат полипептида растворяли в суспензии дейтерированного ДФХ в $^{1}H_2O$ / $^{2}H_2O$ при соотношении полипептид / детергент 1 : 100. Общее изменение химических сдвигов амидных ^{1}H и ^{15}N ($\Delta\delta_{H,N}$) рассчитывали по уравнению:

$$\Delta\delta_{H,N} = \sqrt{\left[\delta(^{1}H) - \delta(^{1}H, DPC)\right]^2 + \left[\delta(^{15}N) - \delta(^{15}N, DPC)/5\right]^2} \qquad (16),$$

где $\delta(^{1}H)$ — химический сдвиг ^{1}H в воде, $\delta(^{1}H,DPC)$ — то же в ДФХ, $\delta(^{15}N)$ — химический сдвиг ^{15}N в воде, $\delta(^{15}N,DPC)$ — то же в ДФХ.

Обработанные спектры анализировали в программе CARA (921) с использованием стандартной процедуры последовательного отнесения (938) на основе всех полученных 2D и 3D ЯМР-спектров. Расчет пространственной структуры выполняли с использованием протокола симулированного отжига / молекулярной динамики (МД) в пространстве торсионных углов с псевдопотенциалами, реализованного в программе CYANA (922). Верхние ограничения на межпротонные расстояния получали из кросс-пиков спектра NOESY с помощью калибровки $1/r^6$. Ограничения на двугранные углы основной цепи φ и ψ вводили на основе констант $^{3}J_{HNHA}$. Значения углов χ^1 и стереоспецифические отнесения протонов метиленовых

групп получали из констант $^{3}J_{HANB}$, а также из интенсивностей кросс-пиков в спектрах с ядерным эффектом Оверхаузера (ЯЭО). Добавляли дополнительные ограничения для водородных связей основной цепи. Потенциальные доноры водородных связей предсказывали исходя из скорости обмена амидных протонов на дейтерий растворителя. Эти данные получали в результате серии экспериментов ^{15}N-HSQC, проводившихся после растворения полипептида в $^{2}H_2O$. Акцепторы водородных связей предсказывали после анализа предварительной структуры.

В окончательном расчете использовали все полученные данные ЯМР: ограничения на расстояния для водородных связей, дисульфидных мостиков, межпротонного ЯЭО, торсионных углов и стереоспецифических отнесений. Всего рассчитывали 100–200 случайных структур, итоговые 10–20 структур (10% от общего набора) выбирали для итогового анализа в соответствии со значениями целевой функции CYANA.

2.4.5. Масс-спектрометрия

Измерение Мм компонентов фракций и индивидуальных соединений проводили методом времяпролетной МС, метод ионизации — матрично-активированная лазерная десорбция-ионизация (МАЛДИ), с идентификацией положительно заряженных ионов в линейном (измерение средних значений Мм) или рефлекторном режиме (измерение моноизотопных Мм). Использовали различные масс-спектрометры: M@LDI LR под управлением программы MassLynx (Micromass) или Ultraflex TOF-TOF с программой flexControl (Bruker Daltonik; в этом случае эксперименты выполняли в лаборатории протеомики ИБХ РАН и лаборатории медицинской протеомики НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича), оснащенные лазерами (337 и 355 нм).

В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту или α-циано-4-гидроксикоричную кислоту (10 мг/мл в 50% ацетонитриле, 0,1% ТФУ; Sigma-Aldrich). Образцы готовили методом высушенной капли (“dried-droplet”): равные объемы (0,5 мкл) образца и матрицы смешивали на мишени и оставляли сушиться на воздухе. Калибровку приборов проводили с использованием наборов: ProteoMass Peptide MALDI-MS Calibration Kit с диапазоном Мм 700–3500 Да или ProteoMass Peptide and Protein MALDI-MS Calibration Kit (Sigma-Aldrich) с диапазоном 700–66 000 Да. Заявленная производителями точность измерения масс при использовании внешнего стандарта составляла 50 и 25 миллионных долей (м.д.) для M@LDI-LR и Ultraflex, соответственно. Для анализа масс-спектров использовали программы MassLynx, Data Analysis и Data Analysis Viewer.

В некоторых случаях анализировали образцы, полученные сразу после алкилирования тиольных групп или гидролиза полипептидов. Тогда проводили быстрое обессоливание реакционных смесей с помощью наконечников ZipTip (with 0.6 μL C_{18} resin, Millipore).

Секвенирование пептидов с помощью тандемной масс-спектрометрии (МС/МС) проводили на масс-спектрометре Ultraflex TOF-TOF согласно указаниям производителя с использованием ячейки, где происходит фрагментация «родительских» ионов, и второго времяпролетного масс-анализатора для измерения масс полученных фрагментов. Спектры анализировали в программах flexAnalysis и Mascot.

2.4.5.1. Масс-спектрометрия, сопряженная с жидкостной хроматографией

Образцы наносили на колонку с сорбентом ReproSil-Pur 200 C18-AQ (0,1×50 мм, диаметр частиц 5 мкм, размер пор 200 Å; Dr. Maisch, Германия) в растворе: 2% ацетонитрил, 0,1% ТФУ; скорость потока: 4,2 мкл/мин. Обращенно-фазовую высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФ-ВЭЖХ; точнее в данном случае сверхвысокоэффективную жидкостную хроматографию) проводили с использованием системы UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific), которая была подключена к масс-спектрометру Orbitrap Fusion Lumos Tribrid (Thermo Fisher Scientific) с помощью наноэлектрораспылителя. Разделение вели при комнатной температуре на колонке с сорбентом ReproSil-Pur 120 C18-AQ (0,1×300 мм, диаметр частиц 1,9 мкм, размер пор 120 Å; Dr. Maisch) (939), в линейном градиенте ацетонитрила (2,4–3,2% за 5 мин, 3,2–32% за 53 мин, 32–48% за 7 мин, 48–79,2%, за 0,1 мин) в 0,1% муравьиной кислоте со скоростью потока элюента 500 нл/мин.

Параметры МС1: разрешение 60K, диапазон сканирования 350–1600. Ионы выделяли с интервалом 1,2 m/z. Для секвенирования пептидов с помощью МС/МС фрагментацию МС2 проводили в режиме диссоциации, индуцируемой высокоэнергетическим соударением (англ. high-energy collision-induced dissociation, HCD), с разрешением 15K при энергии столкновения 30%.

Результаты анализировали в программе PEAKS Studio (940) актуальной версии. В качестве вариабельных модификаций выбирали дезамидирование аспарагина и глутамина, окисление метионина и N-концевое ацетилирование. При анализе фрагментов белков, полученных специфичным протеолизом, в настройках указывали полуспецифичный режим расщепления, при поиске по базе данных разрешали не более трех пропущенных сайтов. Идентификацию пептида проводили с допустимым отклонением массы исходного предшественника ≤ 10 м.д. и допустимым отклонением массы фрагмента ≤ 0,02 Да.

2.4.6. Жидкостная хроматография

Фракции, содержащие ацетонитрил, хранили при −20 или 4 °C, очищенные и лиофильно высушенные компоненты — при −20 или −80 °C.

2.4.6.1. Гель-фильтрация

Эксклюзионную хроматографию проводили в изократическом режиме при комнатной температуре с использованием насоса P-3500 (Pharmacia, Швеция). Оптическое поглощение элюата измеряли с помощью детектора 2489 (Waters, США) при двух длинах волн: 210 нм (в области поглощения пептидной связи) и 280 нм (в области поглощения тирозина и триптофана) — с регистрацией на компьютере в программе МультиХром (Амперсенд, Россия). Более ранние эксперименты выполняли на хроматографе System Gold, состоящем из Programmable Solvent Module Model 126 и Scanning Detector Module 167 (Beckman, США), с регистрацией в программе МультиХром. Фракции отбирали вручную или с помощью автоматического коллектора Frac-100 (Pharmacia Fine Chemicals, Швеция).

Для получения картины разделения нескольких ядов использовали колонку TSKgel SuperSW2000 (4,6×300 мм; диаметр частиц 4 мкм, размер пор 125 Å; Tosoh Bioscience, Япония) с предколонкой TSKgel SuperSW Guard (4,6×35 мм; диаметр частиц 4 мкм). Элюент: 10% ацетонитрил, 0,1% ТФУ; скорость потока: 0,35 мл/мин. Образцы ядов растворяли в воде или элюенте, центрифугировали в микроцентрифуге (15 мин при максимальных оборотах, ≈12 000 *g*), на колонку наносили супернатант из расчета 100 мкг яда в 5–10 мкл.

Для разделения ядов с целью выделения активных компонентов использовали колонку TSK 2000SW (7,5×600 мм, диаметр частиц 10 мкм, размер пор 125 Å; Toyo Soda Manufacturing, Япония) и такой же элюент; скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Яд пауков *Alopecosa marikovskyi* (Lycosidae) и *O. takobius* (Oxyopidae) разделяли в 150 мМ NaCl, 20–50 мМ NaH_2PO_4 (pH 5,2). Образцы ядов растворяли в элюенте, после центрифугирования как выше супернатант наносили на колонку из расчета: 10–25 мкл лиофилизованного яда (≈2–5 мг) в 100 мкл элюента. Фракции отбирали по оптическому поглощению элюата при 210 и 280 нм.

Для градуировки колонок использовали молекулярные стандарты: бычий сывороточный альбумин (БСА), рибонуклеазу А (оба из набора Gel Filtration Calibration Kit, art. no. 17-0442-01, Pharmacia Fine Chemicals), PT1 (рекомбинантный, см. раздел «Выделение и характеристика структуры пуротоксинов»), изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ; Sigma-Aldrich). Полипептиды взвешивали в количестве 100 мкг и растворяли в 10 мкл элюента, а ИПТГ растворяли в воде в концентрации 1 М. Смешивали по 2,5 мкл растворов полипепти-

дов (по 25 мкг) и 1 мкл 1 М раствора ИПТГ (≈250 мкг) и смесь наносили на колонку TSKgel SuperSW2000 (4,6×300 мм).

2.4.6.2. Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ-ВЭЖХ)

В большинстве случаев использовали градиентный хроматограф Waters, состоящий из 1525 Binary HPLC Pump и детектора 2489. Профиль элюции регистрировали по поглощению элюата при длинах волн 210 и 280 нм; запись вели на компьютере в программе Breeze 2 (Waters). В более ранних исследованиях мы использовали хроматограф производства Kontron Instruments (Италия), снабженный насосами System 525 и детектором 535, а также дегазером ERC-3415α (Erma, Япония), с регистрацией на компьютере в программе KromaSystem 2000 (Kontron Instruments).

ОФ-ВЭЖХ проводили на одной из колонок:

1) “Ascentis” RP-Amide (4,6×150 или 4,6×250 мм; диаметр частиц 3 или 5 мкм, размер пор 100 Å; Sigma-Aldrich);

2) Delta-Pak C_4 (3,9×150 мм; диаметр частиц 5 мкм, размер пор 300 Å; Waters);

3) Jupiter C_5 (2×150, 4,6×150 или 4,6×250 мм; диаметр частиц 5 мкм, размер пор 300 Å; Phenomenex, США);

4) Jupiter C_4 или C_5 (10×250 мм; диаметр частиц 5 или 10 мкм, размер пор 300 Å; Phenomenex);

5) Luna C_8 или C_8 (2) (4,6×150 или 4,6×250 мм; диаметр частиц 5 мкм, размер пор 100 Å; Phenomenex);

6) Luna C_{18} или C_{18} (2) (4,6×150, 4,6×250 или 10×250 мм; диаметр частиц 5 или 10 мкм, размер пор 100 Å; Phenomenex);

7) Vydac 218TP54 C_{18} (4,6×250 мм; диаметр частиц 5 мкм, размер пор 300 Å; Grace, США).

Обычно яд вначале делили с помощью гель-фильтрации, а в качестве второго этапа разделения использовали ОФ-ВЭЖХ при комнатной температуре на Vydac C_{18} (4,6×250 мм) в линейном градиенте ацетонитрила (0–60% за 60 мин) и 0,1% ТФУ со скоростью потока элюента 1 мл/мин. В некоторых случаях разделение проводили при 40 °C с использованием термостата Model 1500 Column Heater (Waters), в который помещали колонку. Исключение составил яд паука *Agelena orientalis* (Agelenidae), который разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C_5 (4,6×150 мм) с использованием 45-минутного линейного градиента концентрации ацетонитрила (0–20% за 5 мин, 20–80% за 40 мин) в 0,1% триэтиламине (титрованном уксусной кислотой до pH 10) при скорости потока 1 мл/мин. Все полученные

фракции подвергали повторной ОФ-ВЭЖХ на той же колонке в кислых условиях с использованием 60-минутного линейного градиента концентрации ацетонитрила (0–60%) в 0,1% ТФУ. Для рехроматографии (третьего этапа разделения) обычно использовали колонки RP-Amide.

2.4.7. Электрофорез белков

Разделение белковых препаратов проводили по методу диск-электрофореза (941) в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях — в присутствии 0,1% ДСН (942). Учитывали методические советы (943) и “A Guide to Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Detection” (Bio-Rad Laboratories, США). Использовали готовые гели 12% или Any kD Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels, 15-well, 15 μl (#4569036 или 4561046, Bio-Rad Laboratories) или готовили ПААГ с лунками нужного размера сами (ширина × длина × толщина: 8,3 × 7,3 × 0,1 см; 15 лунок объемом 15 мкл). Смесь для приготовления верхнего концентрирующего геля (5%): 0,8 мл 30% (w/v) раствора смеси акриламид / бисакриламид (29 : 1) в воде, 1,25 мл 0,5 М Трис-HCl (pH 6,8), 2,95 мл воды, 50 мкл 10% ДСН (w/v), 5 мкл N,N,N′,N′-тетраметилэтилен-1,2-диамина (ТЕМЕД), 17 мкл 10% персульфата аммония (w/v). Смесь для приготовления нижнего разделяющего геля (в качестве примера 15%): 0,6 мл воды, 3,6 мл 50% глицерина (v/v), 4,5 мл 1,5 М Трис-HCl (pH 8,8), 9 мл раствора смеси акриламид / бисакриламид, 180 мкл 10% ДСН, 12 мкл ТЕМЕД, 60 мкл 10% персульфата аммония. Гели готовили с использованием заливочной камеры Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Module (#1658016, Bio-Rad Laboratories).

Перед нанесением в лунки к образцам добавляли окрашенный буферный раствор (буфер для нанесения образцов), содержащий: 20% ДСН (w/v); 50% глиценрин (v/v); 4% 2-меркаптоэтанол (v/v); 0,5 М этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 0,5 М Трис-HCl (pH 6,8), 0,1% бромфеноловый синий (w/v). Буфер для образцов брали из расчета 1 часть на 7–10 частей образца; полученную смесь кипятили на водной бане в течение 15 мин. Использовали молекулярные стандарты Unstained Protein Molecular Weight Marker (#SM0431, Fermentas); 5 мкл смешивали с 1 мкл буфера для образцов и кипятили перед нанесением. Яды наносили из расчета ≈10 мкг сухого веса на дорожку.

Электродный буфер: 25 мМ Трис-HCl (pH 8,3), 250 мМ глицин, 0,1% ДСН (w/v). Электрофорез проводили в камере Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell (#1658005, Bio-Rad Laboratories) при постоянном напряжении (устанавливали на 40 В вначале и переводили на 80 В после входа фронта в разделяющий гель). Источником тока служил 2301 Macrodrive 1 Power Supply (LKB Bromma, Швеция).

После окончания электрофореза (выхода красителя из геля) проводили окрашивание белков с помощью красителя Кумасси R-250. Гели переносили в раствор красителя (0,25% Кумасси R-250, w/v; 10% уксусная кислота, v/v; 30% изопропиловый спирт, v/v), нагревали до ≈70 °C в микроволновой печи и выдерживали в течение 1 ч при комнатной температуре и легком перемешивании. Отмывку ПААГ от избытка красителя проводили в нескольких сменах раствора, содержащего 7% уксусной кислоты и 10% этанола.

2.4.8. Органический синтез

Производные азобензола и спермина (ABSP-1–13) синтезировали в лаборатории химии гетероциклических соединений ИБХ РАН с использованием традиционных подходов. Вначале из соответствующих анилинов синтезировали различные замещенные азапроизводные, содержащие трет-бутильную (*t*Bu) сложноэфирную группу. Затем их превращали в соответствующие кислоты, которые реагировали со спермином с двумя или тремя защитными трет-бутилоксикарбонильными (Boc) группами. Далее, при необходимости, второй эфирный остаток превращали в карбоксильную группу и конъюгировали с различными аминами или бензиловым спиртом. Наконец, Boc-группы удаляли действием соляной кислоты. Подробности синтеза, а также оптические свойства полученных соединений и спектры ^{1}H и ^{13}C ЯМР опубликованы (944).

2.4.9. Восстановление дисульфидных связей и алкилирование тиольных групп

Мы использовали методику Ц.А. Егорова (945) с модификациями. Очищенный лиофилизированный полипептид (≈1 нмоль) растворяли в 50 мкл раствора, содержащего 6 М гуанидингидрохлорид, 2 мМ ЭДТА, 0,5 М Трис-HCl (pH 8,5). Пробирку продували азотом, добавляли 2 мкл раствора дитиотреитола (ДТТ; 1 М в воде / ацетонитриле / изопропаноле; использовали всегда свежий раствор), т.е. заведомо 100-кратный избыток. Реакцию восстановления дисульфидных связей проводили при 40 °C в течение 4 ч. После этого добавляли 4 мкл 50% раствора 4-винилпиридина в изопропаноле, т.е. ≈10-кратный избыток по отношению к ДТТ, инкубировали смесь в темноте в течение 15 мин. Продукт алкилирования полипептида по тиольным группам очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ, при этом вначале в изократическом режиме (5% ацетонитрила) отделяли избыток реагентов и побочные продукты. Для веществ, полученных в существенно меньших количествах, выделение продуктов осуществляли с помощью наконечников ZipTip согласно рекомендациям производителя, образцы наносили на мишень для МС (см. выше).

2.4.10. Селективный гидролиз полипептидов

2.4.10.1. Расщепление по остаткам метионина с помощью бромциана

Мы использовали методику Ц.А. Егорова (945) с модификациями. Наш обычный протокол: растворение очищенного лиофилизированного полипептида (≈1 нмоль) в 50 мкл 80% ТФУ, добавление 1 мкл 5 М раствора бромциана в ацетонитриле (Sigma-Aldrich), проведение реакции в темноте в течение ночи (≈18 ч). По окончании реакции в смесь добавляли 1 мл воды, высушивали на вакуумном концентраторе до 50 мкл, разбавляли 1 мл воды и разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ. Нами надежно установлено, что в качестве растворителя можно использовать 70% муравьиную кислоту (классический протокол) или 0,1 М HCl (обновленный протокол).

2.4.10.2. Кислотный гидролиз

Для расщепления по связям Asp-Pro полипептид (≈1 нмоль) растворяли в 98 мкл воды, добавляли 2 мкл 1 М HCl, инкубировали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Продукты разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ.

2.4.10.3. Энзиматические методы

Отщепление N-концевого остатка пироглутаминовой кислоты проводили с помощью пироглутамат-аминопептидазы (пироглутамил-пептидазы I), цистеиновой протеазы из археи *Pyrococcus furiosus* (EC 3.4.19.3; Sigma-Aldrich). Фермент растворяли в 50 мМ Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 (pH 7), 10 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, из расчета 1 миллиединица в 10 мкл раствора. Очищенный лиофилизированный полипептид (≈1 нмоль) растворяли в 50 мкл того же буферного раствора, куда прибавляли 10 мкл раствора фермента. Реакцию гидролиза проводили при 75 °C в течение 2 ч. Продукт очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ.

Для получения фрагментов полипептидов с целью секвенирования или пептидного картирования мы использовали следующие эндопротеазы: (а) трипсин из поджелудочной железы быка (EC 3.4.21.4; F. Hoffmann-La Roche); (б) химотрипсин из того же источника (EC 3.4.21.1; F. Hoffmann-La Roche); (в) эндопротеиназа Arg-C (тканевой калликреин), сериновая протеаза из подчелюстной железы мыши (EC 3.4.21.35; Sigma-Aldrich); (г) эндопротеиназа Lys-C (лизил-эндопептидаза), сериновая протеаза из бактерии *Lysobacter enzymogenes* (EC 3.4.21.50; Sigma-Aldrich); (д) эндопротеиназа Asp-N (пептидил-аспартат металлоэндопептидаза), металлопротеаза из бактерии *Pseudomonas fragi* (EC 3.4.24.33; F. Hoffmann-La Roche); (е) эндопротеиназа Glu-C (протеаза V8; глутамил-эндопептидаза), сериновая протеаза из штамма V8 бактерии *Staphylococcus aureus* (EC 3.4.21.19; F. Hoffmann-La Roche).

Ферменты вначали растворяли для получения стоковых растворов, концентрация и состав указаны в таблице 25. Аликвоты стоковых растворов ферментов хранили при −20 или −80 °C. Затем очищенные лиофилизированные полипептиды (≈1 нмоль) растворяли в 50 мкл рабочего раствора (состав приведен в таблице 25), куда прибавляли необходимое количество стокового раствора нужного фермента (соотношение фермент : субстрат как в таблице 25). Реакцию гидролиза проводили при 40 °C в течение 4 ч. Продукты разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ.

Таблица 25. Эндопротеазы, использованные для установления первичной структуры токсинов.

Фермент	Стоковый раствор	Рабочий раствор	Фермент : субстрат (w/w)
Трипсин	1 мкг/мкл, 1 мМ HCl	100 мМ Трис-HCl (pH 8,5)	1 : 50
Химотрипсин	1 мкг/мкл, 1 мМ HCl	100 мМ Трис-HCl (pH 8,5)	1 : 100
Arg-C	0,1 мкг/мкл, 1 мМ HCl	100 мМ NH_4HCO_3 (pH 8,5)	1 : 50
Lys-C	0,1 мкг/мкл, 50 мМ Трицин, 10 мМ ЭДТА (pH 8)	100 мМ NH_4HCO_3 (pH 8,5)	1 : 20
Asp-N	0,04 мкг/мкл, 10 мМ Трис-HCl (pH 7,5)	50 мМ Трис-HCl (pH 8)	1 : 20
Glu-C	1 мкг/мкл в воде	50 мМ CH_3COONH_4 (pH 4)	1 : 50

2.4.11. Секвенирование полипептидов

N-Концевые аминокислотные последовательности алкилированных полипептидов определяли на белковых секвенаторах: Procise Model 492 (Applied Biosystems) или PPSQ-33A (Shimadzu) — в соответствии с протоколами производителей. Использовали реактивы и растворы специальной чистоты. В реакцию брали не менее 500 пмоль полипептида, растворенного в 0,1% ТФУ или смеси ацетонитрила и воды. Раствор наносили на диск из стекловолокна (Glass Fiber Disk, TFA treated, FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) или мембрану из поливинилидендифторида (PVDF; Sequi-Blot, Bio-Rad Laboratories), высушивали на воздухе и загружали в реактор секвенатора. Образец сравнения — 25 мкл стандартного раствора PPSQ PTH-Amino Acids Mix (Shimadzu) с концентрацией 1 нмоль/мл. Все операции выполняли в автоматическом режиме. Детекцию фенилтиогидантоинов аминокислот осуществляли по оптическому поглощению при длине волны 269 нм и путем сравнения времени удерживания со стандартом. Остатки цистеина определяли в виде S-пиридилэтилированных производных.

2.4.12. Химический синтез пептидов

Пептиды синтезировали в лабораториях химии пептидов, рецепции нейропептидов, лиганд-рецепторных взаимодействий и протеомики ИБХ РАН. Использовали классический метод твердофазного синтеза по Меррифилду путем наращивания цепи с С-конца, для временной защиты α-NH_2 групп использовали флуоренилметоксикарбонильную группу (Fmoc) (946). Синтез проводили на 2-хлортритилхлоридной смоле (с нагрузкой 0,98 ммоль/г) для получения пептидов со свободной α-COOH группой или 4-(2′,4′-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)-фенокси (Ринк-амидной) смоле (с нагрузкой 0,51 ммоль/г) для получения пептидов с С-концевым амидированием (PepChem, Германия). Защиту боковых групп а.о. выбирали с расчетом на конечное деблокирование ТФУ: остатки Ser, Thr и Tyr, а также Asp и Glu были защищены *t*Bu-группой; Lys и Trp — Boc-группой; Arg — 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонильной группой (Pbf); Asn, Gln, Cys и His — тритильной группой (Tr). Синтез вели вручную или на пептидном синтезаторе Syro I (MultiSynTech, Германия).

Первый (С-концевой) а.о. присоединяли к тритилхлоридной смоле (1,5-кратный молярный избыток а.о. по отношению к активным группам смолы) в дихлорметане (10 мл на 1 г смолы) в присутствии N,N-диизопропилэтиламина [DIEA, 3 эквивалента (экв.) в расчете на а.о.] в течение 45 мин. Непрореагировавшие активные группы на смоле блокировали метанолом (1 мл на 1 г смолы) в течение 20 мин. Смолу промывали дихлорметаном, N,N-диметилформамидом (ДМФ) и этанолом (по три объема) и высушивали под вакуумом.

А.о. по одному присоединяли к растущему пептидил-полимеру (брали пятикратный избыток а.о.). Для снятия временной Fmoc-защиты пептидил-полимер инкубировали в 20% 4-метилпиперидине в ДМФ (v/v; дважды по 10 мин). С Ринк-амидного полимера Fmoc-защиту снимали так же; предварительно смола набухала в ДМФ в течение 1–2 ч, после снятия Fmoc-группы полимер промывали ДМФ (шесть раз по 2 мин). Для активации карбоксильной группы использовали N,N'-диизопропилкарбодиимид (DIC, 1 экв.), N-гидроксибензотриазол (HOBt, 1,2 экв.) или 2-(1H-бензотриазол-1-ил)-1,1,3,3-тетраметиламиния гексафторфосфат (HBTU, 1 экв.) и DIEA (1 экв.). Конденсацию проводили в ДМФ при 37 °C в течение 1–1,5 ч, после чего пептидил-полимер промывали ДМФ (четыре раза по 2 мин). В случае ручного синтеза содержание непрореагировавших аминогрупп контролировали с помощью нингидринового теста Кайзера.

Отщепление продукта от полимера с одновременным деблокированием боковых групп проводили смесью ТФУ, воды и этандитиола (95 : 2,5 : 2,5, v/v/v; 1 мл смеси на 50 мг смолы). Суспензию перемешивали в течение 2 ч, затем раствор пептида отделяли от смолы фильтрацией. Пептид осаждали 10-кратным избытком диэтилового эфира (по объему, охла-

жденного до −18 °C) при 4 °C, фильтровали, дважды промывали эфиром и высушивали лиофильно. Окисленные остатки метионина восстанавливали: пептид растворяли в 10% уксусной кислоте в концентрации 2 мг/мл, прибавляли метилмеркаптоацетамид (10-кратный молярный избыток в расчете на остаток метионина), инкубировали при 37 °C в течение 36 ч.

Синтезированные пептиды очищали ОФ-ВЭЖХ на колонке Luna C_{18} (10×250 мм). Фракционирование проводили в линейном градиенте концентрации ацетонитрила (0–60% за 60 мин) в 0,1% ТФУ со скоростью элюции 2 мл/мин. Детекцию осуществляли по оптическому поглощению при 210 нм. Чистоту препаратов синтетических пептидов оценивали аналитической ОФ-ВЭЖХ на колонке Vydac C_{18} (4,6×250 мм); она составляла >98%. Идентичность синтезированных пептидов природным доказывали при помощи МС, сравнением хроматографической подвижности на аналитической колонке, а также в тестировании биологической активности.

2.4.13. Работа с нуклеиновыми кислотами

2.4.13.1. Очистка нуклеиновых кислот

Процедуру выделения плазмидной ДНК проводили с использованием наборов реактивов Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) или Plasmid Miniprep Color (Евроген) в соответствии с методиками производителей.

Выделение и очистку ДНК из ПЦР-смеси проводили с помощью наборов реактивов GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) или QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Германия).

Выделение фрагментов ДНК из агарозного геля осуществляли с помощью наборов реактивов Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) или GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific).

Очистку синтетической мРНК проводили с помощью набора реактивов RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen).

2.4.13.2. Секвенирование ДНК

Секвенирование проводили по методу Сэнгера в Центре коллективного пользования «Геном» Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН или в компании «Евроген».

2.4.13.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Мы использовали 1–2% агарозный гель (w/v). Перед нанесением в лунки к образцам добавляли окрашенный раствор для нанесения (в соотношении 3–10 : 1), содержащий: 0,25%

бромфеноловый синий (w/v), 0,25% ксиленцианол (w/v), 30% глицерин (v/v). Электрофорез проводили в буфере ТАЕ: 40 мМ Трис-ацетат (pH 7,6), 1 мМ ЭДТА, с добавлением бромида этидия (0,5 мкг/мл). В качестве стандарта использовали смесь DNA Ladder 1 kb (Евроген), содержащую фрагменты длиной 250–10 000 пар нуклеотидов (п.н.).

2.4.13.4. Рестрикция

Мы использовали буферные растворы, оптимальные для работы выбранных эндонуклеаз рестрикции соответствующих производителей. Для расщепления 1 мкг ДНК в реакционной смеси объемом 20 мкл использовали 4 ед. каждого фермента. Реакцию проводили при 37 °С в течение 2 ч. Визуализацию прохождения реакции осуществляли с помощью электрофореза в агарозном геле. Очистку рестрицированных фрагментов ДНК и векторов проводили с помощью набора реактивов QIAquick PCR Purification Kit или с помощью электрофореза в агарозном геле с последующим выделением ДНК из геля с использованием наборов реактивов Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System или GeneJet Gel Extraction Kit.

2.4.13.5. Лигирование

Реакцию лигирования проводили с использованием ДНК-лигазы фага Т4 (Promega). Для этого в смесь сшиваемых молекул добавляли лигазный буфер, 1 мМ АТФ, 0,5 мкл раствора фермента и инкубировали ее при 16 °С в течение ночи.

2.4.13.6. Полимеразная цепная реакция

Для проведения реакций ПЦР мы использовали амплификатор РТС-200 (MJ Research, США) или S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories). Стандартная реакционная смесь объемом 200 мкл содержала 0,2 мМ каждого дезоксинуклеотида, 10–20 пмоль праймерных олигонуклеотидов, 1–10 нг матричной ДНК и 5 ед. Taq-полимеразы (Евроген), растворенных в буферном растворе для ПЦР (Евроген). Программа ПЦР: денатурация при 94 °С в течение 20 с, отжиг праймеров при расчетной температуре (использовали обычно 55–65 °С) в течение 20 с, элонгация цепи при 72 °С в течение расчетного времени (исходя из скорости работы фермента ≈ 1000 нуклеотидов/мин; обычно 30 с), 22–25 циклов, финальный этап элонгации в течение 7 мин. Результат реакции ПЦР анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле. В качестве отрицательного контроля использовали образец ДНК без целевой последовательности, например плазмиду pET-32b(+).

2.4.13.7. Трансформация

Компетентные клетки приобретали у компании «Евроген» или готовили по стандартным методикам, например (99). Электропорацию проводили с использованием прибора Celljject согласно рекомендациям производителя. После импульса к суспензии сразу же добавляли охлажденную низкосолевую среду LB [от англ. lysogeny broth; 1% бакто-триптон, 0,5% бакто-дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl (pH 7)], инкубировали на льду 5 мин, а затем при 37 °C в течение 1 ч. Для трансформации методом теплового шока суспензию бактерий инкубировали с нужной ДНК на льду в течение 30 мин, затем прогревали при 42 °C в течение 30 с, вновь охлаждали на льду в течение 5 мин, добавляли среду LB и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. Весь объем суспензии (в случае трансформации лигазной смесью) или аликвоты по 50 мкл (в случае трансформации плазмидой) переносили на чашку Петри с твердой средой LB с добавлением ампициллина [70 мкг/мл в случае штамма *E. coli* XL1-Blue, 100 мкг/мл в случае экспрессионных штаммов BL21(DE3) и SHuffle T7 Express] или трех антибиотиков [ампициллина (100 мкг/мл), тетрациклина (12,5 мкг/мл) и канамицина (15 мкг/мл) в случае экспрессионного штамма *E. coli* Origami B(DE3)] в качестве селективного фактора. Чашки инкубировали при 37 °C в течение 18 ч.

2.4.13.8. Отбор трансформантов, несущих целевой ген

Бактериальные колонии, обнаруженные на селективной среде, рассеивали штрихами на новой чашке Петри с твердой средой LB с антибиотиками и инкубировали при 37 °C в течение 18 ч. Клеточный материал (~1 мкл) переносили в пробирку и ресуспендировали в реакционной смеси для ПЦР, после чего проводили реакцию со специфичными к интересующей последовательности праймерами. Положительным контролем служил образец с целевой последовательностью, например ПЦР-продукт, полученный при синтезе гена.

2.4.13.9. Синтез мРНК

Векторы с нужными генами подвергали рестрикции с помощью соответствующих эндонуклеаз. Кэпированные мРНК синтезировали с использованием наборов для транскрипции *in vitro* mMESSAGE mMACHINE T7 или SP6 Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) или HiScribe T7 ARCA mRNA Kit (New England Biolabs) в соответствии с методиками производителей. В реакционную смесь добавляли также ингибитор РНКаз RiboCare (по 1 мкл на реакцию; Евроген).

2.4.13.10. Выделение нуклеиновых кислот из ядовитых желез

Препараты ядовитых желез хранили при −70 °C. ≈100 мг ткани ядовитых желез от нескольких особей использовали для экстракции геномной ДНК и тотальной РНК. Ткань выдерживали при 55 °C в 500 мкл буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 100 мМ ЭДТА, 1% ДСН, 1 мг/мл протеиназы K. Затем добавляли 250 мкл 5 M NaCl и центрифугировали в микроцентрифуге (15 мин при максимальных оборотах, ≈12 000 *g*). К супернатанту добавляли 750 мкл 96% этанола, снова центрифугировали. Смесь ДНК и РНК экстрагировали из осадка фенолом и хлороформом. После повторного осаждения этанолом смесь ДНК и РНК растворяли в воде.

Полученную геномную ДНК использовали в ПЦР. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию мРНК с помощью набора MINT (Евроген) согласно методике производителя. Последовательности кДНК фланкировали адапторами, в дальнейшем использовавшимися в реакциях быстрой амплификации концов кДНК (RACE, англ. rapid amplification of cDNA ends).

2.4.13.11. Амплификация и секвенирование кДНК и фрагментов геномной ДНК

Специфические праймеры подбирали, основываясь на последовательностях кДНК из библиотек ядовитых желез (см. ниже). 5' и 3'-RACE проводили с помощью универсального праймера T7cap и соответствующего специфического праймера. Продукты ПЦР лигировали с вектором pAL-TA, который затем клонировали, область вставки секвенировали по Сэнгеру.

Используя полученные последовательности, подбирали новые специфические праймеры для амплификации фрагментов геномной ДНК с помощью ПЦР. Очищенные продукты аналогично лигировали с вектором pAL-TA, который клонировали и секвенировали.

2.4.14. Транскриптомика

Все этапы создания библиотек кДНК из ядовитых желез проводили в сотрудничестве с DuPont Agriculture and Nutrition, основные процедуры описаны в (124). Ядовитые железы пауков и скорпионов препарировали, гомогенизировали и лизировали с помощью TRIzol (Life Technologies, США). Poly(A)$^+$ РНК очищали с помощью набора для очистки мРНК (Amersham Biosciences, США). Синтез первой и второй цепей кДНК, добавление линкера и клонирование в вектор pBlueScript SK(+) выполняли с использованием набора cDNA Synthesis Kit (Stratagene, США). кДНК очищали с использованием специальной колонки (Life Technologies). Секвенирование проводили с использованием прямого праймера M13 (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') с помощью набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator

Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) с ДНК-полимеразой AmpliTaq, FS (PerkinElmer Life Sciences, США) на ДНК-секвенаторе модели 373 (Applied Biosystems).

2.4.15. Получение рекомбинантных полипептидов

Целевые полипептиды в большинстве случаев получали в бактериальной (*E. coli*) системе путем «прямой» экспрессии соответствующих генов или путем экспрессии химерных генов — в виде гибридов с белком-помощником тиоредоксином (Trx). Для этого аминокислотную последовательность переводили в нуклеотидную с помощью обратной трансляции *in silico* с учетом частоты встречаемости кодонов у *E. coli*, добавляли необходимые элементы (сайты рестрикции, линкер для селективного протеолиза, стоп-кодон) и собирали соответствующую ДНК из олигонуклеотидных фрагментов, полученных химическим синтезом, с помощью лигирования и/или ПЦР. Эту ДНК затем встраивали в вектор pET-23d(+), pET-28a(+) или pET-32b(+) (Novagen) путем рестрикции и лигирования по липким концам. Полученный вектор со вставкой целевого гена использовали для трансформации экспрессионного штамма *E. coli*. Наработку гибридных белков осуществляли путем контролируемой экспрессии трансгенов с использованием ИПТГ в качестве индуктора. Клеточную массу разрушали, белковые продукты выделяли с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии (immobilized metal ion affinity chromatography, IMAC). Проводили селективный протеолиз гибридных белков, отщепленные целевые полипептиды очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ.

2.4.15.1. Получение синтетических генов

Аминокислотную последовательность целевого полипептида преобразовывали в нуклеотидную с помощью программы на сайте:
http://molbiol.ru/scripts/01_19.html —
она позволяет учитывать частоту встречаемости кодонов у *E. coli*.

На 5'-конце добавляли метиониновый кодон (если целевой полипептид не содержит остатков метионина) или последовательность, кодирующую сайт гидролиза энтеропептидазы человека (DDDDK). В последнее время обычно используем сайт с заменой лизина на аргинин (DDDDR). На 3'-конце добавляли стоп-кодон. В большинстве случаев полученную нуклеотидную последовательность фланкировали с 5'-конца сайтом рестрикции KpnI, а с 3'-конца — BamHI. Для обеспечения высокой эффективности рестрикции на обоих концах добавляли 4–6 случайных нуклеотидов. При необходимости нуклеотидную последовательность модифицировали, подбирая синонимичные замены так, чтобы использовался второй по частоте встречаемости кодон соответствующего а.о.

Итоговую последовательность разделяли на фрагменты длиной 15–50 нуклеотидов как показано на рисунках 44 и 45 (см. раздел «Получение рекомбинантных пептидов» Результатов). Эти фрагменты получали с помощью олигонуклеотидного синтеза (проводился в компании «Евроген»). В некоторых случаях полноразмерную последовательность получали с помощью ПЦР в две стадии: на первой проводили несколько циклов на эквимолярной смеси всех фрагментов при пониженной температуре отжига, а на второй осуществляли стандартную ПЦР с использованием концевых праймеров и разбавленного в 1000 раз продукта первой стадии в качестве матрицы. В большинстве же случаев для синтеза генов использовали комбинацию методов лигирования и ПЦР. Для этого готовили две смеси. Смесь 1 объемом 10–20 мкл содержала по 2 мкМ «прямых» олигонуклеотидов, за исключением 5'-концевого, растворенных в буферном растворе для лигирования (Promega), 1 мМ АТФ и 1 мкл раствора полинуклеотидкиназы (Promega). Ее инкубировали при 37 °С в течение 30 мин — для проведения реакции фосфорилирования. Смесь 2 содержала все другие олигонуклеотиды и 1 мМ АТФ в том же буферном растворе. Смеси 1 и 2 объединяли (по 5–10 мкл), нагревали при 96 °С в течение 15 мин и медленно остужали до комнатной температуры. Затем проводили реакцию лигирования, смесь разбавляли в 1000 раз, проводили ПЦР с «внешними» олигонуклеотидами в качестве затравок.

Химерный ген, кодирующий eGFP-OSK1, получали с помощью ПЦР с перекрывающимися праймерами (overlap extension polymerase chain reaction), соединяющей два фрагмента (947). Первый фрагмент, содержащий ген *egfp* и линкерную последовательность, амплифицировали с использованием плазмиды pIRES2-EGFP в качестве матрицы. Второй фрагмент, кодирующий OSK1, амплифицировали с использованием плазмиды pET-32b-OSK1. Всю кодирующую последовательность встраивали в pET-28a(+) по сайтам рестрикции NdeI и EcoRI, в результате получили вектор pET-28a-eGFP-OSK1.

Химерный ген, кодирующий RFP-AgTx2, получали в три этапа. Сначала ген TagRFP амплифицировали с использованием плазмиды pTagRFP-C (Евроген) и встраивали в pET-23d(+) по сайтам NcoI и EcoRI. Сайты EcoRI и HindIII этого вектора использовали для вставки линкерной последовательности, полученной из pET-32b(+) путем амплификации фрагмента ДНК, расположенного вслед за геном *trx*. Фрагмент ДНК, кодирующий AgTx-2, синтезировали ПЦР и встраивали в тот же вектор по сайтам KpnI и HindIII, в результате получили вектор pET-23d-RFP-AgTx-2.

Наконец, химерный ген, кодирующий eGFP-α-CbTx, также получали в три этапа. Вначале ген *egfp* встраивали в вектор pET-28a(+) по сайтам NdeI и BamHI. Затем синтезировали последовательность, кодирующую короткий линкер, и встраивали ее в тот же вектор по сай-

там BamHI и EcoRI. Фрагмент, кодирующий α-CbTx, синтезировали ПЦР и встраивали туда же по сайтам EcoRI и SalI, в результате получили вектор pET-28a-eGFP-α-CbTx.

2.4.15.2. Экспрессия трансгенов

Для наработки гибридных белков мы использовали экспрессионные штаммы *E. coli* BL21(DE3), Origami B(DE3) и SHuffle T7 Express. Ночную культуру трансформированных нужным вектором бактерий разбавляли в 1000 раз средой LB расчетного объема и добавляли антибиотики (концентрацию см. выше). Бактерии культивировали при 30 °C (SHuffle T7 Express) или 37 °C (другие штаммы) и интенсивном перемешивании до достижения $OD_{620} \approx 0{,}5$. Индукцию экспрессии трансгенов вызывали добавлением ИПТГ (0,2 мМ). Затем культуру инкубировали при 24 °C в течение 16 ч.

Для получения FP-Tx *E. coli* BL21(DE3) трансформировали pET-28a-eGFP-OSK1 или pET-28a-eGFP-α-CbTx и культивировали при 37 °C в среде LB в присутствии 15 мкг/мл канамицина. Экспрессию гена eGFP-OSK1 индуцировали 0,5 мМ ИПТГ, культуру дополнительно инкубировали при 25 °C в течение 20 ч. *E. coli* Rosetta-gami B(DE3)pLysS трансформировали pET23-RFP-AgTx2 и культивировали при 37 °C в среде TB [от англ. terrific broth; 2% бакто-триптон, 2,4% бакто-дрожжевой экстракт, 0,4% глицерин, 100 мМ K_2HPO_4 / KH_2PO_4 (pH 7)], содержащей 100 мкг/мл ампициллина, 15 мкг/мл канамицина, 12,5 мкг/мл тетрациклина и 34 мкг/мл хлорамфеникола. Экспрессию гена RFP-AgTx2 индуцировали 0,1 мМ ИПТГ, культуру дополнительно инкубировали при 18 °C в течение 20 ч.

Для получения химерных каналов KcsA-K_v1.1 и KcsA-K_v1.3 их гены были встроены в плазмиду pET-28a по сайтам NcoI и HindIII (948). Экспрессию проводили в *E. coli* BL21(DE3). Ночную культуру инокулировали в 50 мл среды LB до начальной плотности $OD_{560} \approx 0{,}3$. Индукцию экспрессии осуществляли при $OD_{560} \approx 1$ с помощью 20–500 мкМ ИПТГ, культуру выращивали при 37° C в течение 3–18 ч.

Для получения ^{15}N или ^{13}C,^{15}N-меченых образцов мы использовали минимальную среду M9 [1 мМ $MgSO_4$, 0,1 мМ $CaCl_2$, 0,6% NaH_2PO_4, 0,3% K_2HPO_4, 0,05% NaCl, 1 мМ тиамин (pH 7)] с добавлением ISOGRO-^{15}N, глюкозы и $^{15}NH_4Cl$ в случае ^{15}N-меченых полипептидов и $^{15}NH_4Cl$ ISOGRO-^{13}C, ^{15}N, ^{13}C-глюкозы и $^{15}NH_4Cl$ в случае дважды-меченых полипептидов (все в концентрации 1 г/л; Sigma-Aldrich). Трансформированные бактерии сначала культивировали в LB, затем осаждали центрифугированием и ресуспендировали до $OD_{620} \approx 0{,}1$ в среде M9 с нужными добавками. Дальнейшие операции были аналогичны описанным выше для немеченых образцов.

В большинстве случаев использовали стандартные колбы со средой объемом 200 мл, реже 400 мл. В некоторых случаях выход продукта был слишком низкий, тогда мы использо-

вали биореактор Bio-Flo/CelliGen 115 (New Brunswick, Eppendorf) с интенсивной аэрацией и перемешиванием.

2.4.15.3. Очистка гибридных белков

Гибридные белки, содержащие His-таг, выделяли с помощью IMAC. Бактериальные клетки осаждали центрифугированием при 4000 об./мин (≈2000 *g*) и ресуспендировали в стартовом буфере для аффинной хроматографии: 300 мМ NaCl, 50 мМ Трис-HCl (pH 8) с добавлением 5% глицерина. Лизис клеток вызывали с помощью ультразвукового дезинтегратора или пресса Френча. Полученный лизат наносили на кобальтовую смолу HisPur (Thermo Fisher Scientific) или TALON Superflow (Cytiva, США), слитные белки очищали с учетом рекомендаций производителей. Для этого вначале смывали несорбированные компоненты, затем смолу промывали специальным буфером для минимизации неспецифической сорбции: 500 мМ NaCl, 5 мМ имидазол, 5% глицерин, 0,1% Тритон X-100, 50 мМ Трис-HCl (pH 8). Искомые белки элюировали буфером, содержащим 150 мМ имидазол. FP-Tx дополнительно очищали с помощью гель-фильтрации на колонке TSK 2000SW (7,5×600 мм); элюентом служил раствор 150 мМ NaCl, 50 мМ Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 (pH 7,4).

2.4.15.4. Расщепление гибридных белков и очистка искомых соединений

В большинстве случаев проводили процедуру обессоливания очищенных гибридных белков с помощью ОФ-ВЭЖХ: раствор белка наносили на колонку с обращенной фазой, дожидались выхода несорбированных компонентов, белок смывали ступенчатым градиентом до 60% ацетонитрила. Затем белок высушивали лиофильно и перерастворяли в нужном растворе. В случае расщепления энтеропептидазой гибридный белок растворяли в 50 мМ Трис-HCl (pH 8) в концентрации 1 мг/мл. К раствору добавляли рекомбинантную легкую цепь энтеропептидазы человека (EC 3.4.21.9; 1 ед. фермента на 1 мг субстрата; ИБХ РАН) (949), гидролиз проводили при 37 °C в течение 16 ч.

В случае расщепления по метионину гибридный белок растворяли в 80% ТФУ и добавляли бромциан (5 М раствор в ацетонитриле) из расчета 100-кратный избыток на моль остатков метионина. Реакцию проводили в темноте при 24 °C в течение 16 ч. По обновленному протоколу к раствору очищенного гибридного белка добавляли HCl до конечного pH около 1, а затем нужное количесвто бромциана.

Разделение гидролизатов проводили с помощью ОФ-ВЭЖХ. Раствор после расщепления белка энтеропептидазой сразу наносили на колонку, а в случае использования бромциана его вначале высушивали на роторном испарителе и разводили водой. В большинстве случаев для наработки рекомбинантного продукта использовали полупрепаративные колонки с ко-

роткими хвостами (C_4 или C_5, 10×250 мм), для проверки чистоты использовали аналитические колонки с длинными хвостами (C_{18}, 4,6×250 мм).

2.4.15.5. Получение образцов для крио-ЭМ

Образцы получали в лаборатории А.И. Соболевского (Колумбийский университет, США). Конструкцию, кодирующую слитный белок GluA2Q-STZ, получали на основе вектора pEG BacMam (950) путем субклонирования генов GluA2Q-flip крысы и старгазина человека, укороченного до L207, и GT-линкера между ними. Кроме того, для контроля качества препарата методом FSEC (951) в С-концевой области слитного белка добавили eGFP, а для очистки с помощью IMAC включили His-таг. Эти элементы были отделены от GluA2Q-STZ сайтом гидролиза тромбина (LVPRGS).

Первичный (Passage 1, P1) и вторичный (P2) стоки бакуловируса получали по описанной процедуре (950). Вирусами P2, полученными в клетках Sf9 (GIBCO #12659017), заражали клетки HEK293S GnTI$^-$ (ATCC #CRL-3022) при 37 °C в атмосфере 5% CO_2. Через 12 ч после инфицирования добавляли 10 мМ бутирата натрия, температуру понижали до 30 °C. Через 72 ч после инфицирования клетки осаждали центрифугированием на низкой скорости (≈2000 *g*, 15 мин). Затем клетки промывали фосфатным буфером (pH 8,0) и осаждали (≈2000 *g*, 15 мин). Отмытые клетки лизировали с помощью ультразвука в растворе, содержащем 150 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 0,8 мкМ апротинин, 2 мкг/мл лейпептин, 2 мкМ пепстатин А и 1 мМ фенилметилсульфонилфторид. Лизат осветляли центрифугированием (≈4000 *g*, 15 мин), фракцию мембран отделяли ультрацентрифугированием (≈20 000 *g*, 40 мин). Мембраны механически гомогенизировали и солюбилизировали в течение 2 ч в 150 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 1% дигитонин. Осадок отделяли ультрацентрифугированием (≈20 000 *g*, 40 мин).

К растворенному материалу добавляли кобальтовую смолу TALON на 10–14 ч. Смолу промывали 10 объемами раствора, содержащего 150 мМ NaCl, 20 мМ Трис-HCl (pH 8,0), 0,05% дигитонин, 50 мМ имидазол. Элюцию проводили тем же раствором с добавлением 250 мМ имидазола. Полученный белок концентрировали и обрабатывали тромбином (1 : 200, w/w) в течение 1,5 ч при 22 °C. Гидролизат наносили на колонку для гель-фильтрации (Superose 6, Cytiva), уравновешенную тем же раствором без имидазола. Пиковые фракции объединяли и концентрировали до 4 мг/мл. Все этапы, если не указано иное, выполнялись при 4 °C.

2.4.16. Липидные везикулы и сферопласты

2.4.16.1. Приготовление липосом

Гигантские липосомы (GUV, giant unilamellar vesicles, гигантские моноламеллярные везикулы; диаметр 1000 нм) и крупные липосомы (LUV; диаметр 100 нм) получали из 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолина (ДОФХ), 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфо-rac-(1-глицерина) (ДОФГ) и смеси 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламина (ДОФЭ) и ДОФГ (7 : 3, w/w). ДОФХ, ДОФГ (30 мг) или смесь ДОФЭ / ДОФГ (21 мг / 9 мг) растворяли в 3 мл раствора хлороформ / метанол (2 : 1, v/v) в небольшой круглодонной колбе. Липидные пленки формировали с помощью вакуумного роторного испарителя RV 10 auto pro V (IKA-Werke, Германия) и лиофильной сушки в течение 12 ч. Высушенные липиды суспендировали в водном растворе, например в фосфатном буфере, содержащем 110 мМ NaCl и 50 мМ Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 (pH 7,5). Итоговая концентрация липидов обычно составляла 5 мМ. Образцы подвергали быстрой обработке ультразвуком и экструдировали через поликарбонатную мембрану с размером пор 1000 нм (Whatman, Cytiva; 30 раз при 25 °C) с использованием мини-экструдера (Avanti Polar Lipids) для получения гигантских липосом. Для получения крупных липосом проводили дополнительную экструзию через поликарбонатную мембрану Whatman с размером пор 100 нм. Малые липосомы (SUV; диаметр 15–50 нм) готовили путем обработки суспензии липидов ультразвуком.

2.4.16.2. Соосаждение с липосомами

Для исследования мембранотропной активности компонентов яда использовали метод соосаждения с липосомами. Цельные яды (1 мг) растворяли в 90 мкл 110 мМ NaCl и 50 мМ Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 (pH 7,5). Затем каждый образец делили на три части (по 30 мкл каждая). К одной части добавляли 120 мкл того же фосфатного буфера, а к двум другим частям добавляли 120 мкл суспензии липосом (GUV; диаметр 1000 нм) из ДОФЭ / ДОФГ или ДОФХ (концентрация липидов 5 мМ в том же фосфатном буфере). Полученные смеси (по 150 мкл) инкубировали 1 ч при 37 °C при постоянном перемешивании и центрифугировали (45 мин, 16 000 *g*). Для определения количества исследуемого компонента, остающегося в водной фазе, все пробы анализировали с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C_5 (4,6×250 мм).

2.4.16.3. Изотермы адсорбции

Титрование образцов полипептидов [20–40 мкМ в 50 мМ Na_2HPO_4 / NaH_2PO_4 (pH 7,4) или 10 мМ Трис-ацетат (pH 7,0)] липосомами (LUV или SUV) проводили при 30–35 °C. Для каждой концентрации липидов получали одномерный спектр ^{1}H ЯМР с подавлением сигнала воды (952) и задержкой 3 с. Концентрацию свободного полипептида в растворе C_f определя-

ли по интегральной интенсивности амидной области спектра (между ≈8,6 и 6,6 м.д.) или интенсивности отдельных сигналов. Интегрирование области без сигналов использовали для контроля качества коррекции базовой линии. Для корректировки значений C_f учитывали эффект разбавления. Полученные данные использовали для расчета коэффициента распределения K_p (по уравнению 1). Изотермы адсорбции анализировали с помощью уравнения Ленгмюра (уравнение 3). Концентрацию доступных для связывания липидов L* принимали равной 60% общей концентрации липидов (т.е. доле во внешнем монослое).

2.4.16.4. Получение сферопластов

Работы со сферопластами проводили в лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул и группе нанобиоинженерии ИБХ РАН. Клетки *E. coli* осаждали центрифугированием (6000 *g*, 3 мин, 8° С), ресуспендировали в растворе, содержащем 0,5 М сахарозу, 10 мМ Трис-HCl (pH 8), до $OD_{560} \approx 1$ и инкубировали с лизоцимом (10 мкг/мл) в течение 7 мин, тщательно перемешивали с равным объемом раствора, содержащего 0,6 мМ ЭДТА, 10 мМ Трис-HCl (pH 8), и инкубировали в течение 15 мин на льду. Полученные таким образом сферопласты [$(6 \pm 2) \times 10^{11}$ клеток/мл] стабилизировали 10 мМ $MgCl_2$, хранили при 4° С и использовали в течение 10 дней. Было показано, что эта процедура превращает >95% клеток в сферопласты с интактной плазматической мембраной.

2.4.17. Экспрессия генов ионных каналов и АМП в клетках эукариот

Гены ионных каналов клонировали в составе различных векторов, подходящих для экспрессии в соответствующих клетках и указанных в публикациях. В случае ооцитов чаще использовали вектор pGEMHE (834).

2.4.17.1. Экспрессия в ооцитах *X. laevis*

Ооциты отбирали из долей яичников анестезированных самок лягушки *X. laevis* на стадиях оогенеза V–VI в соответствии с (953). В ооциты вводили 4–50 нл мРНК в концентрации 1 нг/нл с помощью микроинжектора (Drummond Scientific, США). Затем ооциты инкубировали при температуре 16–18° С в растворе ND96, содержащем: 96 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 1,8 мМ $CaCl_2$, 2 мМ $MgCl_2$, 5 мМ HEPES (pH 7,4) с добавлением 50 мкг/мл сульфата гентамицина.

2.4.17.2. Экспрессия в клетках линии CHO

Клетки культивировали в питательной смеси Хэма F-12 (Ham's F-12 Nutrient Mixture; Gibco, Thermo Fisher Scientific), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone,

Cytiva), глутамин (1%) и гентамицин (100 мкг/мл; Thermo Fisher Scientific). Клетки выращивали в 12-луночных культуральных планшетах в увлажненной атмосфере 5% CO_2 при 37° С. За сутки до трансфекции клетки переносили в 12-луночные культуральные планшеты при плотности 1–5 × 10^5 клеток в 1 мл среды F-12 на лунку. Клетки CHO подвергали временной трансфекции векторами pIRES2-EGFP/P2X3, pIRES2-EGFP/P2X2 или pFUSE-mCherry/P2X2 путем замены ростовой среды в каждой лунке смесью для трансфекции, содержащей 1 мкг ДНК и 3 мкл Унифектина-56 (Unifect Group, Россия) в 1 мл бессывороточной F-12. Для совместной трансфекции использовали соответствующие плазмиды в соотношении 1 : 1. После 3–4 ч инкубации смесь для трансфекции заменяли обычной культуральной средой. Клетки анализировали через 24–72 ч после трансфекции. Клетки, экспрессирующие P2X2 или P2X3 рецепторы, идентифицировали по специфической флуоресценции mCherry или eGFP.

2.4.17.3. Экспрессия в клетках линий Neuro-2a и HEK293

Клетки культивировали в питательной среде Игла, модифицированной Дульбекко (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM; ПанЭко, Россия), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки (PAA Laboratories, Австрия). За день до трансфекции клетки Neuro-2a наносили на покровные стекла и помещали в чашки диаметром 35 мм с 2 мл среды Игла. Среда для трансфекции содержала кДНК α7 nAChR человека (3 мг/мл) и реагент для трансфекции Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific). Раствор, содержащий кДНК, заменяли средой для культивирования клеток через 6–8 ч. Протокол для экспрессии GluR в CHO-K1 и HEK293 был аналогичен. Для получения функционально активных гомомерных рецепторов GluA2 клетки трансфицировали совместно вектором, несущим ген человека *GRIA2* дикого типа (flip, Q в сайте Q/R), и вектором с геном вспомогательной субъединицы *CACNG2*.

2.4.17.4. Экспрессия АМП в клетках линии HEK293

Клетки культивировали в питательной среде DMEM (ПанЭко), содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, глутамин (2 мМ), пенициллин (60 мкг/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Трансфекцию проводили с использованием реагентов для трансфекции Lipofectamine 2000 и PolyFect (Qiagen). Плазмидную ДНК для трансфекции готовили с использованием набора EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

2.4.18. Препараты клеток и тканей животных

2.4.18.1. Нейроны головного мозга для изучения Ca^{2+} каналов

Животных умерщвляли декапитированием. Мозжечок и гиппокамп извлекали у соответственно 9–10-дневных или 14–15-дневных крыс в растворе следующего состава: 5 мМ

KCl, 120 мМ NaCl, 26 мМ $NaHCO_3$, 1 мМ $MgCl_2$ и 22 мМ глюкоза (pH 7,4). Ткани разрезали на фрагменты толщиной 200–400 мкм с помощью вибратома Vibroslice 752/M (Camden Instruments, Великобритания). Затем срезы инкубировали в течение 30 мин в не содержащем Ca^{2+} фосфатно-солевом буфере Дульбекко с добавлением 1 мМ $CaCl_2$, 2 мМ $MgCl_2$, 26 мМ $NaHCO_3$ и 30 мМ глюкозы в случае гиппокампа (pH 7,4). Растворы непрерывно насыщали газовой смесью 5% CO_2 / 95% O_2. Срезы переносили в такой же раствор с добавлением 2,4 мг/мл протеазы XXIII из *Aspergillus oryzae* и инкубировали 35 мин при 23° C. После обработки ферментом срезы промывали в тех же растворах без протеазы. Диссоциацию клеток проводили в растворе следующего состава: 5 мМ KCl, 150 мМ NaCl, 2 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, 20 мМ HEPES (pH 7,4) и 10 мМ глюкоза. Единичные клетки выделяли последовательным растиранием срезов несколькими отполированными пипетками с диаметром отверстий 0,1–0,3 мм.

2.4.18.2. Нейроны головного мозга для изучения GluR

Крыс анестезировали изофлураном и умерщвляли путем перерезания шейного отдела позвоночника. После декапитации мозг быстро извлекали из черепа и погружали в предварительно оксигенированный (5% CO_2 / 95% O_2) ледяной (2–4° C) раствор следующего состава: 124 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,24 мМ NaH_2PO_4, 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ $CaCl_2$, 25 мМ $NaHCO_3$ и 10 мМ глюкоза. Затем получали корональные срезы толщиной 300 мкм с помощью вибратома Vibroslice 752/M. Использовали срезы мозга, содержащие гиппокамп, дорзолатеральный стриатум и медиальную префронтальную (прелимбическую) кору. Перед проведением электрофизиологических исследований срезы инкубировали в течение как минимум 1 ч в искусственном растворе спинномозговой жидкости состава: 124 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,24 мМ NaH_2PO_4, 1 мМ $MgCl_2$, 2 мМ $CaCl_2$, 25 мМ $NaHCO_3$ и 10 мМ глюкоза — при 22–24° C. Нейроны выделяли из срезов, содержащих гиппокамп и полосатое тело, с помощью вибродиссоциации под визуальным контролем (954).

2.4.18.3. Чувствительные нейроны для пэтч-клампа

Нейроны выделяли из спинальных ганглиев 9–12-дневных крыс линии Wistar. Животных умерщвляли декапитированием, вскрывали спинномозговой канал, по бокам которого в межреберном пространстве находятся ганглии, которые аккуратно вынимали пинцетом и переносили в чашку Петри с внеклеточным раствором: 130 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2 мМ $CaCl_2$, 2 мМ $MgCl_2$, 20 мМ HEPES (pH 7,4). Затем ганглии переносили в раствор ферментов: 1 мг трипсина и 2 мг коллагеназы в 2 мл внеклеточного раствора при 35° C — и инкубировали в течение 10 мин, после чего тщательно промывали внеклеточным раствором. Ганглии диссо-

циировали на одиночные клетки с помощью тонких игл. Эксперименты начинали, когда клетки садились на дно чашки.

2.4.18.4. Культура нейронов спинальных ганглиев крыс для микроскопии

Животных умерщвляли путем медленной интоксикации CO_2, декапитировали и обескровливали. Спинальные ганглии L1–L6 выделяли, снимали оболочку, объединяли и инкубировали в модифицированной среде NBA [среда Neurobasal-A без фенолового красного, содержащая B-27 (Thermo Fisher Scientific), 500 мкМ L-глутамин, 25 мкМ L-глутаминовую кислоту (Sigma-Aldrich) и 100 ед./мл пенициллина / стрептомицина (Thermo Fisher Scientific)] с добавлением 10 ед./мл коллагеназы P (Sigma-Aldrich) в течение 1 ч при 37 °C в атмосфере 5% CO_2. Ганглии диссоциировали растиранием полированными пипетками Пастера. Обрывки аксонов и разрушенные клетки удаляли центрифугированием в растворе БСА. Жизнеспособные клетки ресуспендировали в модифицированной среде NBA, высевали на 96-луночные планшеты для визуализации (Greiner, Австрия), предварительно обработанные поли-L-орнитином (0,1 мг/мл, Sigma-Aldrich) и ламинином (5 мкг/мл, Thermo Fisher Scientific), и инкубировали в течение ночи при 37 °C в атмосфере 5% CO_2. Плотность нейронов составляла 1500 клеток/см^2.

2.4.18.5. Срезы языка крысы

Эксперименты выполняли в лаборатории нейроиммунных процессов ИБХ РАН. Срезы толщиной 10 мкм получали на криостате-микротоме HM 525 (MICROM International, Германия), фиксировали изопропанолом в течение 10 мин при 4 °C, промывали фосфатным буфером (pH 7,4) и дистиллированной водой, высушивали на воздухе в течение 1 ч (все дальнейшие процедуры проводили при комнатной температуре) и инкубировали в фосфатном буфере, содержащем 10 мг/мл БСА и 5 мл/л Твин 20, в течение 1 ч для предотвращения неспецифического связывания токсинов. Срезы предварительно инкубировали в течение 1–2 ч в растворе, содержащем 1 мг/мл БСА и 150 мМ NaCl в фосфатном буфере. К предметным стеклам добавляли α-BgTx-Alexa Fluor 555 до конечной концентрации 50 нМ и инкубировали их в течение 1–15 часов. Контрольные эксперименты проводили одновременно, добавляя 300-кратный избыток немеченого α-CbTx. Срезы промывали фосфатным буфером, фиксировали параформальдегидом в концентрации 40 мг/мл в течение 10 мин, снова промывали буфером и помещали на предметные стекла в глицерине с карбонатным буфером (pH 8,6).

2.4.19. Электрофизиология

2.4.19.1. Метод двухэлектродной фиксации потенциала

Эксперименты по методу двухэлектродной фиксации потенциала выполняли при комнатной температуре (18–24° C) с использованием усилителя GeneClamp 500B, системы сбора данных Digidata 1550 и программы pCLAMP актуальной версии (Molecular Devices). Многие эксперименты проводили в лаборатории Я. Титгата в Лёвенском университете (Бельгия).

Через 1–5 дней после инъекции РНК регистрировали токи (записывали изменения силы тока) через мембрану ооцитов *X. laevis*. Два внутриклеточных электрода (для записи потенциала и подведения тока) вытягивали из трубок из боросиликатного стекла с помощью P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller (Sutter Instrument, США) и заполняли 3 M KCl. Сопротивление обоих электродов поддерживали как можно более низким (<1 МОм). Внеклеточным раствором в экспериментальной ячейке (объем ≈ 200 мкл) служил ND96. Вызванные токи регистрировали с частотой 10–20 кГц и фильтровали на частоте 1–2 кГц в случае Na_v и регистрировали с частотой 1–2 кГц и фильтровали на частоте 0,5 кГц в случае K_v с использованием низкочастотного фильтра Бесселя четвертого порядка. Линейные токи утечки корректировали с помощью протокола P/4 или P/−4. В экспериментах использовали ооциты, амплитуда вызванных токов через мембрану которых была ≈0,5–5 мкА. Потенциал удерживания составлял −100 или −90 мВ.

В работе использовали ряд протоколов (их повторяли с интервалом 5–60 с):

(1) Записи вызванных токов проводили при деполяризации мембраны ооцитов до V_{max} (т.е. напряжения, соответствующего максимальному току через каналы), длящейся 100 мс в случае Na_v и 250–500 мс в случае K_v.

Постоянные времени быстрой инактивации Na_v (τ_h) измеряли непосредственно по фазе затухания записанного натриевого тока с использованием экспоненциального уравнения:

$$I(t) = I_{Na} \times e^{-\frac{t}{\tau_h}} + I_{NaP} \qquad (17),$$

где I_{Na} — амплитуда тока, зависящего от времени, t — время, а I_{NaP} — постоянный неинактивирующийся компонент тока (близкий к нулю в контроле).

Эффективность ингибирования инактивации Na_v под действием α-NaTx оценивали как отношение $\frac{I_{5\text{ мс}}^{\text{токсин}}}{I_{Na,max}^{\text{контроль}}}$ для $Na_v1.5$ и как $\frac{I_{30\text{ мс}}^{\text{токсин}}}{I_{Na,max}^{\text{контроль}}}$ — для всех других каналов, где $I_{5\text{ мс}}^{\text{токсин}}$ и $I_{30\text{ мс}}^{\text{токсин}}$ — сила тока через мембрану ооцита спустя 5 мс и 30 мс соответственно после тестового импульса при добавлении токсина, а $I_{Na,max}^{\text{контроль}}$ — максимальный ток (амплитуда) в отсутствие токсина.

(2) Вольт-амперную характеристику каналов получали путем ступенчатой деполяризации мембраны от удерживающего потенциала до 60 мВ с шагом 5 или 10 мВ.

Значения амплитуды калиевого тока I_K представляли как функцию потенциала и анализировали по уравнению Больцмана:

$$\frac{I_K}{I_{K,max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_{1/2,K} - V}{k}}} \quad (18),$$

где $I_{K,max}$ — максимальный I_K, $V_{1/2,K}$ — напряжение, при котором наблюдается половина максимального тока (потенциал полумаксимальной активации каналов), а k — коэффициент наклона.

Калиевую и натриевую проводимости (g_K и g_{Na}) рассчитывали по закону Ома:

$$g_K = \frac{I_K}{V - V_{K,rev}} \quad (19),$$

$$g_{Na} = \frac{I_{Na}}{V - V_{Na,rev}} \quad (20),$$

где I_K и I_{Na} представляют собой пиковый ток (амплитуду тока) при заданном тестовом потенциале V, а $V_{K,rev}$ и $V_{Na,rev}$ — потенциал реверсии для K^+ и Na^+ соответственно. Значения g_K и g_{Na} представляли как функцию потенциала по уравнению Больцмана:

$$\frac{g_{Na}}{g_{Na,max}} = \frac{1}{1 + e^{\frac{V_{1/2,Na} - V}{k_a}}} \quad (21),$$

где $g_{Na,max}$ — максимальная g_{Na}, $V_{1/2,Na}$ — напряжение, при котором наблюдается половина максимальной проводимости (потенциал полумаксимальной активации каналов), а k_a — коэффициент наклона.

(3) Для оценки воздействия токсинов на процесс стационарной инактивации Na_v применяли двухступенчатый протокол. Вначале подавали предварительные импульсы длительностью 100 мс в диапазоне от потенциала удерживания до 60 мВ с шагом 5 мВ, после которых следовали тестовые импульсы длительностью 50 мс до −30 или −10 мВ. Данные нормализовали по отношению к максимальной силе тока и представляли в виде функции потенциала предварительного импульса по уравнению Больцмана:

$$\frac{I_{Na}}{I_{Na,max}} = \frac{1 - I_0}{1 + e^{\frac{V_p - V_h}{k_i}}} + I_0 \quad (22),$$

где $I_{Na,max}$ — I_{Na} с максимальным абсолютным значением, I_0 — доля постоянного компонента, V_p — потенциал предварительного импульса, V_h — потенциал, при котором наблюдается половина максимальной инактивации, k_i — коэффициент наклона.

Зависимость медленной инактивации от потенциала оценивали с использованием 10-секундных предварительных импульсов. За ними подавали импульс до −100 мВ длительностью 20 мс для восстановления каналов, перешедших в состояние быстрой инактивации, и

тестовый импульс. Данные представляли аналогично в виде функции потенциала предварительного импульса (уравнение 22).

(4) Восстановление Na_v после инактивации оценивали по другому двухступенчатому протоколу. Вначале подавали предварительные импульсы длительностью 100 мс до −30 или −10 мВ, а затем — тестовые импульсы длительностью 50 мс того же потенциала. Импульсы перемежали реполяризацией до −90 мВ в течение постепенно увеличивающегося временного интервала (1–40 мс). Значения I_{Na}, полученные при тестовых импульсах, нормализовали по отношению к значениям $I_{Na,p}$, полученным после предварительных импульсов, и представляли как функцию длительности интервала между импульсами t_p по экспоненциальному уравнению:

$$\frac{I_{Na}}{I_{Na,p}} = (1 - I_0) \times (1 - e^{-\frac{t_p}{\tau_r}}) + I_0 \quad (23),$$

где τ_r — постоянная времени восстановления после инактивации.

(5) Чтобы оценить зависимость активности токсина Hm-3, ингибирующего Na_v, от потенциала, использовали третий вариант двухступенчатого протокола. Вначале подавали предварительные импульсы с увеличивающейся амплитудой (до +100 мВ) и/или продолжительностью (до 800 мс). Затем следовала реполяризация до удерживающего потенциала (20 мс), и подавали тестовый импульс до 0 мВ. Строили график зависимости нормализованного тока от длительности предварительного импульса. Значение I_{Na}, полученное без предварительного импульса после приложения 1 мкМ Hm-3 ($I_{пор}$), приняли равным 0. Значения I_{Na}, полученные после предварительных импульсов длительностью 700 мс ($I_{Na,700\ мс}$), принимали равными 1. Нормализованные значения тока представляли в виде функции длительности предварительного импульса:

$$\frac{I_{Na,t} - I_{пор}}{I_{Na,700\ мс} - I_{пор}} = f(t_p) \quad (24),$$

где $I_{Na,t}$ — значение I_{Na} при данной длительности предварительного импульса.

Для характеристики кинетики снятия ингибирующего действия токсина рассчитывали время t_p деполяризующего предымпульса, необходимое для восстановления 60% тока.

Для оценки зависимости «доза–ответ» данные анализировали по уравнению Хилла:

$$y = \frac{100}{1 + \left(\frac{EC_{50}}{C_{токсин}}\right)^h} \quad (25),$$

где y — амплитуда токсин-индуцированного эффекта в процентах, EC_{50} — полуэффективная концентрация токсина, $C_{токсин}$ — концентрация токсина, h — коэффициент Хилла.

В случае ингибиторов, в частности поровых блокаторов K^+ каналов, ответом служил блок ионного тока, поэтому в уравнение Хилла принимало вид:

$$y = \frac{100}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{C_{токсин}}\right)^{h}} \quad (26),$$

где вместо EC_{50} стоит значение IC_{50} — концентрация полумаксимального ингибирования.

В уравнениях 25 и 26 строго вместо $C_{токсин}$ должна стоять [токсин], т.е. равновесная концентрация свободного токсина. Однако если общая концентрация токсина известна, то концентрацию свободного сложно измерить. А поскольку в наших условиях заведомо $C_{токсин} >> C_{канал}$ (диапазон используемых концентраций токсинов $>10^{-12}$ М, а «концентрация» каналов $\approx 10^{-14}$ М: уровень экспрессии такой, что в мембране ооцита содержится порядка 10^6 каналов — это следует из сравнения наблюдаемых токов с токами, регистрируемыми через одиночные каналы, объем ячейки ≈ 200 мкл), то доля связанного токсина пренебрежимо мала, $C_{токсин} \approx$ [токсин], и в уравнениях можно использовать $C_{токсин}$.

2.4.19.2. Измерение ω-токов

Омывающий раствор содержал либо 120 мМ метансульфонат натрия, 1,8 мМ $CaSO_4$ и 10 мМ HEPES (pH 7,4), либо 50% метансульфоната натрия были замещены сульфатом гуанидина. Поскольку амплитуда ω-токов (I_{GP}) на порядки меньше α-токов (I_{Na}), регистрацию ω-токов проводили в условиях перфузии ооцитов 1 мкМ ТТХ для блокирования α-токов. Кроме того, в данном случае использовали ооциты с высоким уровнем экспрессии Na_v, амплитуда вызванных α-токов была >10 мкА. Средний ток в течение последних 100 мс импульсов длительностью 300 мс в диапазоне от −140 мВ до +50 мВ с шагом 5 мВ представляли в зависимости от потенциала. Токи утечки оценивали путем линейной аппроксимации данных зависимости тока от напряжения в диапазоне от 10 мВ до 30 мВ. Замена Na^+ на смесь Na^+ и гуанидина не влияла на наклон этой прямой. Все данные для I_{GP} представлены с вычетом тока утечки, за исключением каналов p.R225G. Для них присутствие гуанидина влияло на амплитуду тока при всех потенциалах; данные представлены без вычета тока утечки.

2.4.19.3. Метод локальной фиксации потенциала

Метод пэтч-кламп использовали в конфигурации целой клетки (whole-cell patch clamp). При этом детали различались — в зависимости от объекта и лаборатории, в которой выполняли эксперимент. Пэтч-пипетки вытягивали из трубок из боросиликатного стекла с помощью P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller. Пипетки имели сопротивление 2–5 МОм при заполнении внутриклеточным раствором. Эксперименты проводили при комнатной температуре.

Воздействие компонентов яда паукообразных на Ca^{2+} каналы и P2X рецепторы изучали в лаборатории О.А. Крышталя (Институт физиологии имени А.А. Богомольца Национальной академии наук Украины). Измерения проводили с применением подхода быстрого приложения веществ (“concentration clamp”), разработанного Крышталем и Пидопличко (955), при помощи установки «прыгающий столик» (Pharma Robot, Украина).

Токи через Ca_v регистрировали с использованием усилителя модели 2400 (A-M Systems, США), подключенного к плате LabMaster DMA (100 кГц; Scientific Solutions, США), и анализировали с помощью программы для «прыгающего столика» (Pharma Robot). Токи регистрировали с частотой 7,1 кГц и фильтровали на частоте 3 кГц. Внутриклеточный раствор содержал: 40 мМ хлорид ТЭА, 5 мМ $MgCl_2$, 70 мМ Трис-фосфат, 20 мМ Трис-HCl, 5 мМ этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА), 5 мМ АТФ и 0,5 мМ ГТФ (pH 7,3). Диффузионные или жидкостные потенциалы компенсировали. После разрыва мембраны последовательное сопротивление компенсировали. Использовали только клетки с незначительными токами утечки (<50 пА), поэтому из записей токов их не вычитали. Токи, опосредованные каналами HVA-типа в клетках Пуркинье, измеряли при удерживающем потенциале −70 мВ, чтобы гарантировать полную инактивацию каналов LVA-типа (956). В этих экспериментальных условиях ω-Aga IVA полностью блокировал общий ток (539). Чтобы исключить Ca^{2+}-зависимую инактивацию, в качестве носителя заряда использовали Ba^{2+}. Внешний раствор содержал: 2 мМ $BaCl_2$, 2 мМ $MgCl_2$, 20 мМ хлорид ТЭА, 100 мМ хлорид холина и 20 мМ Трис-HCl (pH 7,4). Нейроны стимулировали каждые 5 с импульсами длительностью 50 мс с шагом 5 мВ.

Кальциевые токи в пирамидных нейронах гиппокампа из области CA3–CA1 измеряли при удерживающем потенциале −100 мВ. Токи вызывали ступенчатой деполяризацией до −10 мВ. В этих экспериментальных условиях активировались токи, опосредованные Ca^{2+} каналами L, P/Q, N, R, и T-типа (957, 958). Внешний раствор содержал: 10 мМ $BaCl_2$, 2 мМ $MgCl_2$, 20 мМ хлорид ТЭА, 100 мМ хлорид холина и 20 мМ Трис-HCl (pH 7,4).

Кинетика активации кальциевого тока описывалась моноэкспоненциальной функцией с постоянной времени τ_{con} в контроле и двойной экспоненциальной функцией при действии токсина ω-Lsp-IA:

$$I(t) = I_{fast} \times \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{fast}}}\right) + I_{slow} \times \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{slow}}}\right) \qquad (27),$$

где I_{fast} и I_{slow} — амплитуды компонентов тока с быстрой и медленной активацией, а τ_{fast} и τ_{slow} — постоянные времени быстрой и медленной активации.

Токи, опосредуемые P2X рецепторами в чувствительных нейронах спинальных ганглиев, измеряли при удерживающем потенциале −60 мВ. Внутриклеточный раствор содержал:

120 мМ CsF, 10 мМ Трис-HCl (pH 7,2). В качестве агонистов использовали АТФ и ЦТФ. Ток с быстрой фазой нарастания ($\tau \approx 10$ мс) и быстрой фазой спада ($\tau_1 \approx 30$ мс, $\tau_2 \leq 500$ мс) соответствует току, опосредованному P2X3 рецепторами. Время активации при использовании обоих агонистов составляет 2–4 мс. Время десенситизации P2X3 рецепторов при использовании обоих агонистов составляет 20–100 мс. Время выхода из десенситизации сильно зависит от агониста и составляет 30 мин для АТФ и 2 мин для ЦТФ. При использовании ЦТФ его прикладывали раз в 3 мин в насыщающей концентрации (100 мкМ).

Воздействие компонентов яда паукообразных на P2X рецепторы изучали также в лаборатории С.С. Колесникова (Институт биофизики клетки РАН). В данном случае использовали как обычную конфигурацию целой клетки (whole-cell patch clamp), так и ее вариацию — конфигурацию с перфорацией клеток (perforated patch clamp) под действием амфотерецина В (400 мкг/мл), который добавляли в регистрирующую пипетку. Ионные токи, опосредованные P2X рецепторами в условиях экспрессии в клетках CHO, регистрировали с использованием усилителя Axopatch 200B, системы сбора данных Digidata 1440A и программы pCLAMP актуальной версии (Molecular Devices). Токи регистрировали и фильтровали на частоте 2 кГц. Внутриклеточный раствор содержал: 140 мМ CsCl, 1 мМ Mg-АТФ, 10 мМ бис-аминофенилоксиэтантетрауксусная кислота (BAPTA) и 10 мМ HEPES (pH 7,2) или 140 мМ CsCl, 1 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ ЭГТА и 10 мМ HEPES (pH 7,3). Такие растворы были выбраны для подавления эндогенных K^+ каналов и Ca^{2+}-зависимых каналов. Потенциал фиксировали при небольших значениях, обычно при −30 мВ, что повышало стабильность препаратов. Чтобы свести к минимуму вариабельность клеточных ответов в течение длительных записей (40–60 мин), последовательное сопротивление и емкость клетки проверяли и при необходимости компенсировали перед каждым приложением АТФ / ЦТФ. Внешний раствор содержал: 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 1 мМ $CaCl_2$ и 10 мМ HEPES (pH 7,4). Его подавали с помощью гравитационной перфузионной системы, которая позволяла осуществлять локальный обмен раствора вокруг клетки в течение 200 мс и обеспечивала перфузию всей камеры со скоростью ≈ 0,1 мл/с. ЦТФ вызывал более воспроизводимые ответы, чем АТФ, поэтому обычно использовался первый.

Активность аргиопина на GluR изучали в лаборатории А.И. Соболевского. Ионные токи, опосредованные GluR в условиях экспрессии в клетках HEK293, регистрировали с использованием оборудования как указано в предыдущем абзаце, при удерживающем потенциале −60 мВ. Токи регистрировали с частотой 10 кГц и фильтровали на частоте 5 кГц. Внутриклеточный раствор содержал: 150 мМ CsF, 10 мМ NaCl, 10 мМ ЭГТА, 20 мМ HEPES (pH 7,3). Внешний раствор содержал: 140 мМ NaCl, 2,4 мМ KCl, 4 мМ $CaCl_2$, 4 мМ $MgCl_2$, 10 мМ глюкоза и 10 мМ HEPES (pH 7,3); внеклеточный активирующий раствор содержал 3 мМ

L-глутамат и 7 мМ NaCl. Быструю смену раствора осуществляли с помощью двухканальной тета-пипетки, управляемой пьезоэлектрическим транслятором.

Активность ABSP на GluR изучали в лаборатории биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН. Нейроны идентифицировали по размеру и форме. Для фармакологической идентификации нейронов использовали IEM-1460. Токи, индуцированные каинатом через AMPA-рецепторы в пирамидных нейронах гиппокампа из области CA1, были нечувствительны к 1 мкМ IEM-1460. Напротив, в гигантских холинергических интернейронах полосатого тела наблюдали сильное ингибирование (1 мкМ IEM-1460 вызывал ≈50% блок), что подтверждает наличие Ca^{2+}-проницаемых GluR (959). Ионные токи регистрировали с использованием усилителя EPC 10 (HEKA Elektronik, Германия) при удерживающем потенциале −70 мВ. Токи регистрировали с частотой 20 кГц и фильтровали на частоте 10 кГц. Внутриклеточный раствор содержал: 100 мМ CsF, 40 мМ CsCl, 5 мМ NaCl, 0,5 мМ $CaCl_2$, 5 мМ ЭГТА и 10 мМ HEPES (pH 7,2). Внешний раствор содержал: 143 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 2,5 мМ $CaCl_2$, 10 мМ глюкоза и 10 HEPES (pH 7,4). Для активации AMPA-рецепторов использовался 100 мкМ каинат, а для активации NMDA-рецепторов — 100 мкМ NMDA и 10 мкМ глицин. Агонисты и изучаемые соединения прикладывали с использованием системы RSC-200 (BioLogic, Франция), обеспечивающей время замены раствора 100 мс. Токи, индуцированные каинатом в клетках CHO-K1, регистрировали аналогично с незначительными изменениями.

2.4.19.4. Светочувствительность эффектов на GluR

Освещение во время электрофизиологических записей обеспечивали монохроматором (OptoScan, Cairn Research, Великобритания), оснащенным ксеноновой дуговой лампой мощностью 150 Вт (XBO 150 W/CR OFR, Osram, Германия) и подключенным к микроскопу через световод. Освещение подавали на всё поле зрения через объектив 40×. Плотность мощности, измеренная на задней апертуре объектива, составляла 2,5 мВт/см^2 при 410 нм и 3,3 мВт/см^2 при 450 нм (измеритель мощности модели 843-R, оснащенный детектором 818-UV/DB; Newport, США). В качестве альтернативного источника света с длиной волны 450 нм использовали лазерный диод (100 мВт/см^2 на задней апертуре объектива).

2.4.20. Флуоресцентная микроскопия

Обычно препараты клеток и тканей анализировали с использованием эпифлуоресцентного микроскопа IX71 с охлаждаемой камерой с ПЗС-матрицей XM10 (Olympus) и программного обеспечения CellA Imaging. В некоторых экспериментах использовали другое оборудование, указанное в соответствующих разделах.

2.4.21. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

2.4.21.1. Лизис бактерий

Измерения проводились с использованием инвертированного конфокального микроскопа SP2 (Leica Microsystems, Германия) с водоиммерсионным объективом (63×, NA 1,2; HCX PL APO). Типичный размер вокселя: 0,15 × 0,15 × 0,9 мкм. Длины волн возбуждения: 561 нм для PI и 488 нм для 2′,7′-бис(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеина (BCECF). Мощность лазера составляла 3–10 мкВт на образце. Флуоресценция регистрировалась в диапазоне 650–700 нм для PI и 500–550 нм для BCECF.

Клетки *S. aureus* предварительно инкубировали с ацетоксиметиловым эфиром BCECF (10 мкМ) в сбалансированном солевом растворе Хэнкса в течение 30 мин при 37 °C. Затем добавляли OtTx1a-AMP (1,25 мкМ) и PI (15 мкМ), инкубировали 5–10 мин в бульоне Мюллера-Хинтона, после чего осторожно центрифугировали (1600 *g*, 5 мин, комнатная температура) и исследовали с помощью КЛСМ. Контрольные клетки подвергали тем же процедурам, но без добавления пептида.

2.4.21.2. Количественный анализ связывания со сферопластами

Для экспериментов по связыванию сферопласты разбавляли буфером, содержащим 0,25 мМ сахарозу, 0,3 мМ ЭДТА, 4 мМ KCl, 50 мМ NaCl, 10 мМ $MgCl_2$ и 0,1% БСА в 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5) до концентрации 1000 шт./мкл. Сферопласты инкубировали с флуоресцентно-меченым AgTx-2-TAMRA (7,3 нМ) в присутствии тестируемых образцов (цельные яды, фракции или очищенные компоненты). Немеченый AgTx-2 (10 нМ) или чистый буфер добавляли к сферопластам вместо тест-образцов в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно.

Для конкурентного связывания сферопласты, содержащие KcsA-K_v, инкубировали с меченым AgTx-2 (9 нМ) и увеличивающимися концентрациями других лигандов K_v. Реакционные смеси инкубировали в течение 90 мин при непрерывном перемешивании и комнатной температуре, затем помещали в 12-луночную силиконовую камеру flexiPERM (Perbio Science, Бельгия), прикрепленную к покровному стеклу, и центрифугировали в течение 6 мин при 200 *g*.

Получение флуоресцентных изображений выполняли с использованием инвертированного конфокального микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия) с масляным иммерсионным объективом α Plan-Apochromat (63×, NA 1,46). Флуоресценцию меченого AgTx-2 возбуждали гелий-неоновым лазером (543,5 нм, 12 мкВт), излучение регистрировали в диапазоне 550–685 нм. Количественный анализ связывания меченого AgTx-2 со сферопластами проводили с латеральным разрешением ≈ 0,25 мкм и аксиальным разрешением ≈ 1,5 мкм; все

параметры измерений, которые могли влиять на интенсивность детектируемого сигнала, были фиксированы. Программное обеспечение ImageJ использовали для идентификации сферопластов и оценки средней интенсивности сигнала флуоресценции от каждого сферопласта (I_f). Затем рассчитывали среднее значение I_f от 150–200 сферопластов (I_{av}) и среднеквадратическое отклонение (SD). Все эксперименты повторяли два-три раза.

Чтобы упростить количественный анализ, титрование рецепторов (каналов) лигандом (токсином) проводили в условиях, когда $C_{токсин} >> C_{канал}$. Кривые связывания не зависели от концентрации сферопластов (т.е. каналов KcsA-K_v) в диапазоне от 3000 до 30 000 шт./мкл и, следовательно, соответствовали условию $C_{токсин} >> C_{канал}$. В этом случае можно применить уравнение (приняв $h = 1$):

$$I_{av} = \frac{I_{sat}}{1 + \frac{K_d}{C_{AgTx-2}}} \quad (28),$$

где $C_{AgTx\text{-}2}$ — концентрация меченого AgTx-2, а I_{sat} равно значению I_{av} на плато в насыщении. См. аналогичные рассуждения выше к уравнениям 25 и 26. Значение K_d для комплекса между меченым AgTx-2 и KcsA-Kv1.1 составило 3,4 ± 0,9 нМ.

Конкурентное вытеснение меченого AgTx-2 лигандами K_v проводили в условиях, когда концентрация свободного меченого AgTx-2 была намного выше, чем концентрация связанного лиганда. Данные анализировали с помощью уравнения Хилла, которое в данном случае принимало вид ($h = 1$):

$$I_{av} = \frac{I_m}{1 + \frac{C}{IC_{50}}} \quad (29),$$

где C — концентрация добавленного конкурентного лиганда; I_m соответствует I_{av} при $C = 0$, а IC_{50} — концентрация лиганда, которая вытесняет 50% меченого AgTx-2 из комплекса с KcsA-K_v. Значения IC_{50} использовали для расчета кажущихся констант диссоциации (K_{ap}) конкурентных лигандов по уравнению Ченга-Прусова:

$$K_{ap} = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{C_{AgTx-2}}{K_d}} \quad (30).$$

2.4.22. Многопараметрический анализ чувствительных нейронов

Метод одновременного многопараметрического анализа (англ. high-content screening, HCS) чувствительных нейронов с использованием микроскопии (HCS-микроскопии) разрабатывается Т. Хухо (Университетская больница Кёльна, Германия).

2.4.22.1. Стимуляция выделенных нейронов

Нейроны спинальных ганглиев стимулировали через 24 ч после выделения. Исследуемые соединения вначале растворяли в фосфатном буфере, нагревали до 37 °C, смешивали

со средой из культуральных планшетов, после чего переносили в тестовые лунки, а стимулированные клетки помещали обратно в инкубатор. Клетки фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре, добавляя параформальдегид до конечной концентрации 4%.

2.4.22.2. Иммунофлуоресцентное окрашивание

Фиксированные клетки дважды промывали фосфатным буфером. После блокирования и пермеабилизации [2% нормальная козья сыворотка (#005-000-121, Jackson ImmunoResearch Laboratories, США), 1% БСА, 0,1% Тритон X-100, 0,05% Твин 20] в течение 1 ч при комнатной температуре образцы инкубировали с первичными антителами (против UCHL1, а также pRII и pERK1/2), разведенными в фосфатном буфере с 1% БСА при 4 °C в течение ночи. После трех промывок фосфатным буфером (10 мин) образцы инкубировали со вторичными антителами, меченными флуоресцентным красителем (1 : 1000), и 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI; 50 нг/мл) в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте. После трех заключительных промывок лунки 96-луночных планшетов заполняли фосфатным буфером, закрывали, образцы хранили при 4 °C до сканирования.

2.4.22.3. Количественная микроскопия

Окрашенные клетки в 96-луночных планшетах сканировали с использованием Cellomics ArrayScan VTI HCS Reader (Thermo Fisher Scientific). Изображения размером 512 × 512 пикселей получали с помощью объектива 10× и анализировали с использованием пакета программного обеспечения Cellomics HCS Studio. Изображения образцов, окрашенных на UCHL1, корректировали по фону (низкочастотная фильтрация), преобразовывали в бинарные маски изображений (фиксированный порог) и сегментировали (геометрический метод), а нейроны идентифицировали по параметрам выбора объекта: размер: 120–6000 мкм^2; округлость: $\frac{\text{периметр}^2}{4\pi \times \text{площадь}} = 1 - 2$; соотношение длины к ширине: 1–2; средняя интенсивность: 250–2000; общая интенсивность: $6 \times 10^4 – 5 \times 10^6$. Маски изображений затем использовали для количественной оценки сигналов в других каналах. Средние значения трех независимых измерений нормализовали вычитанием среднего значения фона во всех контрольных лунках. Компенсацию перекрестных сигналов осуществляли согласно (960). Графики плотности вероятности получали с использованием пакета R. Выборку субпопуляций осуществляли либо путем установки порогов в локальных минимумах графиков плотности вероятности, либо с использованием пороговой обработки.

2.4.23. Криоэлектронная микроскопия

Эксперименты выполняли в лаборатории А.И. Соболевского (Колумбийский университет, США).

2.4.23.1. Подготовка образцов и сбор данных

Сетки C-flat CF-1.2/1.3-2Au (200 меш; Protochips, США) покрывали золотом с помощью испарителя AUTO 306 (BOC Edwards, Великобритания). Углерод удаляли с помощью плазменной обработки Ar / O_2 с использованием системы Solarus 950 (Gatan, США), в результате чего получали перфорированные сетки (961). Для придания гидрофильности перед нанесением образца поверхность сетки обрабатывали плазмой H_2 / O_2. Гидратированные сетки замораживали с использованием прибора Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific). Раствор GluA2Q-STZ (4 мг/мл) инкубировали в течение 15 мин с добавлением 100 мМ циклотиазида, затем 3 мкл быстро смешивали с 0,5 мкл 700 мМ глутамата, 3 мкл смеси переносили на сетку. Блокаторы (1 мМ IEM-1460, 100 мкМ NASPM или 10 мкМ аргиопина) добавляли на этапе инкубации с циклотиазидом.

Все данные получали на просвечивающем электронном криомикроскопе Titan Krios (Thermo Fisher Scientific), работающем при напряжении 300 кВ, с использованием системы Leginon (923) с пост-GIF квантовым энергетическим фильтром (щель 20 эВ) и камерой с прямой детекцией электронов K2 Summit (Gatan) в режиме подсчета, работающей с размером пикселя 1,08 Å. Использовали дозу 8 электронов на физический пиксель в секунду на 40 кадрах (0,2 мс на кадр), в диапазоне расфокусировки от −1 до −3 мкм. В общей сложности получили 11 695 микрофотографий: 3556 для IEM-1460, 2339 для NASPM и 5800 для аргиопина.

2.4.23.2. Обработка изображений

Коррекцию движения и фильтрацию экспозиции выполняли в MotionCor2 (924). Оценку функции передачи контраста выполняли на микрофотографиях без фильтрации экспозиции с помощью gCTF (925), а всю последующую обработку проводили с использованием RELION-2 (926). ≈1000 частиц выбирали вручную для создания 2D-усредненных классов, которые использовались в качестве шаблонов при автоматическом выборе, в результате которого получили 307 701 частиц для комплекса с IEM-1460, 267 536 — для NASPM и 399 604 — для аргиопина. Первоначальный раунд трехмерной классификации (параметр T = 4) без симметрии и с использованием плотности GluA2Q-STZ (EMDB ID: EMD-8823) в качестве стартового шаблона привел к отбору 80 394 частиц для дальнейшей обработки в случае IEM-1460, 105 474 — для NASPM и 175 738 — для аргиопина. Следующий раунд 3D-классификации (T = 10) с тем же шаблоном привел к отбору 30 849 частиц с C_2-симметрией в

случае IEM-1460, 39 835 — для NASPM и 82 131 — для аргиопина. Локальное разрешение рассчитывали с помощью программы blocres (927). На последнем этапе использовали специальную процедуру для повышения разрешения в области ионного канала, описанную в (944) и включавшую вычитание сигнала дигитонина.

2.4.23.3. Построение моделей

Сначала структуру открытого состояния GluA2-STZ (PDB ID: 5WEO) вписали в плотность полноразмерного GluA2Q-STZ. Подстройку конформации боковых цепей проводили в программе Coot (928). Для трансмембранных частей использовали плотности с вычитанием сигнала мицеллы. Модель уточняли с использованием программы PHENIX (929). Итоговую модель GluA2Q-STZ вписывали в каждую реконструкцию для комплексов с блокаторами, боковые цепи корректировали по мере необходимости. Блокаторы размещали так, чтобы их головка вписывалась в плотность во внутренней полости канала.

2.4.24. Радиолигандный анализ

Эксперименты проводил И.Е. Кашеверов в изотопном блоке ИБХ РАН. Использовали препарат ^{125}I-α-BgTx (500 Ки/ммоль). Тестируемые соединения в различных концентрациях предварительно инкубировали в течение 2,5 ч при комнатной температуре с ацетилхолинсвязывающим белком (AChBP) прудовика *Lymnaea stagnalis* (при конечной концентрации 2,5 нМ), клетками GH_4C_1 (0,4 нМ сайтов связывания) или мембранами электрических органов ската Калифорнийского гнюса *Tetronarce californica* (0,5 нМ сайтов связывания токсина) в 50 мкл буферного «связывающего» раствора, содержащего: 1 мг/мл БСА, 20 мМ Трис-HCl (pH 7,5). После этого к AChBP, клеткам или мембранам добавляли ^{125}I-α-BgTx до конечной концентрации 0,5 нМ, смеси инкубировали в течение 5 мин. Связывание останавливали быстрой фильтрацией на двойных фильтрах DE81 (Whatman), предварительно замоченных в том же связывающем растворе (в случае AChBP), или на фильтрах GF/C (Whatman), предварительно замоченных в 0,25% полиэтиленимине (в случае клеток или мембран). Несвязанную радиоактивность удаляли с фильтров промывкой (три раза по 3 мл) связывающим раствором. Фильтры помещали в гамма-счетчик Wallac Wizard 1470 Gamma Counter (PerkinElmer, США) и получали значения количества импульсов в минуту (counts per minute, cpm). Неспецифическое связывание определяли во всех случаях путем предварительной инкубации образцов в течение 2,5 ч с 10 мкМ α-кобратоксина (α-CbTx). Для оценки зависимости «доза–ответ» данные анализировали по уравнению Хилла (уравнение 25), которое в данном случае принимало вид:

$$y = \frac{100}{1 + \left(\frac{C_{токсин}}{IC_{50}}\right)^{h}} \quad (31),$$

поскольку за ответ (y) принимали относительный счет в образце по сравнению с положительным контролем (максимальный счет).

2.4.25. Антимикробная активность

Мы учитывали методические рекомендации, приведенные в (962). Вначале получали ночную культуру исследуемых бактерий, которую затем разбавляли в 200 раз и выращивали (≈5 ч при 37° C) до экспоненциальной фазы (OD_{600} = 0,4–0,8). Эту культуру разбавляли в среде LB в 100 000 раз, полученную суспензию (≈10^4–10^5 колониеобразующих единиц в 1 мл) использовали в эксперименте.

Очищенные высушенные тестируемые вещества растворяли в воде в высокой стартовой концентрации (обычно ≈200 мкМ) и готовили восемь серийных разведений (×2; т.е. до ≈0,8 мкМ). В лунках стерильного плоскодонного 96-луночного планшета (мы использовали BD Falcon microplates; BD Biosciences, США) смешивали 90 мкл бактериальной суспензии с 10 мкл серийных разведений тестируемого вещества. В качестве отрицательного контроля (беспрепятственный рост бактерий) в лунки с 90 мкл бактериальной суспензии добавляли 10 мкл воды. Лунки, заполненные 100 мкл среды LB, использовали для контроля стерильности среды. Все соединения тестировали как минимум в трех повторах. Все процедуры выполняли в стерильных условиях, т.е. в ламинарном шкафу. Планшеты запечатывали и инкубировали при 37° C в шейкере-инкубаторе (при 220 об./мин) в течение ночи. Измеряли OD_{600} в каждой лунке с помощью планшетного ридера (мы использовали iMark microplate absorbance reader; Bio-Rad Laboratories). Лунки контроля стерильности должны оставаться прозрачными. Об антимикробной активности свидетельствуют прозрачные тестовые лунки.

Результаты обычно получаются в виде «да-нет»; активность веществ, дающая прозрачные лунки, может быть обнаружена и без использования планшетного ридера. Результаты представляли в виде интервала (A–B), где A — наибольшая концентрация исследуемого соединения, при которой наблюдали рост бактерий, а B — наименьшая концентрация, при которой рост не наблюдали (МИК).

2.4.26. Активность против хламидий

Эксперименты на хламидиях проводили в лаборатории генной инженерии ФНКЦ физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА. *Ch. trachomatis* культивировали в клетках McCoy, выращенных в питательной среде Игла, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки, глюкозу (0,5%), ванкомицин (25 мкг/мл), гентамицин (25

мкг/мл) и амфотерицин B (2,5 мкг/мл). Инфицирование монослоя клеток McCoy проводили путем инокуляции, в результате чего в поле зрения микроскопа при 400-кратном увеличении за 48 ч образовывались 20–50 включений. Инфицированные клетки центрифугировали при 1700 *g* в течение 1 ч и инкубировали в течение 2 ч при 37° C. Среду дважды меняли для промывки инфицированного монослоя, который затем инкубировали при 37° C. Включения выявляли реакцией прямой иммунофлуоресценции с конъюгированными с флуоресцеином моноклональными антителами ХлаМоноСкрин-2. Для постановки реакции клетки фиксировали 4% параформальдегидом и обрабатывали антителами. Титр инфекционного потомства (второй пассаж) определяли путем инфицирования стерильного монослоя клеток HEK293 с использованием материала, полученного через 72 ч после первичного инфицирования клеточной культуры. Для этого клетки разрушали с использованием стеклянных шариков, тщательно перемешивали и центрифугировали 5 мин при 1300 *g*. Затем делали серию последовательных разведений супернатанта, которыми заражали новый монослой. Через 24 ч хламидии подсчитывали как единицы, образующие включения (ВОЕ). Элементарные тельца *Ch. trachomatis* очищали с помощью ультрацентрифугирования в градиенте плотности ренографина (963), получая титр ≈ 10^6 ВОЕ.

Клетки HEK293 высевали в 24-луночные планшеты и выращивали в течение ночи. Клетки инокулировали элементарными тельцами *Ch. trachomatis*, центрифугировали при 900 *g* в течение 1 ч, инкубировали 1,5 ч при 37° C. Затем надосадочную жидкость отбирали, заменяя свежей ростовой средой, содержащей 5% фетальной телячьей сыворотки. Инфицированные клетки инкубировали 48 ч при 37° C. Включения выявляли с помощью ХлаМоноСкрин-2 (см. выше), клетки также окрашивали флуоресцентным красителем голубым Эванса. Хламидийные включения ярко-зеленого цвета наблюдали на фоне красной цитоплазмы. Не менее 50 полей зрения на образец анализировали с помощью конфокального микроскопа C1 (Nikon, Япония). Хламидии подсчитывали в ВОЕ. Площадь хламидийных включений измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ.

2.4.27. Анализ цитотоксичности

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью набора LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells (Thermo Fisher Scientific). Клетки промывали бессывороточной средой и инкубировали 20 мин с кальцеином-АМ (ацетоксиметиловый эфир кальцеина; 2 мкМ) и гомодимером этидия-1 (4 мкМ). Образцы возбуждали аргоновым лазером с длиной волны 488 нм; излучение кальцеина-АМ и гомодимера этидия-1 регистрировали через полосовой фильтр (535/50 нм) и длиннопроходящий фильтр (610 нм) соответственно. Жизнеспособность клеток рассчитывали как отношение количества клеток, окрашенных

кальцеином-АМ (зеленая флуоресценция), ко всем окрашенным клеткам (зеленая и красная флуоресценция).

2.4.28. Анализ токсичности на насекомых

Хроматографические фракции, а также очищенные токсины анализировали путем инъекции личинкам мясной мухи *S. carnaria* (масса ≈ 50–60 мг). Образцы растворяли в физиологическом растворе: 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 5 мМ $CaCl_2$, 1 мМ $MgCl_2$, 4 мМ $NaHCO_3$, 5 мМ HEPES (pH 7,2), и 2 мкл вводили в четвертый сегмент личинки с помощью микрошприца (мы использовали шприцы объемом 10 мкл; Hamilton, Швейцария). Для каждой исследуемой дозы использовали группы из 3–5 особей. Контрольная группа получала инъекцию чистого физиологического раствора. Паралитические и летальные эффекты наблюдали в течение 24 ч после инъекции, после чего рассчитывали значения $ЛД_{50}$.

2.4.29. Анализ токсичности на мышах

Вещества растворяли в 0,9% NaCl и вводили мышам в объеме 5 мл/кг во внутрилопаточную область. Чтобы свести к минимуму использование препарата, применяли поэтапную процедуру, при которой тестируемую дозу вводили группе из трех мышей. На основании наблюдаемой смертности следующую тестовую дозу выбирали выше, ниже или равной текущей. Таким образом, для получения оценки $ЛД_{50}$ использовали в общей сложности 24 особи. Данные о летальности преобразовывали в пробиты и анализировали по методу Финни.

2.4.30. Болевые тесты

Тест отдергивания хвоста проводили в лаборатории фенотипирования животных Института медико-биологических проблем РАН. Тесты с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ), «уксусные корчи», формалиновый тест и исследования на животных в модели остеоартрита проводили в отделе биологических испытаний Филиала ИБХ РАН (Пущино).

2.4.30.1. Тест отдергивания хвоста

Вещества вводили внутрикожно на расстоянии 2–3 см от кончика хвоста с помощью иглы G31 и микрошприца в объеме 100 мкл/кг (2–3 мкл на мышь) в различных дозах. В контрольных экспериментах вводили 0,9% NaCl. Болевую чувствительность измеряли до (0), а также через 1, 5, 15, 30, 45, 60 и 90 мин после введения образца. Мышей осторожно фиксировали рукой, а дистальную половину хвоста погружали в воду с температурой 45° C. Наблюдатель количественно определял время отдергивания хвоста с помощью электронного

секундомера. Чтобы учесть межиндивидуальные различия, ответы корректировали на время отдергивания хвоста до инъекции вещества.

2.4.30.2. ПАФ-тест

Мышам вводили ПАФ (Sigma-Aldrich; 50%, объем инъекции 20 мкл) в подошву правой задней лапы. Мышам из контрольной группы вводили носитель (физиологический раствор, 20 мкл). РТ1 и 6 (0,01 и 0,1 мг/кг, s.c.) либо физиологический раствор (s.c., в том же объеме 10 мл/кг) вводили на следующий день после инъекции ПАФ. Анальгетическую активность оценивали с помощью теста «горячей пластины» через 30 мин после введения препарата и сравнивали с эффектами диклофенака (20 мг/кг, s.c.). Для измерения тепловой чувствительности мышей помещали на Hot Plate Analgesia Meter (Columbus Instruments, США) с установленной температурой 52° С. Время наступления первой ноцицептивной реакции (отдергивание лапы, облизывание или подпрыгивание) регистрировали с пороговым временем 30 с. Процент максимально возможного эффекта (%MPE) рассчитывали для каждой группы:

$$\%\mathrm{MPE} = \frac{t_1 - t_0}{t_2 - t_0} \times 100 \quad (32),$$

где t_0 — время наступления реакции в контрольной группе, t_1 — в тестовой группе, а t_2 — пороговое время.

2.4.30.3. «Уксусные корчи»

Через час после введения физиологического раствора или препарата (РТ1 или 6, 0,01 и 0,1 мг/кг, s.c.; диклофенак, 20 мг/кг, s.c.; объем 10 мл/кг) мышам делали внутрибрюшинную инъекцию 0,6% уксусной кислоты (10 мл/кг). Затем наблюдали за поведением животных и подсчитывали количество проявлений характерного поведения («корчей») в течение 20 мин.

2.4.30.4. Формалиновый тест

Препараты вводили подкожно в объеме 50 мкл в дорзальную поверхность правой задней лапы. Каждой крысе делали две инъекции: одну физиологического раствора, диклофенака (670 нмоль, т.е. ≈1,2 мг/кг), РТ1 или 6 (0,5 или 2,5 нмоль, т.е. ≈0,01 или 0,05 мг/кг), а другую — 2,5% формалина. Перед тестированием крысы акклиматизировались в индивидуальных открытых акриловых камерах для наблюдения в течение 15 мин, чтобы минимизировать стресс. После инъекции формалина животных возвращали в камеры, и ноцицептивное поведение количественно оценивали путем подсчета спонтанного облизывания, подрагивания или сгибания правой лапы в течение 1 мин каждые 5 мин на протяжении 45 мин после инъекции. Данные анализировали для временных точек ранней (0–15 мин) и поздней фазы (20–45 мин).

2.4.31. Модель остеоартрита

56 крыс случайным образом распределили по восьми группам. Животным вводили 3 мг йодацетата натрия (Sigma-Aldrich) в объеме 50 мкл с помощью иглы 29G через связку надколенника во внутрисуставное пространство правого колена под анестезией [использовали золетил (Virbac, Франция) и ксилу (Interchemie, Нидерланды)]. Контрольным крысам вводили физиологический раствор. PT1 или 6 (0,01 мг/кг, s.c.), мелоксикам (Sigma-Aldrich; 0,5 мг/кг, s.c.) или физиологический раствор (s.c., в объеме 10 мл/кг) вводили с 3 по 14 день после инъекции йодацетата. Поведенческие тесты проводили через 1 ч после введения препаратов на 3, 7 и 14 дни. Тест «горячей пластины» проводили, как описано в разделе «ПАФ-тест» выше.

2.4.31.1. Тест на силу хвата

Силу хвата задних конечностей определяли с помощью стандартного измерителя для крыс и мышей (Columbus Instruments). Каждую крысу осторожно удерживали и позволяли схватить каркас из проволочной сетки задними конечностями, а затем перемещали в ростро-каудальном направлении. Силу хвата определяли как силу тяги, когда крыса отпускала сетку. Измерения повторяли три раза, регистрировали максимальную силу, приложенную каждой крысой до потери хвата. Силу хвата выражали в г на 100 г массы тела.

2.4.31.2. Тест на распределение веса в покое (двухвесовая проба)

Распределение веса между правой (с введением йодацетата) и левой (контралатеральной) задними конечностями измеряли с помощью прибора SWB-Touch (Bioseb, Франция). Во время теста крысу помещали в держатель, где животное удобно располагалось, а его задние лапы покоились на двух раздельных сенсорных пластинах. Животному предоставляли возможность естественной адаптации распределения веса на задние лапы. Измерения повторяли три раза, данные усредняли. Данные приводятся как процент нагрузки на травмированной стороне по отношению к контрольной лапе; пониженная нагрузка на травмированную (правую) лапу выражали значениями <100%, а равное распределение веса принято за 100%.

2.4.31.3. Тест фон Фрея

Порог механочувствительности оценивали с помощью автоматического аппарата фон Фрея BIO-EVF4 (Bioseb) с жесткими наконечниками (Eppendorf). Для тестирования животных помещали на приподнятый металлический решетчатый пол с двумя отдельными закрытыми пластиковыми клетками и давали акклиматизироваться в течение минимум 15 мин. К центральной области подошвенной поверхности травмированной задней лапы прикладывали

нарастающую силу в перпендикулярном направлении, чтобы вызвать сгибание коленного сустава. Положительным ответом считали отдергивание задней лапы, при этом интенсивность давления (пороговую силу) регистрировали автоматически и выражали в граммах. Итоговые значения получали путем усреднения результатов трех измерений. Для каждой группы рассчитыволи значение %MPE:

$$\%\text{MPE} = \frac{g_1 - g_0}{g_0} \times 100 \quad (33),$$

где g_0 — средняя пороговая сила (г) в контрольной группе без введения йодацетата, а g_1 — пороги в тестовых группах.

2.4.32. Модель невралгии тройничного нерва

Исследования на животных в модели невралгии тройничного нерва проводили в ООО «НИИ Митоинженерии МГУ».

Перевязку подглазничного нерва у крыс проводили, как описано (964). Животных анестезировали золетилом / ксилой. Операционное поле готовили на морде животного вокруг глаз, для чего остригали шерсть над глазами и обрабатывали кожу антисептиком. Затем голову крысы фиксировали в стереотаксической рамке, разрезали кожу в ≈2 мм над глазом, тупым способом отделяли соединительную ткань и мышцы так, чтобы получить доступ к содержимому глазницы. Для подведения лигатуры под нерв использовали специальное приспособление, изготовленное из нихромовой проволоки. Две лигатуры из хромового кетгута 5-0 (Ethicon, США) размещали на расстоянии 3–4 мм друг от друга и нетуго, слегка сжимая нерв (уменьшение диаметра на 10–20%), завязывали. Операционное поле обрабатывали местным бактериостатиком, рану ушивали полиглактиновой нитью 4-0 (Политехмед, Россия). С другой стороны морды проводили ложную операцию, в ходе которой осуществляли те же манипуляции, что и при истинной операции, но без лигатур. Сторону морды для проведения истинной и ложной операции определяли путем рандомизации.

Спустя 5 дней после операции проводили тестирование болевой чувствительности на фоне воздействия различных веществ и после адаптации животных к условиям экспериментальной комнаты (не менее 30 мин). Тестирование состояло в поочередном измерении порога болевой чувствительности кожи переднебоковой поверхности морды с обеих сторон при помощи автоматического аппарата фон Фрея (модель 2390, IITC Life Science, США), по 7–10 попыток для каждой стороны с интервалом 30 с, результаты усредняли. Прибор регистрирует усилие, при котором животное проявляет реакцию на механическую стимуляцию кожи щупом. Для этого крысу мягко фиксировали руками, не ограничивая подвижность головы, надавливали щупом прибора на обследуемый участок морды до отдергивания, хватания передней лапой или вокализации, после чего списывали показания прибора.

Из 19 прооперированных крыс симптомы невралгии развились у 13 животных, остальные были исключены из испытаний. Крыс тестировали после введения физиологического раствора, PT1 или 6 (0,01 мг/кг, s.c.), карбамазепина (Sigma-Aldrich; 50 мг/кг, i.p.), габапентина (Sigma-Aldrich; 100 мг/кг, s.c.) или джефапиксанта (MedChemExpress; 10 мг/кг, i.p.). PT1 и 6, физиологический раствор вводили за 5 ч до испытаний, тогда как карбамазепин, габапентин и джефапиксант вводили за 1 ч. Испытания проводили в рандомизированном порядке с интервалом в 3–4 дня.

2.4.33. Биоэтика

Были приложены усилия, чтобы свести к минимуму страдания животных и количество животных, используемых в экспериментах. Наши исследования соответствовали Международным методическим рекомендациям по биомедицинским исследованиям с использованием животных Всемирной организации здравоохранения и методическим рекомендациям Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 18.III.1986). Во всех случаях эксперименты были одобрены местными этическими комитетами, о чем специально сказано в публикациях.

2.4.34. Биоинформатика

Сравнение аминокислотных последовательностей (выравнивание) выполнялось с помощью программы Clustal разных версий (965).

Для поиска по базам данных UniProt или NCBI Protein использовался алгоритм BLAST (см. выше).

2.4.34.1. Регулярные выражения

Общие структурные мотивы пептидов с определенным расположением остатков цистеина могут быть представлены с помощью регулярных выражений — последовательностей символов и метасимволов, которые затем могут быть использованы для поиска. Последовательности кДНК транслировали с помощью интерактивного инструмента из The Sequence Manipulation Suite (https://www.bioinformatics.org/sms2/). Для поиска пептидов с определенными интервалами между остатками цистеина использовали программу Notepad++. Поиск выполняли с использованием следующих регулярных выражений:

(а) $MX_{\infty}CX_3CX_{\infty}CY_1CX_{\infty}$* для пептидов с укладкой CSα/β или CSα/α 3(S-S);

(б) $MX_{\infty}CX_6CX_{\infty}CCX_{\infty}$* для пептидов с укладкой цистинового узла;

(в) $MX_{\infty}CX_{24}CX_{20}CX_3CX_{\infty}$* — для укладки Кунитца как у бычьего панкреатического ингибитора трипсина;

(г) $MX_{\infty}CY_3Cy_{\infty}CY_3CY_{\infty}$* — для CSα/α 2(S-S);

где M — метионин, C — цистеин, X — любой а.о., Y — любой а.о., за исключением цистеина; * обозначает стоп-кодон. Нижние индексы показывают количество а.о., а ∞ означает любое количество а.о.

2.4.34.2. Филогенетические деревья

Филогенетические деревья строили в программе MEGA6 (918) с использованием метода присоединения соседей (966). Для подсчета доли повторяющихся деревьев, в которых родственные последовательности образовывали одинаковые кластеры (уровень поддержки), использовали пороговый тест (500 повторов). Эволюционные расстояния рассчитывали методом квазимаксимального правдоподобия (967).

2.4.34.3. Молекулярная эволюция

Z-тест на отрицательный / положительный отбор проводили по методу Нея-Годжобори (Nei-Gojobori) (968). Сравнивали отношение числа синонимичных замен на синонимичный сайт (d_S) с отношением числа несинонимичных замен на несинонимичный сайт (d_N), разницу $d_S - d_N > 0$ интерпретировали как признак отрицательного (стабилизирующего) отбора, тогда как противоположный результат ($d_S - d_N < 0$) считали показателем положительного (движущего) отбора.

Затем использовали метод максимального правдоподобия с помощью программы CODEML из пакета PAML (969) с графическим интерфейсом PAMLX (970); все разрывы исключали из анализа. Для попарных сравнений программу запускали в режиме runmode =−2 и моделью M0. Для теста отношения правдоподобия (LRT, англ. likelihood ratiotest) программу запускали с runmode =−2 и пятью моделями: M0, M1a, M2a, M7 и M8. Длины ветвей оценивали с помощью модели M0. Натуральный логарифм функции максимального правдоподобия (lnL) рассчитывали для каждой модели. Тесты LRT проводили для пар M1a / M2a и M7 / M8, для каждой из которых рассчитывали $2\Delta l = 2 \times (\ln L - \ln L0)$, где L0 — модель, не допускающая положительного отбора (M1a и M7). Значения $2\Delta l$ сравнивали с таблицей значений χ^2 для двух степеней свободы.

2.4.35. Молекулярное моделирование

Бóльшая часть экспериментов *in silico* проводилась в сотрудничестве с лабораторией моделирования биомолекулярных систем и группой анализа структуры мембранных белков *in silico* ИБХ РАН. Моделирование касалось различных структурных аспектов токсинов и ионных каналов.

2.4.35.1. Моделирование по гомологии

Моделирование гомологии проводили с помощью программы MODELLER разных версий (971). В качестве шаблона выбирали наиболее сходный по последовательности полипептид с известной пространственной структурой. Для поиска по базе данных UniProt использовали алгоритм BLAST (см. выше). Для выравнивания аминокислотных последовательностей использовали программу Clustal (см. выше). *Цис* или *транс*-конфигурацию пептидных связей оставляли как в шаблоне. С-Концевое амидирование добавляли при необходимости в соответствии с аннотацией в UniProt. Для каждой молекулы получали несколько моделей, для расчетов МД брали характеризующуюся наименьшим значением энергоподобной оценочной функции MODELLER. Моделирование мутантов с одиночными заменами по сравнению с полипептидами с известной структурой проводили также с помощью внесения аминокислотных замен *in silico* в программе PyMOL.

Для построения моделей K_v шаблоном служила структура rK_v1.2 (PDB ID: 3LUT) (972). Комплексы блокаторов с K_v моделировали на основе структуры комплекса CTX с каналом K_v1.2, в котором область мотива весла заменена на соответствующую последовательность из K_v2.1 (PDB ID: 4JTA) (347). Модель каждого канала выравнивали с химерным K_v1.2/2.1, после чего шаблон удаляли. Затем структуру нужного блокатора выравнивали с CTX по а.о. функциональной диады, после чего CTX удаляли.

2.4.35.2. Молекулярная динамика

Мы использовали пакет GROMACS разных версий (https://www.gromacs.org/) (973), силовые поля и наборы параметров GROMOS96 45A3 (974) и Amber ff99SB-ILDN (975), а также модели воды SPC (англ. simple point charge) (976) и TIP3P (transferable intermolecular potential with 3 points) (977). МД проводили с временным шагом 2 фс и заданными периодическими граничными условиями в изотермическо-изобарном ансамбле (NPT, где N — число частиц, P — давление, T — температура) с изотропным давлением 1 бар и постоянной температурой 300 K. Контроль температуры осуществляли с помощью термостата Бусси-Донадио-Парринелло (англ. V-rescale) (978), а контроль давления — с помощью баростата Берендсена (979) — с параметрами релаксации 0,1 и 1 пс соответственно. Электростатические взаимодействия рассчитывали с помощью алгоритма суммирования по Эвальду PME (англ. particle mesh Ewald). Ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия учитывали только на близких расстояниях (менее 10–15 Å) с использованием сферической отсечки.

Подвижность молекул мы оценивали путем расчета среднеквадратического отклонения (RMSD, root mean square deviation) координат атомов по траекториям МД. Расчеты про-

водили с использованием утилиты gmx rms пакета GROMACS, а результаты визуализировали с помощью графического инструмента Grace (https://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/).

2.4.35.3. Подвижность α-NaTx

Для изучения α-NaTx каждый токсин помещали в ячейку с молекулами воды (60 × 60 × 60 $Å^3$) вместе с необходимым количеством противоионов и подвергали минимизации энергии с последующим нагревом до 300 К в течение 100 пс и МД без ограничений в течение 60 нс. Все траектории накладывали на одну структуру, чтобы исключить вращение и поступательное движение и сделать возможным прямое сравнение свойств разных молекул. Для анализа высокоамплитудных скоррелированных движений по траекториям МД строили ковариационные матрицы и рассчитывали их собственные значениия и собственные векторы с использованием утилиты g_covar, после чего собственные векторы анализировали с помощью утилиты g_anaeig пакета GROMACS. Расчеты проводили для тяжелых атомов белка и полярных атомов водорода (по критериям силового поля) с использованием временного интервала траектории 20–60 нс. Среднеквадратичную флуктуацию (RMSF-NM; “NM” означает «нормальная мода») рассчитывали по траектории с фильтрацией по самой медленной моде (первому собственному вектору), она служила мерой молекулярной подвижности.

Каждому а.о. в токсине длиной N а.о. приписывали вектор, описывающий движение его C^{α}-атома по самой низкочастотной моде. Затем строили матрицу скалярных произведений этих векторов (A1 × A2 × cosα), где A1, A2 — амплитуды движения, а α — угол между двумя векторами. В результате получали матрицу размером N × N, на диагонали которой расположены элементы со значением, равным квадрату амплитуды. Недиагональные элементы полученной матрицы соответствуют всем возможным парам разных а.о. Эту матрицу отображали в виде карты, где синие области соответствуют сонаправленным движениям, красные — направленным в противоположные стороны. Белые области означают, что остатки движутся ортогонально или амплитуды их движения малы.

Для нахождения характерных высокоамплитудных движений, присущих всем токсинам определенной группы, строили усредненные карты, учитывая выравнивание последовательностей токсинов. В результате получали карты размером 69 ×69 а.о. (69 — длина выравнивания), показывающие характерные для данной группы высокоамплитудные скоррелированные движения.

2.4.35.4. Модели ионных каналов

Построенные комплексы пептидов с K_v помещали внутрь липидного бислоя, имитирующего по составу мембрану нейрона. Мы использовали предварительно уравновешенный

фрагмент бислоя [7,0 × 7,0 × 13,5 нм^3; ПОФХ / 1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ПОФЭ) / холестерин (Хол); 100 : 50 : 50 молекул, сольватированных 14 172 молекулами воды]; некоторые молекулы фосфолипидов и Хол удаляли, чтобы освободить место для белка. В систему добавляли необходимое количество ионов для сохранения электронейтральности. Затем систему уравновешивали (нагревали) в течение 100 пс. Подвижность C^{α}-атомов а.о. каналов, не участвующих в формировании внешнего вестибюля поры, а также N^{ε}-атома ключевого остатка лизина блокаторов ограничивали во время уравновешивания. После этого систему подвергали МД в течение сотен нс.

2.4.35.5. Расчет энергии взаимодействия белков

Мы идентифицировали образующиеся в ходе МД межмолекулярные контакты и оценивали вклад отдельных а.о. в энергию взаимодействия с помощью программы IMPULSE, разработанной в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН (Н.А. Крылов и др., готовится к публикации). Расчет проводили также с помощью утилиты g_mmpbsa пакета GROMACS (980). Графическое представление профилей энергии взаимодействия в виде столбчатых диаграмм выполняли с использованием программы на языке Python, созданной В.М. Табакмахером, и библиотек, имеющихся в открытом доступе, в частности NumPy.

Водородные связи идентифицировали с использованием набора параметров из утилиты gmx hbond GROMACS (расстояние D—A ≤ 3,5 Å и угол D—H—A ≥ 150° для водородной связи D—H···A); солевые мостики, π-катионные, стэкинг и гидрофобные контакты тоже определяли по геометрическим критериям. Для гидрофобных контактов расстояние между участками поверхности с положительными величинами молекулярного гидрофобного потенциала (МГП, см. ниже) не превышало 7 Å. Для солевых мостиков расстояние между разноименно заряженными групами не превышало 4 Å. Для π-катионных контактов расстояние между геометрическим центром ароматического кольца и заряженной группой не превышало 6 Å. Для стэкига необходимым считали выполнение трех условий: (а) расстояние между геометрическими центрами ароматических колец / гуанидиновых групп не превышало 7 Å; (б) расстояние между геометрическим центром первой группы и центром проекции второй на плоскость, в которой находилась первая, не превышало 1,4 Å; (в) угол между нормалями к плоскостям, в которых лежали группы, находился в диапазонах 0–20° или 70–110°.

Для оценки энергии межмолекулярного взаимодействия использовали набор параметров Amber ff99SB-ILDN и расстояние отсечки 15 Å для электростатических и Ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Эта энергия представляет собой сумму потенциальной энергии кулоновского взаимодействия и потенциала Леннард-Джонса. Расчет производили для каж-

дого шага МД на протяжении всей траектории. Вкладом в энергию взаимодействия конкретного а.о. считали сумму вкладов кажого его атома. Вычисленные величины вкладов в энергию взаимодействия усредняли по всей траектории МД и рассчитывали SD.

2.4.35.6. Молекулярный гидрофобный потенциал

Подход МГП предполагает, что каждый атом в молекуле обладает гидрофильностью / гидрофобностью, и принимает во внимание топологию молекулы (981, 982). Т.н. «атомные константы гидрофобности» были определены из базы данных экспериментальных значений коэффициентов распределения между водной и менее полярной (октан-1-ол) фазами для большого числа органических соединений (983); МГП в любой заданной точке рассчитывали как суперпозицию вкладов, создаваемых каждым атомом, монотонно затухающих с расстоянием. Расчеты выполняли с помощью программы PLATINUM (https://model.nmr.ru/platinum/) (984).

Сравнение гидрофильных / гидрофобных свойств модулей специфичности и коровых модулей α-NaTx проводили путем расчета средней динамической гидрофобности ($<МГП_{МС,\ Кор}>_{МД}$) независимо для поверхности каждого модуля. $МГП_{МС}$ и $МГП_{Кор}$ — средние значения МГП по всем точкам поверхности Коннолли, которые принадлежат модулю специфичности или коровому модулю соответственно. Анализ по траектории МД дает среднюю динамическую гидрофобность и ее SD: $<МГП_{МС,\ Кор}>_{МД} \pm$ SD. При сравнении двух групп токсинов учитывали два распределения МГП, статистическая значимость выявленной разницы определяли с помощью двустороннего непарного *t*-критерия. В качестве уровня значимости приняли значение $p = 0{,}05$.

2.4.35.7. Картирование свойств полипептидов на молекулярной поверхности

Мы использовали подход белковой топографии (англ. Protein Surface Topography, PST) (985), а именно, построили двумерные карты, представляющие собой проекции сфер, описывающих молекулы полипептидов, с графическим отображением значений МГП их молекулярных поверхностей. Основные этапы были следующие. 1) Расчет молекулярной поверхности Коннолли (поверхности, соответствующей объему, внутрь которого не может проникнуть растворитель). 2) Вычисление МГП для каждой точки поверхности. Для этих двух шагов использовали программу PLATINUM. 3) Проекция каждой точки на сферу; мы произвольно выбрали радиус сферы 20 Å. Центр сферы совмещали с барицентром поверхности и установливали в качестве начала координат. Координаты (x, y, z) теперь можно было описать широтой = $\arcsin\frac{z}{|r|}$ и долготой = $\operatorname{arctg}\frac{y}{x}$, где r — радиус-вектор точки, а широта и долгота имеют то же значение, что в географии. 4) Данные МГП интерполировали на прямо-

угольную координатную сетку, определяемую широтой (–90°, 90°) и долготой (–180°, 180°) с шагом 1°. 5) Построение равновеликой картографической проекции Мольвейде. 6) Раскраска карты цветными контурами. Шаги 3–6 реализовали в скрипте на языке Python, написанном А.О. Чугуновым.

2.4.35.8. Модели AlphaFold

Модели некоторых белков получали из AlphaFold Protein Structure Database (986, 987) и далее использовали, в частности, для расчетов МД. Модели некоторых белков и их комплексов получали с помощью AlphaFold Server, который использует AlphaFold 3 (931). Наш скромный опыт показывает, что предсказания AlphaFold 3 отличаются большей правдоподобностью в сравнении с AlphaFold-Multimer (988).

2.4.36. Статистическая обработка результатов

Данные электрофизиологии, радиолигандного анализа, флуоресцентной микроскопии, осаждения с липосомами представлены как средние значения ± стандартная ошибка среднего (SE) или как средние значения ± SD для как минимум трех независимых экспериментов ($n \geq 3$; обычно $n \geq 5$). Сравнение средних значений двух зависимых (парных) выборок данных — измерений до и после приложения токсина — производили с использованием двустороннего парного *t*-критерия Стьюдента. В качестве уровня значимости приняли значение $p = 0{,}05$. Для множественных сравнений использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим апостериорным тестом Тьюки. Данные тестов на животных анализировали с использованием подходящих в каждом конкретном случае тестов и апостериорных тестов с учетом рекомендаций (989), подробности приведены в подписях к рисункам и публикациях по результатам работы.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Молекулярный состав яда паукообразных и методы разделения

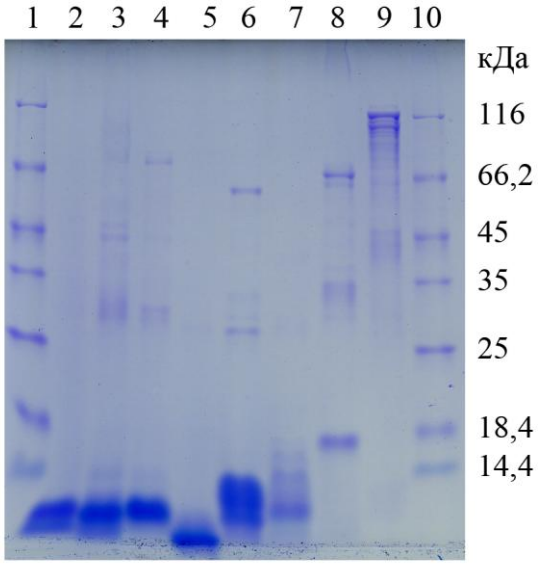
Из литературы (см. раздел «Молекулярный состав яда паукообразных»), а также накопленного опыта работы нашего научного коллектива под руководством академика Е.В. Гришина в ИБХ РАН известно, что в большинстве случаев основным компонентом яда паукообразных — как количественно, так и, что более важно, функционально — служат небольшие белки (пептиды). На рисунке 40 приведена электрофореграмма цельных ядов скорпионов и пауков — объектов данной работы, а также традиционных объектов изучения различными лабораториями мира. Хорошо видно, что действительно, в большинстве случаев основная масса полипептидных компонентов мигрирует вблизи фронта в выбранных условиях электрофореза, т.е. характеризуется Мм < 10 кДа. Следует дать еще два комментария:

(1) даже в случаях, когда пептидная фракция является абсолютно доминирующей, в составе яда обнаруживаются белковые компоненты;

(2) имеются важные исключения: так, в яде *L. tarabaevi* помимо небольших пептидов содержатся сравнительно более высокомолекулярные компоненты; у *Ch. punctorium* основной компонент имеет Мм ≈ 16 кДа, присутствуют также белки с Мм ≈ 35 и 70 кДа; главными компонентами яда *Latrodectus dahli* служат крупные белки с Мм > 100 кДа.

Аналогичный результат получается при анализе состава яда с помощью эксклюзионной хроматографии (гель-фильтрации). На рисунке 41 показаны профили разделения тех же цельных ядов скорпионов и пауков, что на рисунке 40.

Рисунок 40. Электрофоретическое разделение цельных ядов паукообразных.



Использован коммерчески доступный гель (Any kD Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels, 15-well, 15 µl, Bio-Rad Laboratories).
На дорожках 1 и 10 нанесены молекулярные стандарты (по 5 мкл Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), соответствующие Мм указаны справа. Дорожка 2 — яд скорпиона *Leiurus quinquestriatus* (10 мкг); 3 — *Mesobuthus eupeus* (20 мкг); 4 — *Orthochirus scrobiculosus* (10 мкг); 5 — яд паука *Agelena orientalis* (аликвота, соответствующая 50 нл яда, ≈10 мкг); 6 — *Alopecosa marikovskyi* (0,5 мкл яда, ≈100 мкг); 7 — *Lachesana tarabaevi* (20 нл яда, ≈4 мкг); 8 — *Cheiracanthium punctorium* (20 нл яда, ≈4 мкг); 9 — *Latrodectus dahli* (20 нл яда, ≈4 мкг).

Использование колонки с эффективным диапазоном разделения в области ~1–15 кДа позволяет наглядно наблюдать превалирование пептидных компонентов в большинстве образцов. Исключения те же, что и при электрофоретическом анализе: *L. tarabaevi* наряду с пептидами содержит сравнительно длинные полипептиды, *Ch. punctorium* — небольшие (≈15 кДа) и более крупные белки, *L. dahli* — главным образом белки. Интересно, что для некоторых ядов (всех анализированных скорпионов и *Ch. punctorium*) характерно также сравнительно высокое содержание низкомолекулярных (<1 кДа) компонентов.

Поскольку основные компоненты яда пептиды, использовавшиеся в нашей работе методы выделения и очистки биомолекул можно отнести к области пептидомики. Учитывая предыдущий опыт работы коллектива, методические указания профессора Ц.А. Егорова, а также результаты многочисленных попыток выделения активных компонентов яда, мы выработали общую схему, использование которой в большинстве случаев надежно приводит к успешной очистке целевого соединения. Эта схема разделения ядов подразумевает использование трех стадий жидкостной хроматографии.

На первой стадии яд подвергается разделению на грубые фракции по Мм с помощью гель-фильтрации. Мы используем такую неподвижную фазу, которая позволяет отделить пептиды (1–10 кДа) от белков (>10 кДа) и низкомолекулярных соединений (<1 кДа). В качестве подвижной фазы мы используем 10% ацетонитрил в 0,1% ТФУ; экспериментально установлено, что это позволяет минимизировать неспецифическую сорбцию компонентов яда на носителе. Можно использовать солевые буферные растворы, однако при этом профиль разделения существенно меняется. На второй стадии пептидные компоненты разделяются с помощью ОФ-ВЭЖХ в градиенте концентрации ацетонитрила в кислой среде; как правило, мы используем фазу C_{18}.

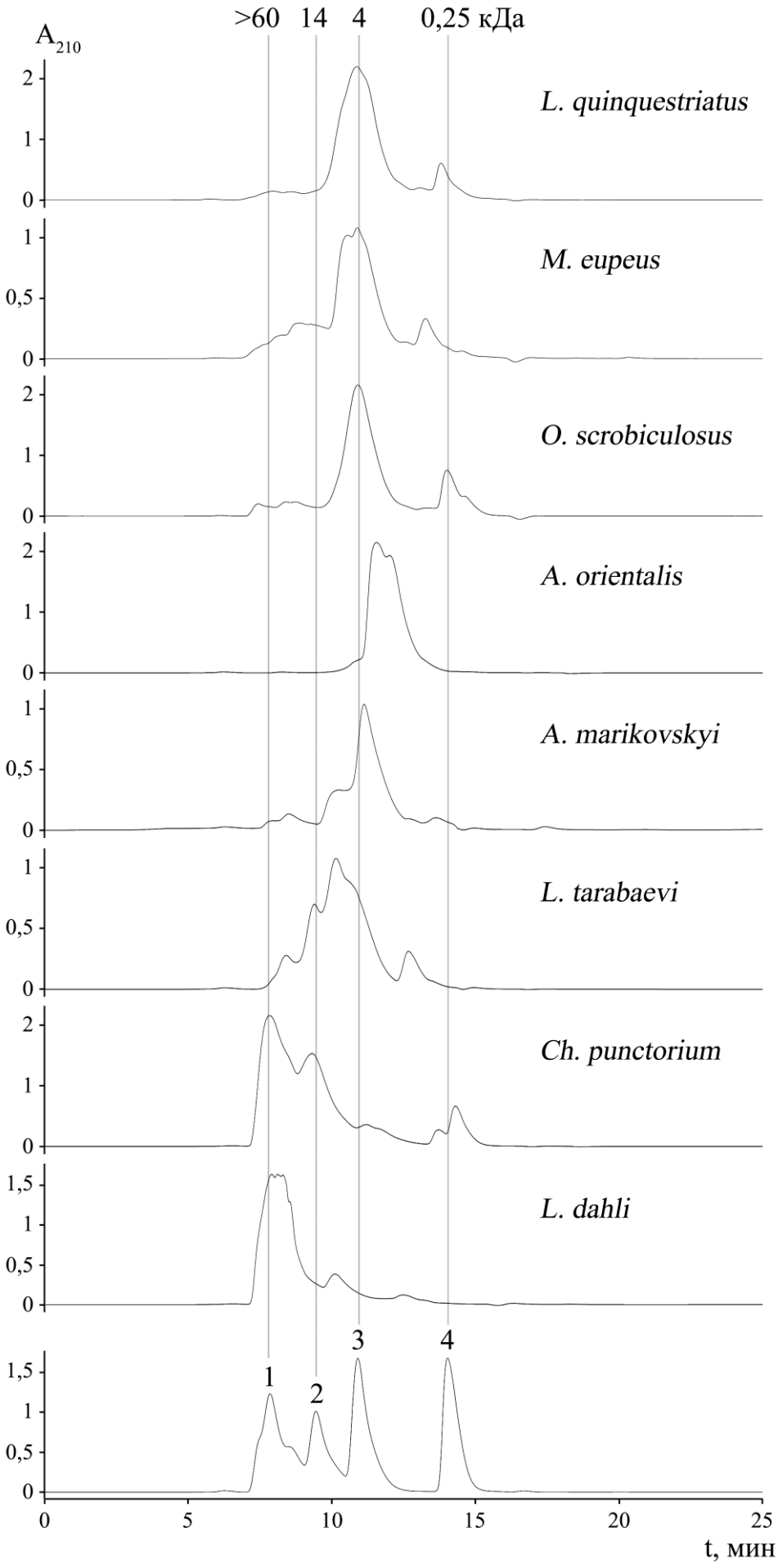
В некоторых случаях приемлемой чистоты целевого соединения удается добиться уже после второй стадии деления яда. В остальных случаях на третьей стадии используется повторное разделение с помощью ОФ-ВЭЖХ, при этом в зависимости от ситуации могут применяться различные подходы:

(а) использование более пологого градиента ацетонитрила;

(б) термостатирование колонки при повышенной температуре;

(в) разделение при другом pH;

Рисунок 41. Разделение цельных ядов паукообразных с помощью гель-фильтрации. Колонка TSKgel SuperSW2000 (4,6×300 мм); элюент: 10% ацетонитрил, 0,1% ТФУ; скорость потока — 0,35 мл/мин. Наносили по 100 мкг ядов. Детекция по поглощению элюата при 210 нм (шкалы слева). На нижней панели показан профиль разделения смеси молекулярных стандартов (1 — БСА, 2 — рибонуклеаза А, 3 — РТ1, 4 — ИПТГ); соответствующие Мм указаны сверху, серые вертикальные линии обозначают положение верхушки пиков стандартов.


>60
14
4
0,25 кДа
A210
L. quinquestriatus
M. eupeus
O. scrobiculosus
A. orientalis
A. marikovskyi
L. tarabaevi
Ch. punctorium
L. dahli
1
2
3
4
t, мин

(г) замена подвижной фазы (например, использование изопропанола);

(д) использование другой стационарной фазы (C_{18} если на второй стадии была C_5; обращенная фаза с модификациями).

Эти методические соображения были нами опубликованы в профильном издании Methods in Molecular Biology (990).

На рисунке 42 в качестве примера последовательно показаны профили разделения цельного яда скорпиона *M. eupeus* с помощью гель-фильтрации, а затем его пептидной фракции при помощи ОФ-ВЭЖХ и повторно — двух фракций, содержащих интересные для наших исследований компоненты, — так же с помощью ОФ-ВЭЖХ, здесь мы использовали другую подвижную фазу (в одном случае изменили pH, в другом добавили изопропанол).

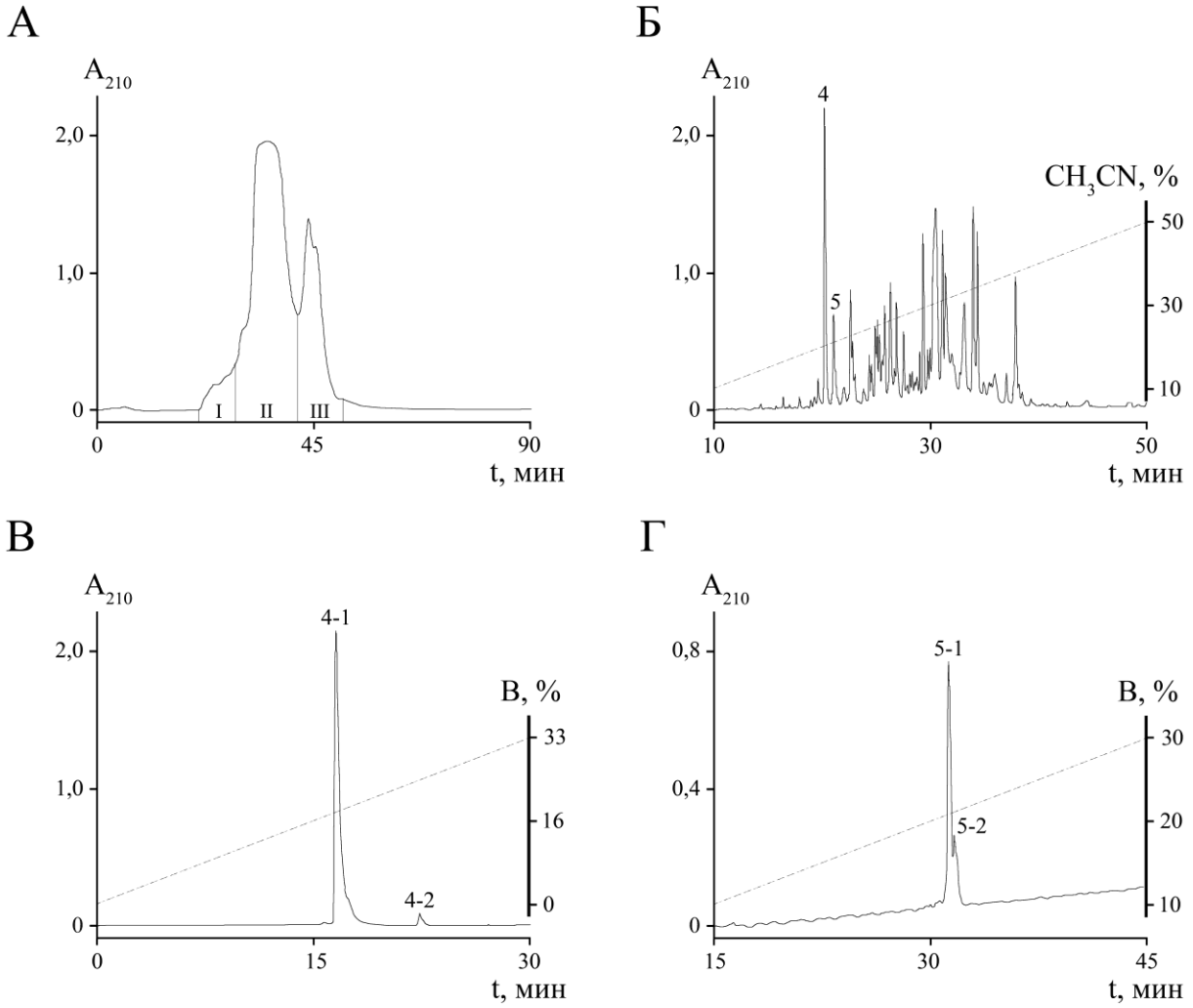
Чистоту полученных соединений мы обычно характеризуем с применением традиционных для пептидов методов: (а) аналитической ОФ-ВЭЖХ; (б) МАЛДИ МС; (в) секвенирования по Эдману. В тестах активности мы используем препараты с чистотой >95% по данным ОФ-ВЭЖХ (обычно >98%).

3.2. Изучение структуры полипептидных компонентов яда

Для установления первичной структуры очищенных пептидов в большинстве случаев мы используем традиционный подход, подразумевающий секвенирование по Эдману. Дело в том, что (а) геном большинства наших объектов не секвенирован, (б) несмотря на наличие в ряде случаев транскриптомных данных, как будет видно из дальнейшего, всё равно применение МС секвенирования не дает однозначной аминокислотной последовательности из-за сложности с изобарными а.о. (особенно I/L).

Поскольку пептиды из яда обычно содержат S-S-мостики, очищенные компоненты вначале подвергаются процедуре восстановления дисульфидных связей и алкилирования тиольных групп (мы обычно используем 4-винилпиридин). На этом этапе сразу возможно установление числа остатков цистеина и S-S-мостиков — по разнице Мм модифицированного и интактного пептида. Затем проводится ступенчатая деградация по Эдману на автоматическом секвенаторе, при этом остатки цистеина определяются в виде модифицированных (S-пиридилэтилированных) производных. Иногда попадаются т.н. «блокированные с N-конца» пептиды, прямое секвенирование которых невозможно. В нашей практике встречались исключительно пептиды, содержащие N-концевой остаток пироглутаминовой кислоты, который спонтанно образуется из N-концевого глутамина (991). Селективное удаление этого а.о. возможно с помощью пироглутамат-аминопептидазы, после чего пептид может быть секвенирован.

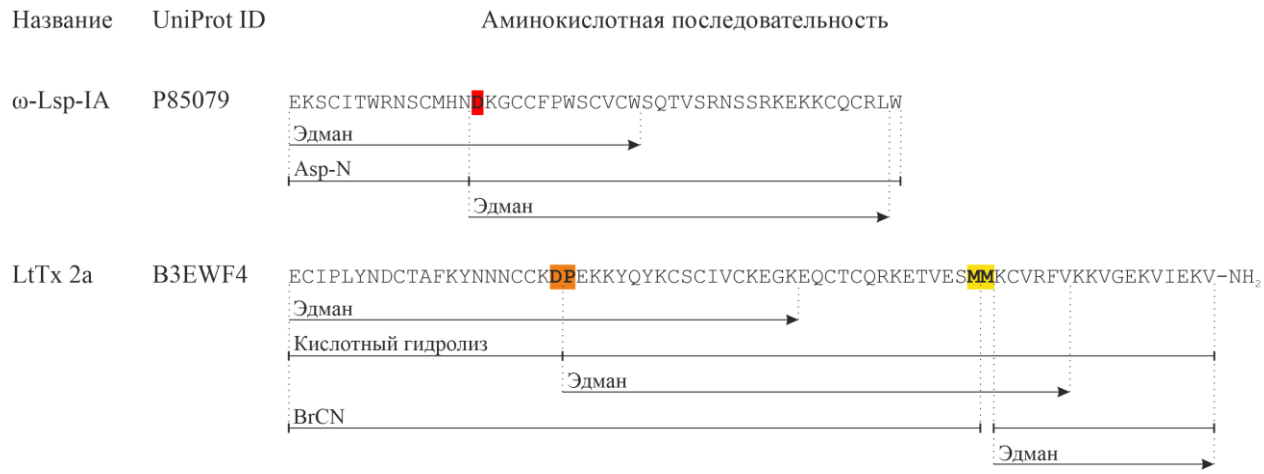
Рисунок 42. Фракционирование яда *M. eupeus* и очистка индивидуальных токсинов. (А) Эксклюзионная хроматография цельного яда на колонке TSK 2000SW (7,5×600 мм). Фракции обозначены римскими цифрами. (Б) ОФ-ВЭЖХ фракции II из (А) на колонке Vydac C_{18} (4,6×250 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Субфракции 4 и 5 содержат смесь КТх. (В) Повторная хроматография субфракции 4 из (Б) на той же колонке Vydac. Использовали линейный градиент растворителя (В, показан пунктиром), содержащего 50% ацетонитрила, 10 мМ Трис-HCl (pH 7,0). Пики, содержащие индивидуальные компоненты, обозначены 4-1 и 4-2. (Г) Повторная хроматография субфракции 5 из (Б). Использовали линейный градиент растворителя, содержащего 50% ацетонитрила, 20% изопропилового спирта и 0,1% ТФУ.



В том случае, если длина исследуемого полипептида превосходит 40–50 а.о., приходится проводить фрагментацию. Для этого мы используем ряд реагентов, позволяющих осуществить селективный гидролиз полипептидной цепи. Из химических методов мы применяем гидролиз по остаткам метионина при помощи бромциана; в наших руках этот метод зарекомендовал себя как абсолютно специфичный (не затрагиваются другие а.о.) и практически количественный (реакция протекает с выходом ≈ 100%). Что касается энзиматических методов, то мы используем следующие ферменты: трипсин, Arg-C, Lys-C, Asp-N, Glu-C и (реже)

химотрипсин. Методические подробности приведены в соответствующем разделе Методов и опубликованы нами в уже упомянутом сборнике Methods in Molecular Biology (990). Применение различных методов дает фрагменты полипептидов с перекрывающимися аминокислотными последовательностями, секвенирование которых позволяет реконструировать полную первичную структуру исследуемого полипептида. На рисунке 43 в качестве примера показана схема установления первичной структуры двух токсинов: ω-Lsp-IA из яда *A. marikovskyi* и LtTx 2a из яда *L. tarabaevi*.

Рисунок 43. Схема установления аминокислотной последовательности ω-Lsp-IA и LtTx 2a. А.о., по которым проводился селективный протеолиз, выделены цветом; образовавшиеся фрагменты показаны отрезками ниже, строки подписаны в соответствии с использованным реагентом. Последовательности, установленные с помощью автоматического секвенирования по Эдману, указаны стрелками.



Что касается пространственной структуры, то мы избалованы историческим сотрудничеством с отделом структурной биологии ИБХ РАН, где наши объекты изучаются методами спектроскопии ЯМР. Для этих работ необходимо иметь несколько мг очищенного компонента, а в ряде случаев необходим образец, содержащий изотопы ^{13}C и/или ^{15}N. Для наработки необходимого количества мы получаем рекомбинантные пептиды.

3.3. Получение рекомбинантных пептидов

Итак, основные компоненты яда — дисульфид-богатые пептиды. Очевидно, что наработка достаточных количеств для проведения детальных исследований структуры, активности и механизма действия с помощью выделения из природного источника в случае паукообразных не адекватный подход. В качестве исключения от некоторых крупных пауков или скорпионов удается получить десятки мкл яда при дойке одной особи, и если рассматриваемый компонент является мажорным (например, с содержанием ≈ 5% всех белков), тогда (с

учетом содержания белковой фракции в цельном яде ≈ 20%) можно ожидать получения десятков и даже сотен микрограммов искомого вещества. Однако для изучения пространственной структуры, к примеру, необходимо несколько миллиграммов. А если речь идет о сравнительно мелких существах, то такая задача становится невыполнимой. Из большинства аранеоморфных пауков (а именно они наиболее разнообразны) за дойку удается получить не более пары мкл яда, содержание исследуемого компонента может быть менее 1%, и тогда для наработки достаточного количества пришлось бы использовать всю популяцию целых районов, а в некоторых случаях и всего вида было бы мало.

Таким образом, необходим альтернативный подход к получению токсинов — искусственно. В настоящее время пептиды рутинно получают либо с помощью твердофазного синтеза, либо в системах экспрессии генов. Пептидный синтез в последнее время получил «второе дыхание», что связано как с прогрессом в оптимизации базовой схемы Меррифилда (992), так и с разработкой новых методов химии белка, например нативного химического лигирования (993). В случае дисульфид-богатых пептидов естественным образом встает вопрос правильного замыкания S-S-мостиков. Зачастую удается получить нативную структуру без дополнительных ухищрений — просто окислением тиольных групп кислородом воздуха. Иногда же такая процедура заканчивается неудачей, и тогда либо проводят «мягкое» окисление в присутствии глутатионовой пары (GSH / GSSG; чтобы дать возможность тиол-дисульфидного обмена), либо используют дифференциальную защиту тиольных групп в ходе синтеза (чтобы иметь возможность окислять нужные попарно).

Что касается получения рекомбинантных пептидов, то в зависимости от ситуации можно использовать различные системы экспрессии: бактериальные, эукариотические (в клетках дрожжей, животных и даже растений) и бесклеточные. Наибольшей простотой и дешивизной характеризуются системы с использованием *E. coli*, их обычно и используют для получения токсинов (994). Здесь я не стану приводить детальный анализ и сопоставление с другими системами, однако сошлюсь на недавний обзор по теме (995). Проблема правильного замыкания S-S-связей в случае гетерологической экспрессии тоже имеет место и может решаться по-разному. Опять нативная структура может формироваться сама собой, без каких-либо специальных приемов. При получении рекомбинантных белков в виде телец включения проводят их ренатурацию, а корректные дисульфидные связи формируют после восстановления меркаптоэтанолом или ДТТ «мягким окислением» с участием глутатионовой пары. Наконец, часто токсины получают сразу в растворимом и правильно свернутом виде, а для этого, как правило, используют белки-помощники (англ. carrier proteins). Целевые пептиды в этом случае получают в виде химерных (или гибридных, слитных, англ. chimeric, hybrid, fusion) белков с помощниками, роль которых заключается в повышении растворимости и ве-

роятности правильного сворачивания продукта. Два из наиболее распространенных партнеров, обеспечивающих высокий выход и традиционно используемых для получения токсинов: мальтозу-связывающий белок (MBP, maltose-binding protein) (996) и Trx (997). Оба обеспечивают высокую растворимость целевого белка и помогают правильному формированию дисульфидов. В случае MBP рекомбинантный белок может быть направлен в периплазму, где формированием S-S-мостиков займется собственная машинерия бактерий (998), а вот Trx (999) сам является тиол-дисульфид-оксидоредуктазой. Наш опыт показывает, что использование Trx позволяет получить пептиды с большим числом дисульфидов (1000), и именно этот подход мы применяли почти без исключения.

Выбор штамма требует дополнительного комментария. В большинстве случаев сравнительно высокий выход (1–10 мг с 1 л среды) целевого продукта удавалось получить в штамме *E. coli* BL21(DE3) [генотип: F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)] (1001). Он традиционно используется для наработки рекомбинантных белков, являясь дефектным по протеазам Lon (цитоплазматическая) и OmpT (во внешней мембране). Кроме того, он лизогенен по фагу λDE3, несущему ген T7 РНК-полимеразы под контролем промотора *lacUV5*, и потому подходит для экспрессии трансгенов с T7 промотора. Для повышения эффективности формирования дисульфидных мостиков мы также использовали штаммы: Origami B(DE3) [F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm lacY1 ahpC* (DE3) *gor522::*Tn*10 trxB* (Kan^R, Tet^R)], дефектный по глутатионредуктазе и тиоредоксинредуктазе (1002), и SHuffle T7 Express [*fhuA2 lacZ::T7 gene1* [lon] *ompT ahpC gal λatt*::pNEB3-r1-*cDsbC* ($Spec^R$, $lacI^q$) Δ*trxB sulA11 R(mcr-73::mini*Tn*10*--Tet^S)2 [dcm] *R(zgb-210::*Tn*10* --Tet^S) *endA1* Δ*gor* Δ*(mcrC-mrr)114::IS10*], который вдобавок конститутивно экспрессирует ген дисульфид-изомеразы DsbC (1003).

Очистку продуктов экспрессии тоже можно проводить разными способами. Наиболее распространенный лабораторный подход — использование аффинной хроматографии. В этом случае в структуру рекомбинантного гибрида вводится дополнительный элемент (таг, от англ. tag) — последовательность, обеспечивающая возможность аффинной очистки. Доминирующее положение в лабораторной практике занимает гистидиновый таг (His-tag), представленный шестью и более остатками гистидина подряд. Он служит для IMAC на сорбентах с иммобилизованными ионами переходных металлов Co^{2+} или Ni^{2+} (1004).

Наконец, для отсоединения целевого пептида от белка-помощника можно прибегнуть к различным методам селективного гидролиза. Наибольшее распространение получили ферментативные методы с использованием энтеропептидазы, TEV протеазы, тромбина и фактора Xa (1005). Удобнее первые два фермента, поскольку они мало чувствительны в отношении а.о. в позиции P_1', и потому с их помощью можно получить целевые белки с нативной N-концевой последовательностью. Среди химических методов выделяется один — расщепле-

ние белков по остаткам метионина с помощью бромциана. Оно проходит с выходом, близким к 100%, и практически абсолютной специфичностью (1006). Традиционный протокол предполагает растворение белка в 70% муравьиной кислоте (альтернативно можно использовать 0,1 н HCl). Мы же показали, что присутствие солей и других компонентов, попавших в раствор белка в ходе очистки, не мешают реакции, важна лишь кислая среда (1007). Это наблюдение позволило нам существенно упростить протокол: теперь не нужна стадия обессоливания белка, и к селективному гидролизу можно переходить сразу после очистки. Упрощенный протокол использовался нами для получения рекомбинантных пептидов, не содержащих остатков метионина.

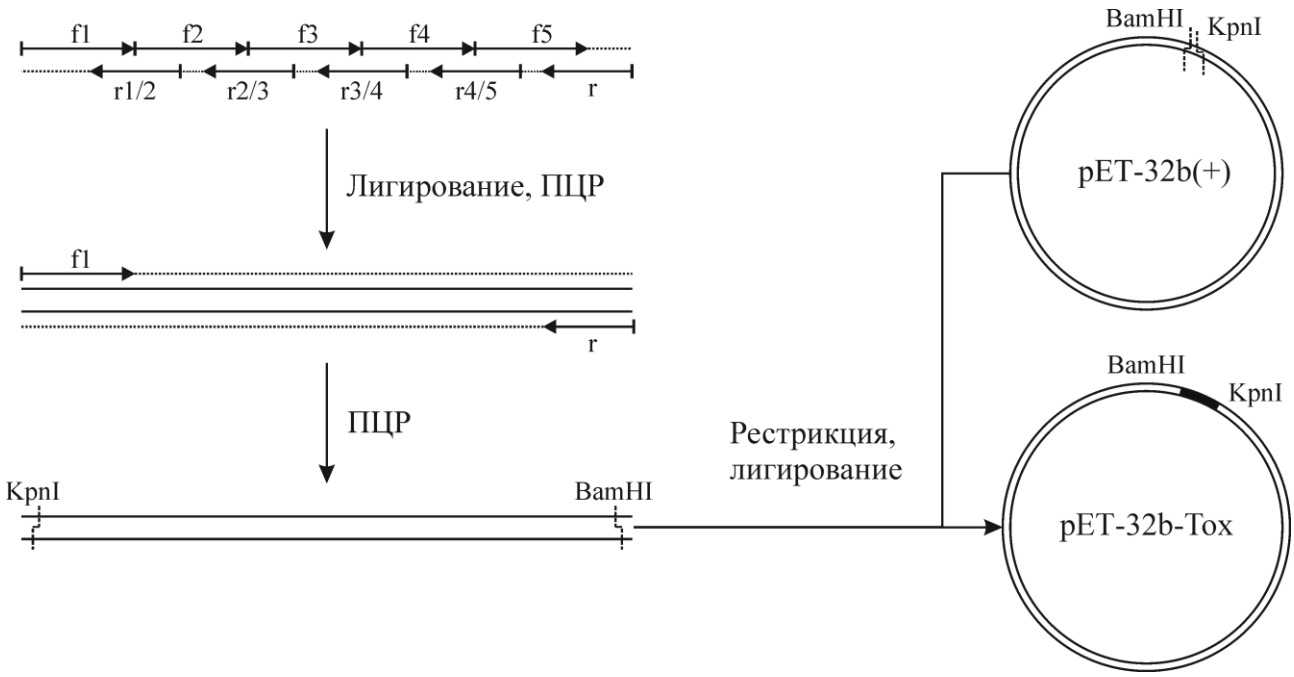
Итак, с учетом изложенных соображений мы получали:

- линейные пептиды с помощью твердофазного синтеза;
- дисульфид-богатые пептиды — в бактериальной системе экспрессии (*E. coli*, в виде гибридных белков с Trx). Для отсоединения целевых пептидов от белка-помощника мы использовали энтеропептидазу; если же токсин не содержал остатков метионина, мы проводили расщепление с помощью BrCN.

На рисунке 44 показана общая схема получения генетической конструкции, использовавшейся для экспрессии. ДНК, кодирующую целевой токсин (Tox), получали из синтетических олигонуклеотидных фрагментов с помощью лигирования и/или ПЦР (см. пример на рисунке 45). Кроме того, кодирующую последовательность дополняли необходимым сайтом протеолиза с N (5')-конца и фланкировали сайтами рестрикции. В качестве вектора мы использовали коммерчески доступную плазмиду pET-32b(+), в которую с помощью рестрикции и лигирования внедряли синтезированную на предыдущем этапе ДНК. В этой плазмиде имеются: (а) ген устойчивости к ампициллину, (б) ген Trx, находящийся под контролем (в) T7 промотора и (г) *lac*-оператора, снабженный (д) His-тагом и (е) полилинкером. В результате мы получали бактериальный экспрессионный вектор pET-32b-Tox, несущий ген гибридного белка Trx-Tox с His-тагом под контролем T7 промотора и *lac*-оператора; его карта приведена на рисунке 46. Последовательность Tox в составе гибридного белка отделена от Trx непосредственно предшествующим остатком метионина или сайтом узнавания энтеропептидазы (EK).

На рисунке 47 приведена электрофореграмма, иллюстрирующая экспрессию генов различных Trx-Tox. В данном случае использовали штамм *E. coli* BL21(DE3), а в вектор pET-32b(+) по одинаковым сайтам рестрикции (KpnI и BamHI) были введены последовательности ДНК, кодирующие различные токсины паукообразных — объекты нашего исследования. Для сравнения показан также результат экспрессии гена Trx без вставки Tox.

Рисунок 44. Схема получения бактериального экспрессионного вектора со вставкой гена целевого токсина. Олигонуклеотидные фрагменты обозначены стрелками. Вставка целевого гена в плазмиде выделена черным.



В ходе работы мы столкнулись с двумя обстоятельствами:

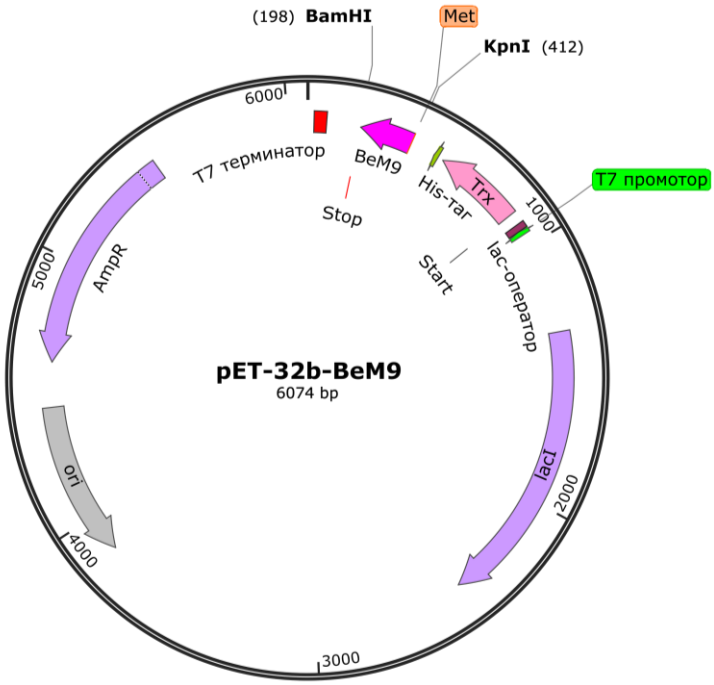
(1) В составе выбранного вектора в области линкера между Trx и сайтами рестрикции имеется последовательность, кодирующая дипептид ER, который узнается и гидролизуется энтеропептидазой. В некоторых случаях эффективность гидролиза по этому сайту превосходит таковую для целевой последовательности. Это усложняет весь процесс, поскольку возникает необходимость дальнейшей оптимизации условий реакции и отделения еще двух продуктов: короткого пептида, соответствующего последовательности между ER и целевым сайтом, и удлиненного на этот пептид целевого токсина. Для избежания этих сложностей мы внесли мутацию в вектор pET-32b(+), заменив аргининовый кодон на глициновый. Теперь упомянутый дипептид не затрагивается энтеропептидазой, и дополнительные продукты не образуются.

(2) Энтеропептидаза эффективнее расщепляет пептидную связь, образованную аргинином, нежели лизином. Аналогичные наблюдения опубликовали наши коллеги и другие исследователи (1008, 1009). Поэтому «классический» сайт протеолиза DDDDK мы поменяли на DDDDR. Итак, в качестве основного инструмента для получения рекомбинантных пептидов мы использовали бактериальный экспрессионный вектор pET-32b(+) с мутацией одного кодона в открытой рамке считывания Trx, а для отщепления целевого пептида от белка-помощника мы вводили в состав гибрида модифицированный сайт энтеропептидазы с остатком аргинина.

Рисунок 45. ДНК, кодирующая токсин BeM9, использованная для клонирования. Сверху и снизу стрелками показаны олигонуклеотидные фрагменты, бравшиеся в синтез. Дополнительный метиониновый кодон отмечен оранжевым прямоугольником, стоп-кодон — звездочкой в красном квадратике. Указаны сайты рестрикции KpnI и BamHI. Сверху линейкой показан масштаб в п.н. Снизу от нуклеотидной последовательности приведена кодируемая аминокислотная последовательность со своим масштабом в а.о. Рисунок показывает рабочий экран (“Sequence” в программе SnapGene.

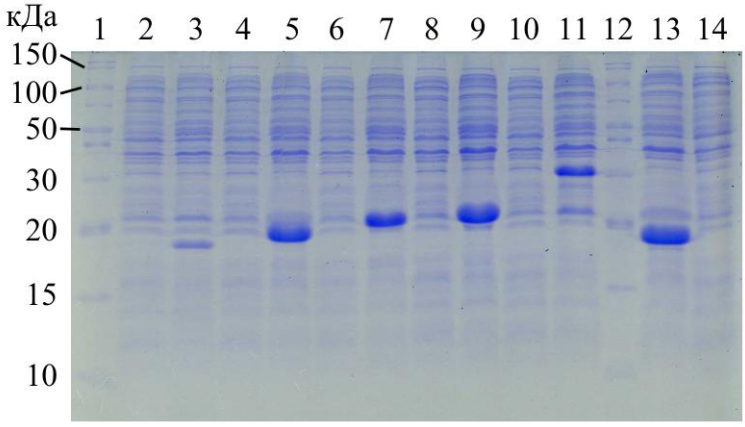


Рисунок 46. Карта вектора pET-32b(+) со вставкой гена токсина BeM9.



На карте обозначены:
Общая длина (п.н.) под названием вектора. Серая стрелка ori — ориджин репликации; бледно-сиреневая стрелка AmpR — ген устойчивости к ампициллину (β-лактамазы); lacI — лактозного репрессора; розовая стрелка Trx — ген тиоредоксина; сиреневая стрелка BeM9 — ген токсина. Еле заметная зеленая стрелка — T7 промотор; бледно-зеленая — His-таг. Красный прямоугольник — T7 терминатор. Зеленая (Start) и красная (Stop) линии внутри обозначают позиции стартового и стоп-кодона. Снаружи отмечены сайты рестрикции KpnI и BamHI, использованные для вставки гена токсина, а также кодон метионина (Met), введенный непосредственно с 5'-конца этого гена.

Рисунок 47. Электрофоретическое разделение белков *E. coli* BL21(DE3), трансформированных различными pET-32b-Tox, до и после индукции экспрессии трансгена. Использовали ДСН-ПААГ (20%). На дорожках 1 и 12 нанесены молекулярные стандарты (по 5 мкл PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder, Thermo Fisher Scientific), соответствующие Мм указаны слева.

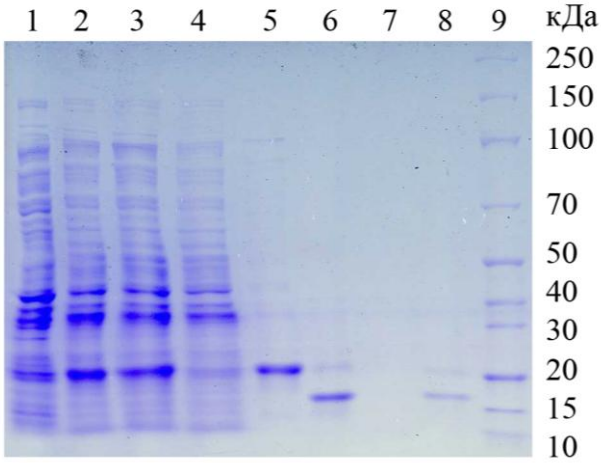


На дорожку 2 нанесен лизат клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду pET-32b-Ltc 2a, до индукции; 3 — лизат клеток после индукции экспрессии 0,1 мМ ИПТГ;
4, 5 — аналогично для MeKTx13-3;
6, 7 — ω-Lsp-IA; 8, 9 — BeM9;
10, 11 — CpTx 1a; 13 — вектор pET-32b(+) без вставки, после индукции; 14 — до индукции.

На рисунке 48 приведена электрофореграмма, показывающая результат последовательных операций при получении рекомбинантного дисульфид-содержащего пептидного токсина. В качестве примера взят MeKTx13-3 (подробнее о нем речь пойдет ниже в разделе «Блокаторы K^+ каналов из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*»). А на рисунке 49 показан профиль хроматографического разделения гидролизата слитного белка Trx-MeKTx13-3 энтеропептидазой, в результате которого получен препарат целевого продукта с чистотой >95%.

Рисунок 48. Электрофоретическое разделение образцов, отобранных в ходе получения рекомбинантного MeKTx13-3. Использовали ДСН-ПААГ (градиент 4–15%). На дорожку 9 нанесены молекулярные стандарты (5 мкл PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder), Мм указаны спарва.

На дорожку 1 нанесен лизат клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду pET-32b-MeKTx13-3, до индукции; 2 — лизат клеток после индукции экспрессии 0,1 мМ ИПТГ;
3 — водорастворимая фракция (после осаждения осадка центрифугированием); 4 — фракция, не удерживаемая на аффинном сорбенте HisPur (Thermo Fisher Scientific); 5 — очищенный гибридный белок Trx-MeKTx13-3; 6 — гидролизат гибридного белка после обработки энтеропептидазой; 7, 8 — фракции 1 и 2, полученные с помощью ОФ-ВЭЖХ (см. рисунок 49).



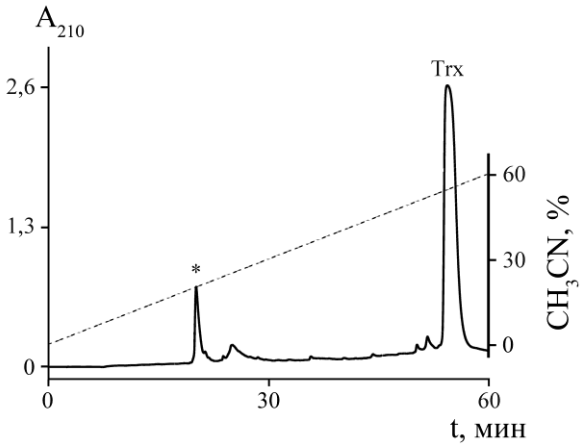


Рисунок 49. Очистка рекомбинантного МеКТх13-3. ОФ-ВЭЖХ гидролизата слитного белка Trx-МеКТх13-3, расщепленного энтеропептидазой, на колонке Jupiter C_5 (4,6×150 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Звездочкой отмечен пик, соответствующий искомому МеКТх13-3. Trx — фракция тиоредоксина.

3.4. Анализ активности токсинов в отношении ионных каналов

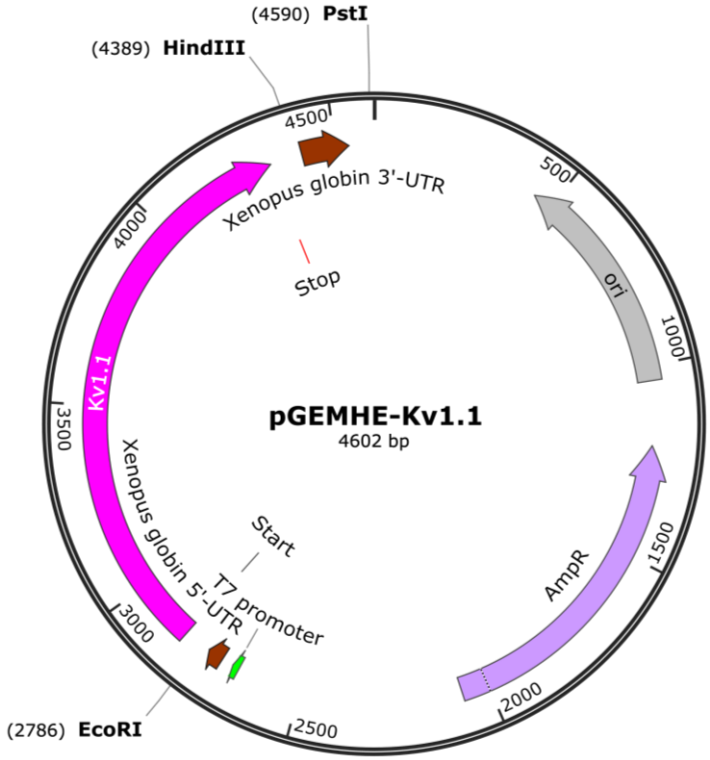
Активность изучаемых пептидов в отношении ионных каналов мы анализировали традиционными методами электрофизиологии: (а) двухэлектродной фиксацией потенциалов на ооцитах *X. laevis,* экспрессирующих гены каналов, (б) локальной фиксацией потенциалов (пэтч-клампом) на выделенных нейронах или других клетках млекопитающих, экспрессирующих гены каналов.

На рисунке 50 показана карта вектора pGEMHE со вставкой гена $rK_v1.1$, отмечены важные элементы. Ген ионного канала фланкирован 5' и 3'-нетранслируемыми областями (НТО), заимствованными из гена β-глобина *X. laevis*: показано, что они увеличивают эффективность трансляции соответствующей мРНК (1010), в том числе кодирующей субъединицу ионного канала (834). Для линеаризации используется сайт рестрикции, расположенный с 3'-стороны по отношению к транслируемому гену, а для эффективной *in vitro* транскрипции имеется Т7 промотор.

В наиболее простом и частом случае для измерения токов через изучаемые каналы методом двухэлектродной фиксации потенциалов мы получали мРНК, кодирующую субъединицы каналов, с помощью процедуры *in vitro* транскрипции. Эту мРНК мы вводили в ооциты *X. laevis* с помощью микроинжектора. В наиболее простом случае спустя сутки-двое через мембрану ооцитов регистрировались токи, опосредованные соответствующими каналами, с амплитудой порядка сотен нА. На рисунке 6 показана типичная запись токов, опосредованных $rK_v1.1$, в контрольных условиях и после приложения токсина МеКТх13-3, блокирующего пору канала.

Иногда приходилось прибегать к дополнительным ухищрениям, чтобы добиться экспрессии каналов на приемлемом уровне. В частности, мы: (а) увеличивали количество вводимой в ооциты мРНК или (б) время инкубации после инъекции; (в) использовали вспомогательные (β) субъединицы, увеличивающие экспрессию основных канальных субъединиц (α).

Рисунок 50. Карта вектора pGEMHE со вставкой гена канала rK$_v$1.1.



Обозначения на карте как на рисунке 46, кроме того:
Сиреневая стрелка Kv1.1 — ген α-субъединицы канала; коричневые стрелки Xenopus globin 5' и 3'-UTR — 5' и 3'-НТО из гена β-глобина *X. laevis*. Снаружи отмечены сайты рестрикции: EcoRI и HindIII использовались для вставки гена канала, PstI необходим для линеаризации вектора с целью дальнейшей *in vitro* транскрипции.

Большая часть экспериментов на ооцитах была проведена в лаборатории Я. Титгата в Лёвенском университете (Бельгия; в том числе и чаще при непосредственном участии диссертанта и его студентов и аспирантов). В последнее время мы проводим эти измерения главным образом в нашей лаборатории. В ряде случаев в качестве тест-системы использовались другие клетки: HEK293, COS7, CHO или выделенные нейроны — тогда измерения проводились с помощью пэтч-клампа. Эти эксперименты выполнялись в сотрудничестве с рядом лабораторий (указаны далее в тексте и в благодарностях). У каждой в арсенале имеются особые приемы и подходы — для получения наиболее качественных результатов; наш опыт показывает, что важны не столько специфические тонкие различия в протоколах, сколько наличие культуры эксперимента, скрупулезное выполнение поставленных методик.

3.5. Токсины паукообразных, воздействующие на K^+ каналы

K^+ каналы — классический объект структурной биологии и биофизики мембран, а природные токсины, селективно воздействующие на эти каналы, показали себя мощными исследовательскими инструментами (см. Обзор литературы, «Токсины, воздействующие на K^+ каналы»). K^+ каналы наиболее разнообразны (в геноме человека 80 генов кодируют только субъединицы, формирующие пору этих каналов, а еще есть дополнительные субъединицы, и более распространены гетеромерные каналы), и для их изучения необходимы селективные лиганды, при этом лишь для сравнительно небольшого числа изоформ такие соединения известны сегодня. Более того, множится число известных заболеваний, причиной которых служит дисфункция K^+ каналов. Все эти соображения обусловили наш интерес к получению их новых лигандов.

3.5.1. Kalium — база данных полипептидных лигандов K^+ каналов

На первом этапе мы решили сделать исчерпывающий обзор уже известных полипептидных лигандов K^+ каналов. Дело в том, что достаточно полная база данных низкомолекулярных лигандов существует, это Guide to PHARMACOLOGY (https://www.guidetopharmacology.org/) под эгидой Международного союза по фундаментальной и клинической фармакологии (International Union of Basic and Clinical Pharmacology, IUPHAR). Разнообразие же именно полипептидных лигандов, по-видимому, наиболее широко, однако отсутсвует их систематизация.

Мы решили ликвидировать это отставание и разработали специализированную базу данных Kalium, посвященную полипептидным лигандам K^+ каналов (https://kaliumdb.org/). Анализ литературных данных мы провели по базе данных PubMed (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/), его результаты частично представлены выше в Обзре литературы и опубликованы в обзорной статье (913). Кроме того, мы выполнили анализ UniProt и его специализированной части VenomZone, откуда скомпилировали данные обо всех общедоступных последовательностях полипептидных блокаторов K^+ каналов. Сведения об известных пространственных структурах со ссылками на PDB и расположение дисульфидных связей также были получены из UniProt.

Все данные мы процессировали вручную, удаляя: (1) полипептиды с частичной последовательностью; (2) записи, основанные только на данных анализа нуклеотидных последовательностей. Частично секвенированные пептиды были исключены, поскольку они не могут быть использованы напрямую для номенклатуры или в дальнейших исследованиях и вносят путаницу во всю классификацию. Пептиды, выведенные из нуклеотидных последовательностей (прежде всего из транскриптомных данных), без проверки на уровне белка, также

были исключены, поскольку: (а) они менее интересны для исследователей; (б) включение таких записей в UniProt зависит от способа представления данных, но не от самого факта их наличия; (в) количество транскриптомных исследований быстро растет, однако получаемые данные характеризуются низкой точностью.

Кроме того, мы обновили классификацию токсинов скорпионов (KTx) по Титгату-Поссани (см. раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов» Обзора литературы) (157, 913): ввели обозначения токсинов, принадлежащих к β-семейству (β-KTx), и добавили в номенклатуру новые λ и ε-семейства (λ-KTx и ε-KTx). Мы классифицировали β-KTx аналогично молекулам из α-KTx: β-KTx 1.1, β-KTx 1.2 и т.д. Мы ввели семейства λ-KTx, содержащее токсины с мотивом ICK (324, 325), а также ε-KTx, содержащее пептиды с аналогичным расположением дисульфидов, но без регулярной вторичной структуры (326), в общую классификацию с аналогичной номенклатурой.

Во многих случаях экспериментально измеренные Мм природных полипептидов недоступны. По этой причине средние значения Мм были рассчитаны для каждой записи Kalium. Задача точного расчета Мм сложнее, чем кажется, из-за ко- и посттрансляционных модификаций. Мы приняли во внимание следующие модификации: отщепление сигнального пептида и пропоследовательности (обычная проблема при использовании автоматического расчета Мм в UniProt), циклизация N-концевого глутамина, С-концевое амидирование, образование дисульфидных мостиков, N-формилирование лизина, γ-карбоксилирование глутаминовой кислоты и γ-гидроксилирование пролина. Для расчетов использовались таблицы масс и модификаций аминокислот из инструмента FindMod сервера ExPASy (таблица 26) (1011, 1012). Вклад образования дисульфидных связей учитывался путем вычитания двух атомных масс водорода из массы двух цистеинов. Мм в случае О-гликозилированных полипептидов рассчитывались только для агликонов (полипептидных частей).

Таблица 26. Источник точных значений масс аминокислот и модификаций.

Модификация	Ссылка на точную массу
Таблица масс а.о.	https://web.expasy.org/findmod/findmod_masses.html#aas
Циклизация N-концевого глутамина в пироглутаминовую кислоту	https://web.expasy.org/findmod/PYRRE.html
С-Концевое амидирование	https://web.expasy.org/findmod/AMID.html
N^{ε}-Формилирование лизина	https://web.expasy.org/findmod/FORM.html
γ-Карбоксилирование глутаминовой кислоты	https://web.expasy.org/findmod/GGLU.html
γ-Гидроксилирование пролина	https://web.expasy.org/findmod/HYDR.html

Латинское название каждого организма-источника было связано ссылкой с записью в базе данных UniProt Taxonomy (эквивалент NCBI Taxonomy Browser; http://www.uniprot.org/taxonomy/). Подробные данные об активности были добавлены вручную из литературы и связаны с соответствующими ссылками в PubMed или DOI. Номенклатура молекулярных мишеней была принята в соответствии с рекомендациями IUPHAR, где это возможно.

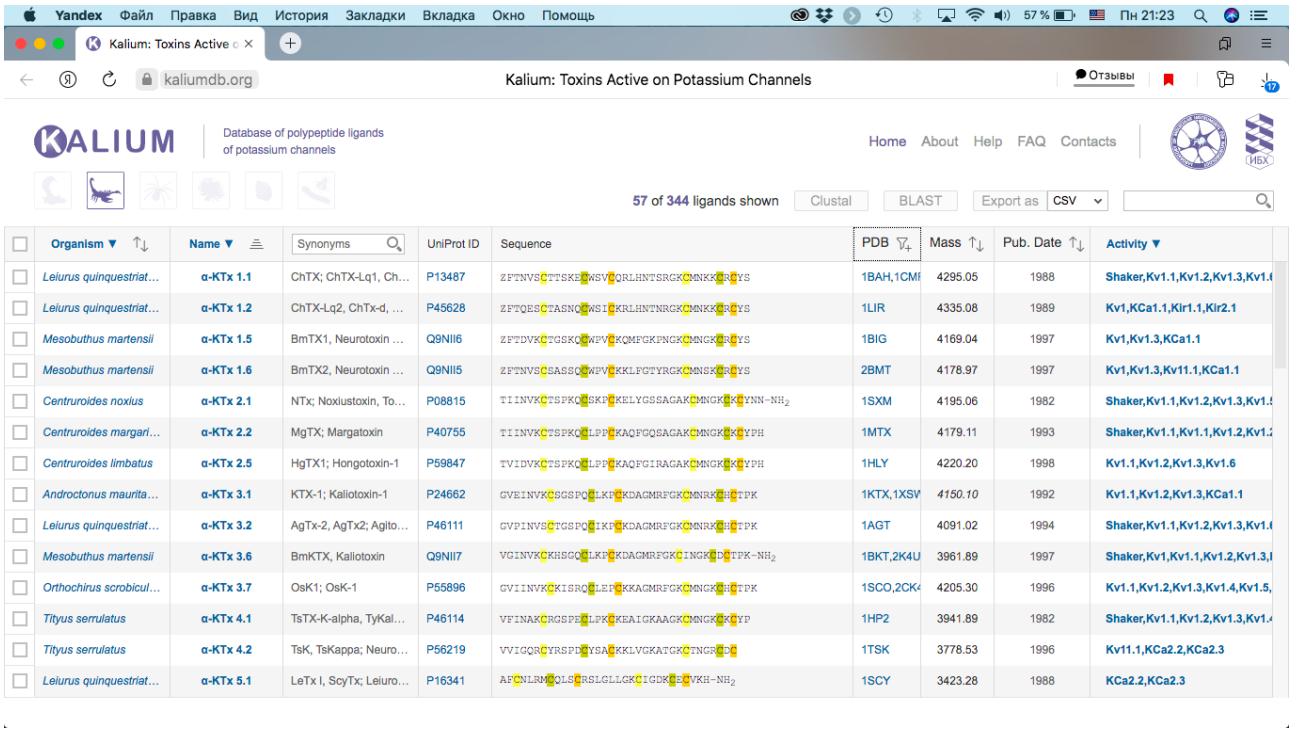
Kalium — это веб-приложение OpenUI 5 Model-View-Controller, построенное на веб-платформе Django и движке базы данных SQLite3. Веб-интерфейс состоит из одной динамически генерируемой страницы HTML5 с данными JSON, асинхронно получаемыми с сервера через запросы AJAX. Стандартный интерфейс веб-администратора Django используется для доступа к данным и их настройки. Просмотр возможен с использованием всех современных браузеров с поддержкой HTML5 (настольные и мобильные варианты). База данных обновляется автоматически из UniProt. Каждое обновление требует ручного подтверждения администратором вновь загруженной информации и добавления данных об активности новых лигандов. Программирование осуществлено Н.А. Крыловым (лаборатория моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН).

Интерфейс базе данных Kalium сосредоточен вокруг основной таблицы с данными о лигандах K^+ каналов, по умолчанию отсортированных по группе и названию организмов-источников, названию семейства полипептидов и традиционному названию. Таблица поддерживает поиск, упорядочивание и фильтрацию по нескольким столбцам, а также выбор из нескольких строк. Реализована возможность перехода к поиску по алгоритму BLAST и выравниванию последовательностей с помощью программы Clustal Omega через веб-сервер UniProt, а также экспорт данных о токсинах, выбранных пользователем. Подробная информация, включая детализированные данные об активности («Карточка лиганда»), доступна для каждой записи в виде специального всплывающего окна.

Главное окно Kalium представлено одной большой общей таблицей, в которой собраны все данные о лигандах K^+ каналов из различных источников (рисунок 51, таблица 27). Ссылки «На главную» (“Home”), «О нас» (“About”), «Справка» (“Help”), «Часто задаваемые вопросы» (“FAQ”) и «Контакты» (“Contacts”), расположенные в правом верхнем углу, ведут на страницы, содержащие информацию о разработчиках и советы. Под этими ссылками находятся кнопки “Clustal”, “BLAST” и «Экспортировать как» (“Export as”, раскрывающийся список формата файла экспорта) и поле поиска. Кнопки (иконки) выбора организма-источника расположены под логотипом Kalium в верхнем левом углу. Нажатие одной или нескольких кнопок позволяет фильтровать данные в основной таблице по группам организмов-источников: змеи, скорпионы, пауки, морские анемоны, улитки-конусы и прочие. Груп-

па «Прочие» включает лиганды K^+ каналов из грибов, червей, пчел, ос, многоножек, ящериц и человека.

Рисунок 51. Главная страница Kalium (https://kaliumdb.org/). Верхняя панель состоит из логотипа базы данных (реализующего функцию кнопки «Домой») и ссылок на страницы «На главную» (“Home”), «О нас» (“About”), «Справка» (“Help”), «Часто задаваемые вопросы» (“FAQ”) и «Контакты» (“Contacts”). Вторая панель содержит кнопки выбора организмов, индикатор количества отображаемых и выбранных записей, кнопки “Clustal”, “BLAST” и «Экспортировать как» (“Export as”), а также строку поиска. Основная часть базы данных представлена таблицей (подробное описание в тексте). На рисунке показаны результаты для запроса: показать записи, в которых организмом-источником является скорпион, сортировать по официальному названию, показать только лиганды с исследованной пространственной структурой.



Organism	Name	Synonyms	UniProt ID	Sequence	PDB	Mass	Pub. Date	Activity
Leiurus quinquestriat…	α-KTx 1.1	ChTX; ChTX-Lq1, Ch…	P13487	ZFTNVSCTTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCYS	1BAH,1CMI	4295.05	1988	Shaker,Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.6
Leiurus quinquestriat…	α-KTx 1.2	ChTX-Lq2, ChTx-d, …	P45628	ZFTQESCTASNCCWSICKRLHNTNRGKCMNKKCRCYS	1LIR	4335.08	1989	Kv1,KCa1.1,Kir1.1,Kir2.1
Mesobuthus martensii	α-KTx 1.5	BmTX1, Neurotoxin …	Q9NII6	ZFTDVKCTGSKCCWPVCKQMFGKPNGKCMNGKCRCYS	1BIG	4169.04	1997	Kv1,Kv1.3,KCa1.1
Mesobuthus martensii	α-KTx 1.6	BmTX2, Neurotoxin …	Q9NII5	ZFTNVSCSASSCCWPVCKKLFGTYRGKCMNSKCRCYS	2BMT	4178.97	1997	Kv1,Kv1.3,Kv11.1,KCa1.1
Centruroides noxius	α-KTx 2.1	NTx; Noxiustoxin, To…	P08815	TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN-NH_2	1SXM	4195.06	1982	Shaker,Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.5
Centruroides margari…	α-KTx 2.2	MgTX; Margatoxin	P40755	TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH	1MTX	4179.11	1993	Shaker,Kv1.1,Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3
Centruroides limbatus	α-KTx 2.5	HgTX1; Hongotoxin-1	P59847	TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMNGKCKCYPH	1HLY	4220.20	1998	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.6
Androctonus maurita…	α-KTx 3.1	KTX-1; Kaliotoxin-1	P24662	GVEINVKCSGSPQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	1KTX,1XSW	*4150.10*	1992	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,KCa1.1
Leiurus quinquestriat…	α-KTx 3.2	AgTx-2, AgTx2; Agito…	P46111	GVPINVSCTGSPQCIKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK	1AGT	4091.02	1994	Shaker,Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.6
Mesobuthus martensii	α-KTx 3.6	BmKTX, Kaliotoxin	Q9NII7	VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK-NH_2	1BKT,2K4U	3961.89	1997	Shaker,Kv1,Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.6
Orthochirus scrobicul…	α-KTx 3.7	OsK1; OsK-1	P55896	GVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK	1SCO,2CK4	4205.30	1996	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.4,Kv1.5,Kv1.6
Tityus serrulatus	α-KTx 4.1	TsTX-K-alpha, TyKal…	P46114	VFINAKCRGSPECLPKCKEAIGKAAGKCMNGKCKCYP	1HP2	3941.89	1982	Shaker,Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.4
Tityus serrulatus	α-KTx 4.2	TsK, TsKappa; Neuro…	P56219	VVIGQRCYRSPDCYSACKKLVGKATGKCINGRCDC	1TSK	3778.53	1996	Kv11.1,KCa2.2,KCa2.3
Leiurus quinquestriat…	α-KTx 5.1	LeTx I, ScyTx; Leiuro…	P16341	AFCNLRMCQLSCRSLGLLGKCIGDKCECVKH-NH_2	1SCY	3423.28	1988	KCa2.2,KCa2.3

Флажки в левой части общей таблицы позволяют выбрать одну или несколько записей; для выбора всех записей пользователи могут один раз щелкнуть заголовок столбца. Выбор нескольких (двух или более) записей позволяет выполнить запрос на выравнивание в программе Clustal Omega. Чтобы отправить команду на построение выравнивания последовательностей, после выбора записей пользователю необходимо нажать кнопку «Clustal», результаты появятся на новой вкладке браузера. Точно так же, чтобы отправить поисковый запрос по алгоритму BLAST, пользователь должен нажать кнопку «BLAST»; результаты будут отображаться на отдельной вкладке браузера для каждой выбранной записи.

Другие элементы управления таблицы помещены в заголовки и служат для фильтрации интересующей информации, как описано далее; в Kalium 2.0 доступна многопараметрическая фильтрация.

(а) Заголовок «Организм» (“Organism”) — элемент управления для фильтрации и сортировки записей по латинскому названию видов-источников, перечисленных в соответствии с текущей биологической классификацией. Один щелчок по заголовку столбца открывает меню, где пользователь может выбрать один или несколько видов для фильтрации полного набора данных. Латинские имена в теле таблицы связаны с базой данных UniProt Taxonomy, что обеспечивает актуальность используемой классификации.

(б) Заголовок «Название» (“Name”) используется для фильтрации и сортировки записей по семействам и подсемействам полипептидов в соответствии с текущей номенклатурой. По состоянию на июнь 2021 года опция фильтрации активна только для семейств токсинов скорпионов, поскольку номенклатура только этих соединений является наиболее стандартной, понятной и общепризнанной — это обновленная номенклатура Титгата-Поссани, см. выше (157, 913). Щелчок на «Название» позволяет выбрать семейство токсинов из раскрывающегося меню. При нажатии на название токсина в теле таблицы открывается «Карточка лиганда».

(в) Заголовок «Синонимы» применяется для поиска / фильтрации тривиальных названий полипептидов. Многие исследователи используют только определенные тривиальные названия, поэтому их включение в Kalium необходимо.

(г) Щелчок по идентификатору “UniProt” ведет на соответствующие страницы базы данных UniProt.

(д) Заголовок “PDB” — элемент управления для фильтрации записей по идентификатору PDB (при его наличии). При нажатии этой кнопки фильтра будут отображаться только записи с разрешенной пространственной структурой. Все идентификаторы PDB связаны с соответствующими страницами этой базы данных.

(е) Заголовок «Масса» (“Mass”) служит для сортировки записей по Мм. Одно нажатие на эту кнопку отсортирует записи по возрастанию масс, следующее нажатие — по убыванию.

(ж) Заголовок «Дата публикации» (“Publication date”) используется для сортировки записей по дате, когда последовательность была впервые опубликована.

(з) Заголовок «Активность» (“Activity”) — элемент управления для фильтрации и сортировки записей по информации о действии на разные K^+ каналы. Один щелчок по заголовку столбца открывает раскрывающееся меню, в котором пользователи могут выбрать один или несколько каналов. Заголовок используется для сортировки записей по конкретным

мишеням. Для получения подробной информации можно открыть «Карточку лиганда», щелкнув название канала.

Таблица 27. Описание общей таблицы главной страницы Kalium.

Поле таблицы	Описание
Организм (“Organism”)	Латинское название организма-источника
Название (“Name”)	Номенклатурное или наиболее используемое название полипептида
Синонимы (“Synonyms”)	Традиционные названия полипептида
UniProt ID	Уникальный идентификационный номер в базе данных UniProt
Последовательность (“Sequence”)	Аминокислотные последовательности зрелых полипептидов представлены однобуквенным кодом. $–NH_2$, C-концевое амидирование; Z обозначает N-концевую пироглутаминовую кислоту; O — 4-гидроксипролин; **Е** — 4-карбоксиглутаминовая кислота; **К** —N^6-формиллизин; **T**, **S** — O-гликозилированный треонин и серин; **W** — D-триптофан. Остатки цистеина окрашены; разные цвета указывают на расположение дисульфидных связей.
PDB	Уникальные идентификационные номера в базе данных PDB (при наличии)
Масса (“Mass”)	Средняя Мм зрелого полипептида рассчитана с учетом посттрансляционных модификаций (см. таблицу 26). Мм O-гликозилированных полипептидов рассчитаны только для агликонов и отмечены знаком «+».
Дата публикации (“Publication date”)	Дата первой публикации полипептидной последовательности
Активность (“Activity”)	Список всех мишеней, на которых когда-либо тестировался полипептид

Для каждого полипептида подробная информация суммирована в «Карточке лиганда» (рисунок 52), которая открывается при нажатии на название полипептида в поле «Имя» (“Name”) общей таблицы или канала в поле «Активность» (“Activity”). Вся информация, представленная в общей таблице, дублируется в «Карточке лиганда» в развернутом виде (см. пояснения в таблицах 27 и 28). Для удобства информация в полях «Организм» (“Organism”), “UniProt ID”, “PDB” и “Ref. (PubMed / DOI)” связана с соответствующими веб-страницами.

В Kalium предусмотрена возможность выгрузки текстового файла, содержащего данные выбранных записей. Для экспорта пользователям рекомендуется выбрать формат файла (CSV или TXT) в раскрывающемся списке и нажать кнопку «Экспортировать как»; итоговый файл, содержащий данные из выбранных записей, будет создан и отправлен в браузер пользователя. Файл создается в формате с разделением на столбцы (имя по умолчанию “export.csv”) или табуляцией (“export.txt”). Для нескольких выбранных записей файл состоит из сокращенных карточек лигандов, добавленных по очереди. Каждая сокращенная карточка

лиганда включает идентификатор UniProt, последовательность, список идентификаторов PDB (если есть), Мм и механизм действия, за которыми следует таблица экспериментально определенных данных об активности (если есть).

Создание и расширение Kalium описано нами в трех публикациях (1013-1015). В результате проведенного нами анализа данных, представленных в Kalium, оказалось, что к маю 2019 г. известна первичная структура 340 полипептидных лигандов K^+ каналов (таблица 29), почти что все из которых получены из яда животных, при этом 193 (57%) — из яда скорпионов, еще 50 (15%) — из яда пауков. Приведенная статистика, с одной стороны, «субъективна» и отражает повышенный интерес исследователей к токсинам скорпионов. С другой стороны, этот интерес обоснован, поскольку яд скорпионов служит источником множества высокоаффинных и селективных блокаторов K^+ каналов (KTx), которые сыграли важнейшую роль в изучении этих белков (см. Обзор литературы, разделы «Токсины, воздействующие на K^+ каналы» и «Токсины паукообразных как молекулярные инструменты исследования нервной системы»). Пока писалась эта работа, мы подготовили наиболее сущесвенное расширение — Kalium 3.0, включившее также многочисленные искусственные производные природных лигандов K^+ каналов (1015). Общий вид и функционал базы данных сохранился. Основные выводы, приведенные здесь, не были пересмотрены.

Рисунок 52. Вид «Карточки лиганда» базы данных Kalium. В качестве примера показана карточка BeKm-1. Вся информация, представленная в общей таблице, дублируется здесь с некоторыми дополнениями. Данные об активности сведены в таблицу, расположенную в нижней части карточки.

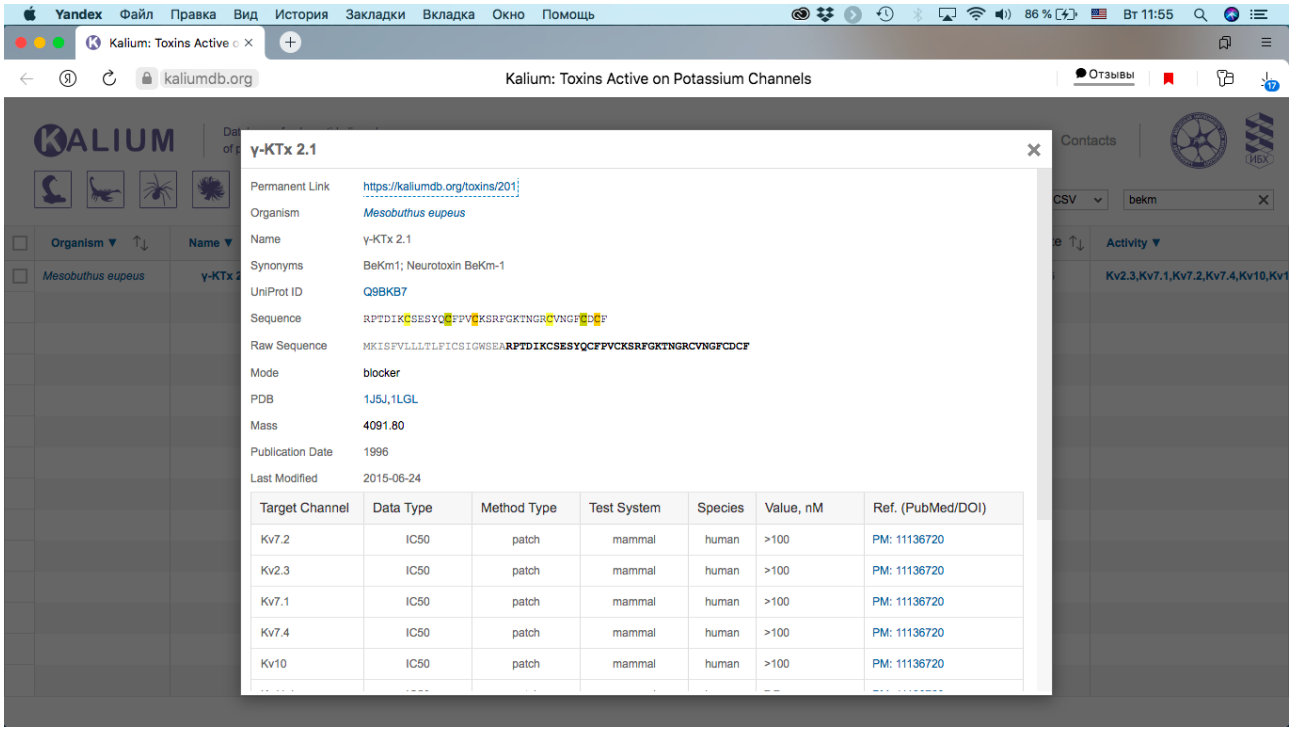


Таблица 28. Содержание «Карточки лиганда» базы данных Kalium. Записи, дублирующие информацию общей таблицы главной страницы, описаны в таблице 27.

Поле	Описание
Постоянная ссылка (“Permanent link”)	Уникальная ссылка на карточку лиганда, которую можно использовать для цитирования
Незрелая последовательность (“Raw sequence”)	Последовательность полипептида-предшественника (при наличии)
Последнее изменение (“Last modified”)	Дата последнего изменения записи
Механизм (“Mode”)	Механизм действия лиганда на K^+ каналы: блокатор (“blocker”), блокирует ионный ток, «закупоривая» пору канала; модификатор (“modifier”), воздействует на воротный механизм канала и уменьшает ионные токи за счет захвата сенсора потенциала; активатор (“activator”), увеличивает ионные токи; или с неопределенным механизмом (“undefined”).
Каналы-мишени (“Target channel”)	K^+ каналы, которые использовались для тестирования активности токсина, обозначенные в соответствии с рекомендациями IUPHAR (https://www.guidetopharmacology.org/), за исключением следующих: K_xa.b/K_xc.d — гетеромерные каналы; Shaker, Shab — каналы плодовой мушки *Drosophila melanogaster*; Shaker-IR — канал Shaker с удаленными воротами быстрой инактивации N-типа; KscA-Shaker — химера прокариотического канала KscA из бактерий *Streptomyces lividans* и Shaker; K_vAP — канал археи *Aeropyrum pernix*; TSha1 — Shaker-подобный канал форели *Oncorhychus mykiss*.
Тип данных (“Data type”)	Тип приводимых данных: константа диссоциации (K_d), константа ингибирования (K_i), концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}) или полумаксимальная эффективная концентрация (EC_{50}).
Метод (“Method type”)	Экспериментальный метод получения приводимых данных: “radio”, радиолигандный анализ; “flux”, анализ выхода рубидия / таллия; “patch”, электрофизиология с использованием техники пэтч-кламп; “volt”, электрофизиология с использованием техники двухэлектродной фиксации потенциала.
Тест-система (“Test system”)	Тип клеток, использованных в эксперименте: “insect”, клетки насекомых; “*Xenopus* oocyte”, ооциты лягушек *Xenopus*; “mammalian”, клетки млекопитающих; “snail”, нейроны моллюска *Helix pomatia*.
Вид (“Species”)	Организм-источник ионного канала, который использовался для измерений. Чаще всего исследуются каналы мух, крыс, мышей и человека. Пустое поле означает, что происхождение ионного канала в публикации не указано.
Значение, нМ (“Value, nM”)	Численное значение активности полипептида. Эти данные собраны вручную из литературы. Значения отображаются в следующих форматах: X — значение K_d, K_i, IC_{50} или EC_{50} в нМ; ~X — приблизительное значение в нМ; ≥X — лиганд не действует до значения X; X / Y — означает, что лиганд в концентрации X снижает ионный ток через каналы на Y процентов.
Ссылка (“Ref. (PubMed / DOI)”)	PubMed ID или DOI статьи с опубликованными данными.

Таблица 29. Статистика записей базы данных Kalium 2.0.

Организмы-источники		Число записей
Скорпионы		193
Пауки		50
Морские анемоны		35
Змеи		29
Улитки-конусы		19
Другие	Многоножки	5
	Перепончатокрылые	4
	Нематоды	2
	Грибы	1
	Человек	1
	Ящерицы	1
Всего		340

Мы решили исследовать многообразие KTx на примере имеющихся в нашей коллекции ядов среднеазиатских скорпионов: малого азиатского (пестрого) скорпиона *Mesobuthus eupeus* [NCBI/UniProt taxon identifier: 504442; недавно переименован в *Mesobuthus thersites* (1016), 2923069] и черного скорпиона *Orthochirus scrobiculosus* (6892; оба — из семейства Buthidae). Эти виды исследовались ранее под руководством Е.В. Гришина; в частности, из яда *M. eupeus* был выделен BeKm-1 — селективный блокатор hERG (318) (см. подробно в Обзоре литературы), а из яда *O. scrobiculosus* — OSK1, один из наиболее изученных KTx (333). Предварительного тестирования активности этих ядов на K^+ каналах не требовалось, мы сразу перешли к характеристике KTx.

3.5.2. Блокаторы K^+ каналов из яда скорпиона Mesobuthus eupeus

Характеристику многообразия KTx этого яда мы осуществили двумя способами: наиболее традиционным, т.е. путем выделения токсинов из яда, а также с помощью анализа транскриптома.

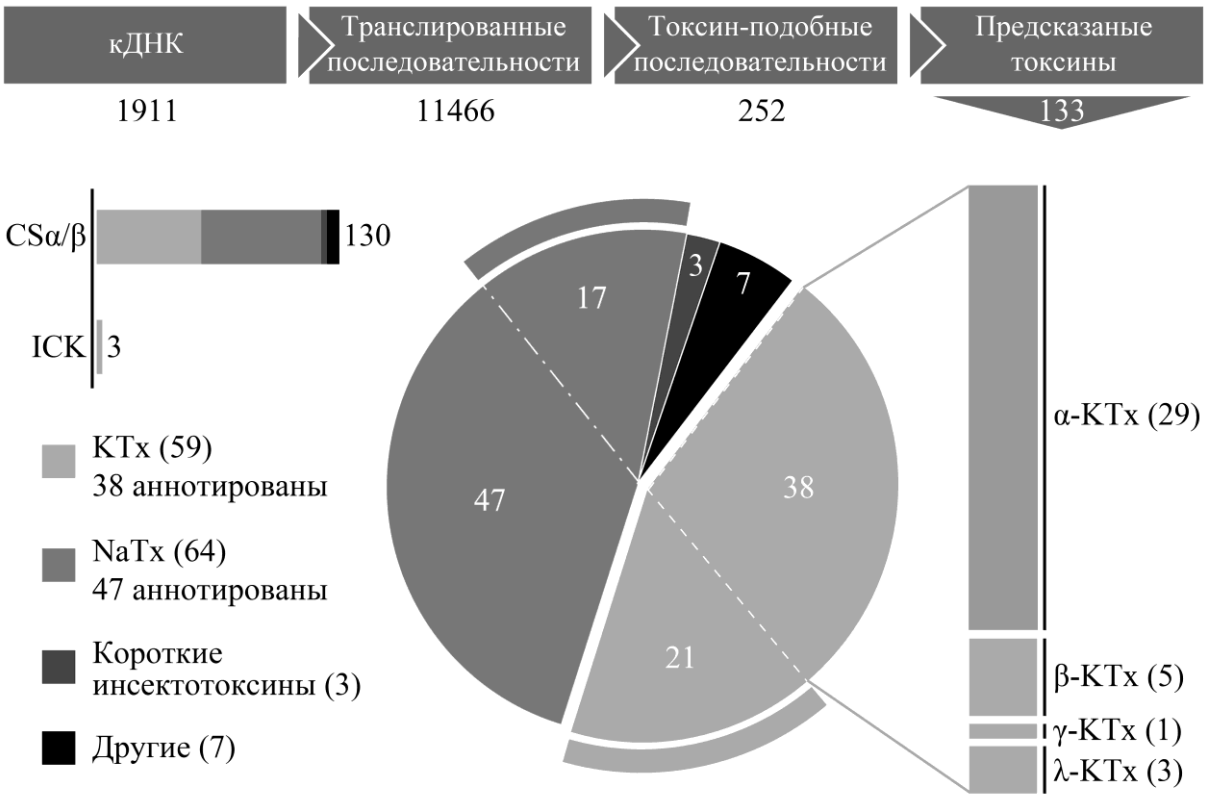
3.5.2.1. Анализ транскриптома ядовитых желез скорпиона *M. eupeus*

Библиотеку кДНК из ядовитых желез скорпиона приготовили по стандартной описанной процедуре (124) и секвенировали по Сэнгеру. Всего получили 1911 нуклеотидных последовательностей, которые преобразовали в 11 466 белковых (трансляция обеих цепей кДНК в трех рамках).

Для поиска возможных токсинов мы проанализировали все эти последовательности с использованием регулярных выражений (см. соответствующий раздел Методов). В результате мы обнаружили 244 последовательности предполагаемых предшественников пептидов с

укладкой CSα/β, 4 — с мотивом ICK и 4 — CSα/α 2(S-S), удовлетворяющие условиям поиска (всего 252 последовательности). Всех их далее проанализировали с помощью программ SignalP и BLAST. Последовательности, которые не содержали предполагаемого сигнального пептида, отбросили. После удаления идентичных записей мы идентифицировали 133 уникальные последовательности. Среди них три содержат типичный мотив ICK, а 130 последовательностей — мотив укладки CSα/β. Среди последних мы выделяем следующие группы: 56 предшественников предполагаемых KTx, 64 — NaTx, три коротких инсектотоксина и семь последовательностей, не имеющих значительного сходства с известными токсинами. Пептидов с укладкой CSα/α 2(S-S) или Куница мы не обнаружили. Основные этапы описанного процесса представлены на рисунке 53. Все последовательности кДНК, кодирующие предполагаемые KTx, были зарегистрированы в GenBank (транслированные последовательности показаны в таблице 30; другие последовательности кДНК, описываемые в работе, тоже регистрировали, далее об этом не упоминаем).

Рисунок 53. Этапы идентификации предполагаемых токсинов в базе данных кДНК из ядовитых желез *M. eupeus* и их распределение по различным структурным и функциональным группам. Семейства KTx указаны справа. Для всех семейств и групп показано общее количество идентифицированных последовательностей.



Все выведенные предшественники KTx проанализировали с использованием ClustalW2 и разделили на 30 групп (от одного до четырех членов в каждой группе) в соответ-

ствии со сходством. Предполагаемые предшественники токсинов мы назвали pMeKTx (p — предшественник; Me — *M. eupeus,* а KTx — блокатор K^+ канала). Сигнальные пептиды были предсказаны программой SignalP. Для некоторых предшественников программа дает несколько альтернативных вариантов отщепления сигнального пептида. Например, в случае pMeKTx1-1 SignalP указывает, что сигнальный пептид заканчивается на T19 или A28, и хотя наиболее вероятным вариантом предполагается расщепление после T19, мы фактически обнаружили в яде зрелый пептид, начинающийся с V29 (см. ниже). Для двух предшественников pMeKTx8-1 и pMeKTx20-1b сигнальные пептиды не были предсказаны SignalP (в обоих случаях не был предсказан сайт расщепления). Тем не менее, сигнальные пептиды предсказываются по гомологии. Более того, эти последовательности показали другие признаки KTx и потому не были исключены из анализа.

Все новые последовательности проанализировали с помощью BLAST для поиска гомологов, и в таблице 30 показаны наиболее близкие полипептиды, обнаруженные в общедоступных базах данных, для каждой группы. Большинство полученных последовательностей — члены хорошо описанных групп, таких как α-KTx 1, β-KTx 1, γ-KTx 2. Некоторые pMeKTx похожи на последовательности, которые были обнаружены в транскриптомах скорпионов, относящихся к семейству Buthidae, но соответствующие токсины не были выделены из яда. Небольшая часть предполагаемых токсинов демонстрирует малое сходство с последовательностями в UniProt или даже отсутствие сходства с известными полипептидами.

Транскриптомные данные могут быть проанализированы с использованием различных стратегий: (а) путем сопоставления с протеомными данными, полученными с помощью секвенирования по Эдману или МС; (б) вручную, т.е. когда каждая последовательность исследуется отдельно; (в) поиском с помощью BLAST, т.е. когда все последовательности сравниваются с базами данных; (г) с использованием регулярных выражений, когда в первичных структурах транслированных белков отыскиваются определенные мотивы. Анализ вручную имеет важное значение и может применяться для аннотации всех последовательностей транскриптома. При таком подходе шаг за шагом используются все возможные инструменты; очевидный недостаток здесь — огромные временные затраты.

Поиск с помощью BLAST [обычно используют программу Blast2GO (1017)] позволяет быстро сравнить транскриптом с известными зарегистрированными последовательностями. Ограничением этого подхода служит возможное отсутствие гомологов для новых последовательностей в доступных базах данных. Анализ с помощью регулярных выражений позволяет нам находить последовательности с различными мотивами в первичной структуре. Недостаток этого метода в том, что он не идентифицирует последовательности без определенных специфических мотивов даже для известных полипептидов, например линейных

пептидов. Более того, мотив первичной структуры не обязательно соответствует определенной белковой укладке. К примеру, как говорилось в Обзоре литературы, из яда *T. trivittatus* был выделен пептид, блокирующий K^+ каналы и имеющий типичный для укладки CSα/β цистеиновый мотив, однако формирующий укладку CSα/α (321). Но в отличие от BLAST, анализ регулярных выражений позволяет обнаруживать последовательности, не имеющие высокого сходства с уже известными, но демонстрирующие общие мотивы. Все блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов представляют собой дисульфид-содержащие пептиды, и для каждого их типа можно построить соответствующие регулярные выражения. Следовательно, эта стратегия оптимальна для поиска последовательностей КТх.

Анализ транскриптома показывает, что в яде *M. eupeus* присутствует большое разнообразие потенциальных КТх. Для наглядного представления сходства между предшественниками КТх мы построили филогенетическое дерево (рисунок 54). Все найденные токсины были включены в подсемейства по сходству аминокислотных последовательностей. Проведенный нами анализ литературных данных при создании Kalium показывает, что почти все известные подсемейства КТх с охарактеризованной активностью содержат пептиды, блокирующие K_v. Исключением являются подсемейства α-КТх 5, 9, 14, 15, 17, 19, 22, 24 и 25, токсины из которых либо проявляют активность только на Ca^{2+}-активируемых K^+ каналах, либо их мишени всё еще не исследованы. Блокаторы K_v1 обычно относятся к подсемействам α-КТх 1–4, 6–8, 10–13, 16, 18, 20, 21 и 23.

В общей сложности в транскриптоме *M. eupeus* мы обнаружили α-КТх, относящиеся к 12 подсемействам, и только четыре из них (α-КТх 1, 3, 8 и 16) содержат известные высокоаффинные блокаторы K_v1. Действительно, дальнейшие очистка и секвенирование пептидов, активных на $K_v1.1$ (см. ниже), показали, что все новые КТх принадлежат к этим четырем подсемействам. Это сравнительно небольшие пептиды (29–38 а.о.), содержащие три дисульфидных мостика. Все последовательности указанных четырех подсемейств содержат ключевой консервативный остаток лизина — это первый а.о. перед четвертым цистеином, он непосредственно блокирует пору каналов (см. подробно о его роли в Обзоре литературы, раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов») (338, 342, 347).

Последовательности объединены в подсемейства по сходству. В каждой группе для сравнения показаны наиболее похожие последовательности других известных КТх или их предшественников. Разрывы (прочерки) внесены для удобства. Остатки цистеина зрелых цепей выделены полужирным шрифтом. Предполагаемые сигнальные пептиды (SignalP 4.1) подчеркнуты; пунктирные линии указывают на возможный альтернативный процессинг. Пропоследовательности выделены курсивом. Отличающиеся а.о. выделены серым фоном. Полужирным шрифтом выделены названия пептидов (или их предшественников), идентифицированных нами в яде *M. eupeus*; курсивом — идентифицированных ранее; полужирным и курсивом — и ранее, и нами.

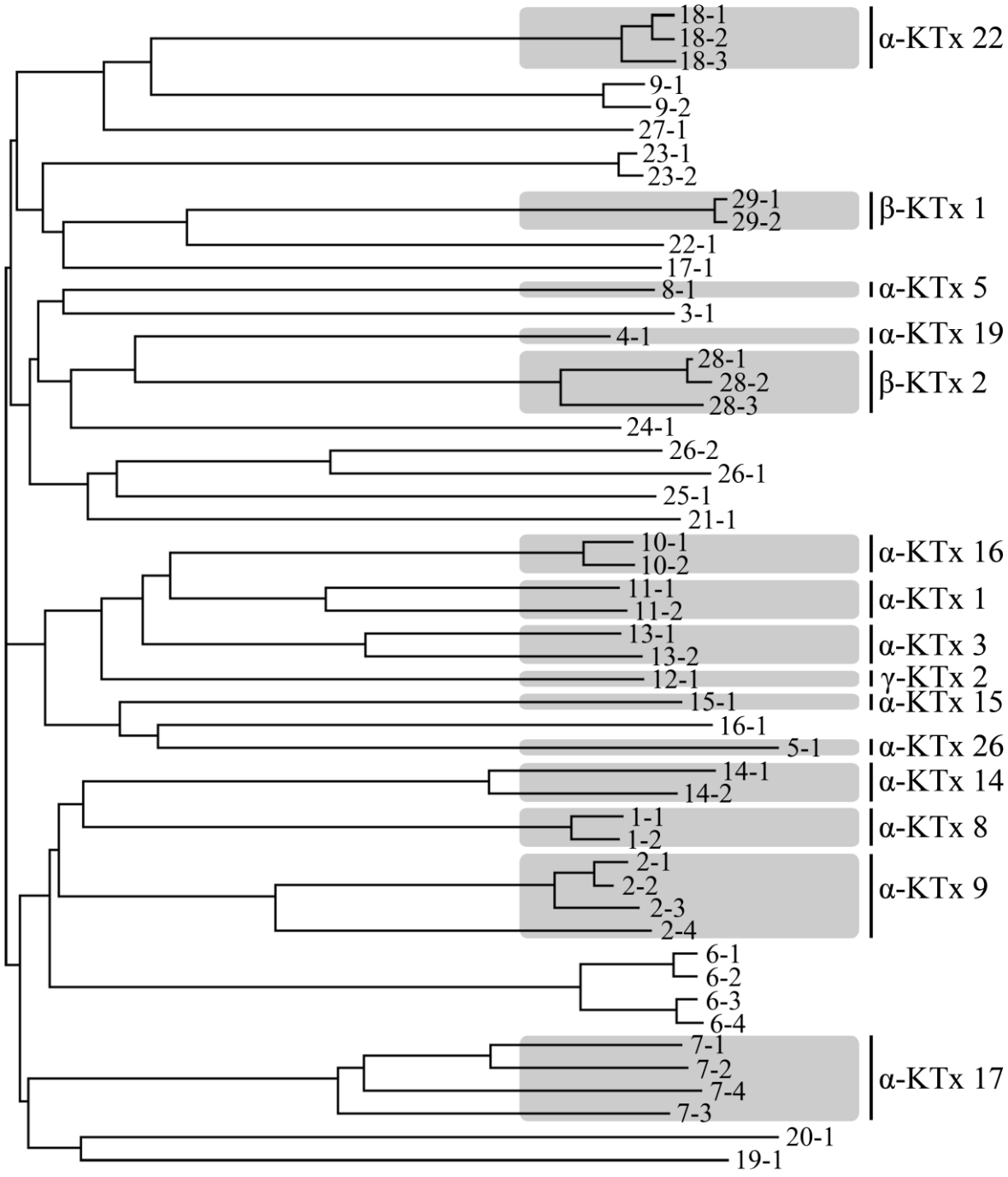
Таблица 30. Предполагаемые предшественники KTx, идентифицированные в транскриптоме ядовитых желез *M. eupeus*.

Название	GenBank / UniProt ID	Последовательность	Идентичность, %	Группа KTx
pMeKTx1-1	KF612499	MSRLYAIILIALVFNVIMTIMPDMKVEAVS**C**ED**C**PEH**C**ATKDQRAK**C**DNDK**C**V**C**EPK		
pMeKTx1-2	KF612500	MSRLYAIILIALVFNVIMTIMPDMKVEAVS**C**ED**C**PPH**C**ATKDQRAK**C**ENDK**C**V**C**EPK	96	α-KTx 8
MeuTXKα1	EF442060	MSRLYAIILIALVFNVIMTIMPDMKVEAVS**C**ED**C**PEH**C**ATKDQRAK**C**DNDK**C**V**C**EPK	100	
pMeKTx2-1	KF612501	MSRLFTLVLIVLAMNVMMAIISDPVVEAVG**C**-EE**C**PMY**C**KGKNAVPT**C**DGGV**C**N**C**NA		
pMeKTx2-2	KF612503	MSRLFTLVLIVLAMNVMMAIISDPVVEAVG**C**-EE**C**PKY**C**KGKNAVPT**C**DGGV**C**N**C**NA	98	
pMeKTx2-3	KF612502	MSRLFTLVLIVLAMNVMMAIISDPVVEAVG**C**-EE**C**PVY**C**KGKKALPT**C**DGGV**C**N**C**NA	95	α-KTx 9
pMeKTx2-4	KF612504	MSRLFTLVLIVLAMNVMMAIISDPVVEALG**C**GDE**C**RKY**C**KSKEAGSF**C**ISGR**C**D**C**FG	73	
BmKK6	Q9NJP7	MSRLFTLVLIVLAMNVMMAIISDPVVEAVG**C**-EE**C**PMH**C**KGKNAKPT**C**DDGV**C**N**C**NV	95	
MeuKTx-5	P86398	----------VG**C**-EE**C**PMH**C**KGKNAVPT**C**DNGV**C**N**C**NA	93	
pMeKTx3-1	KF612534	MNRLCKITVMFLVLNAIIAIISETKVEAAT**C**GYHD**C**VLY**C**QMFGQQGK**C**RDYL**C**D**C**IEKGRSNE		
BmP01	Q9U8D2	MSRLYAIILIALVFNVVMTITPDMKVEAAT**C**--EDCPEH**C**ATQNARAK**C**DNDK**C**V**C**EPK-----	39	
pMeKTx4-1	KF612520	MSRIFTIILIVFALNIIISLSNFKIEAAA**C**YSSD**C**RVK**C**VAMGFSSGK**C**INSK**C**K**C**YK		α-
BmBKTx1	P83407	----------AA**C**YSSD**C**RVK**C**VAMGFSSGK**C**INSK**C**K**C**YK	100	KTx 19
pMeKTx5-1	KF612524	MMSRLSVFILIALVLSVIIDVLNNSKVEGA**C**VEN**C**REY**C**QAKGARNGK**C**INSN**C**H**C**YY		α-
BmK86	A7KJJ7	-MSRLFVFILIALFLSAIIDVMSNFKVEGA**C**SKP**C**RKY**C**IDKGARNGK**C**INGR**C**H**C**YY	75	KTx 26
pMeKTx6-1	KF612535	MRRIYSVVLVLIALGAITDITTASRIIAHD**C**NYY**C**SIA**C**INKNATFVS**C**DGGY**C**V**C**KVKE**C**H		
pMeKTx6-2	KF612536	MRRIYSVVLVLIALGAITDITTASRIIAHD**C**NYY**C**SIS**C**INKNATFVS**C**DGGY**C**V**C**KVKE**C**H	98	
pMeKTx6-3	KF612537	MRRIYSVVLVLIALSAIRDITTVSRVIEHG**C**DYY**C**SIS**C**INKNATFVS**C**DGGY**C**V**C**KVKE**C**H	87	
pMeKTx6-4	KF612538	MRRIYSVVLVLIALRAIRDISPVSRVIEHG**C**DYY**C**SIS**C**INKNAPFVS**C**DGGY**C**V**C**KVKE**C**H	82	
pMeKTx7-1	KF612507	MKFIIVLILISVLIATTVPVSEAQRQ**C**QTVQD**C**YKY**C**MTPKR**C**TYGT**C**Y**C**YPSPFK		
pMeKTx7-2	KF612508	MKFIIVLILIGVLIATTVPMSEAQRQ**C**QTVRD**C**YKH**C**QSPKR**C**TLGT**C**Y**C**EPSPGK	82	
pMeKTx7-3	KF612506	MKFIIVLILISVLIATTVPVSEAQRQ**C**QHVRN**C**YKY**C**ESPEK**C**QFGT**C**Y**C**KP-PGK	76	α-KTx 17
pMeKTx7-4	KF612505	MKFIIVLILISVFIATIVPVSESQNQ**C**QTVRD**C**QPY**C**ATPDR**C**LYGT**C**Y**C**KT-TGK	73	
BmKK4	Q95NJ8	MKFIIVLILISVLIATIVPVNEAQTQ**C**QSVRD**C**QQY**C**LTPDR**C**SYGT**C**Y**C**KT-TGK	80	
pMeKTx8-1	KF612489	MNNYYKIVLIMVAFFAVTITFSNIHVEGII**C**NLRR**C**QLS**C**RSLGLLGK**C**IGDK**C**E**C**VKHGK		α-KTx 5
BmP05	Q9TVX3	MHNYYKIVLIMVAFFAVIITFSNIQVEGAV**C**NLKR**C**QLS**C**RSLGLLGK**C**IGDK**C**E**C**VKHGK	90	
pMeKTx9-1	KF612515	MKNYCGIIILFLAIISATGVFCVDFPNKGGK**C**DLKE**C**RKT**C**KKLNYRGK**C**FPNY**C**R**C**YPG		
pMeKTx9-2	KF612516	MKNYCGIIILFLAIISATGVFCVDFPNKGGK**C**HRKE**C**RKT**C**KKLNYRGK**C**FPNY**C**R**C**YPG	97	
MeuTXKα3	EF442052	MKNYCGIITLFLAIISATGVFCVDFPNKGGK**C**DRKE**C**RKT**C**KKLNYRGK**C**FPNY**C**R**C**FPG	95	

Название	GenBank / UniProt ID	Последовательность	Идентичность, %	Группа KTx
pMeKTx10-1	KF612490	MKILSIVLIALIICSISICTEAFGLIDVK**C**SASRE**C**WVA**C**KKATGSGQGK**C**QNNQ**C**R**C**Y		
pMeKTx10-2a	KF612492	MKILSIVLIALIICSISICTEAFGLIDVK**C**SASRE**C**WIA**C**KKVTGSGQGK**C**QNNQ**C**R**C**Y	97	α-KTx 16
pMeKTx10-2b	KF612491	MKILYVVLVALIICSISICTEAFGLIDVK**C**SASRE**C**WIA**C**KKVTGSGQGK**C**QNNQ**C**R**C**Y	91	
MeuTx3B	F5CJW1	MKILSIVLIALIICSISICTEAFGLIDVK**C**SASRE**C**WVA**C**KKVTGSGQGK**C**QNNQ**C**R**C**Y	98	
pMeKTx11-1	KF612509	MKISFLLLLALVICSIGWSEAQFTDVK**C**TGTKQ**C**WPV**C**KKMFGRPNGK**C**MNGK**C**R**C**YP		
pMeKTx11-2	KF612510	MKFSFVLLIAIVICSIGWTEAQFTNVS**C**SASSQ**C**WPI**C**EKMFGKYRGK**C**MNGK**C**R**C**YS	71	α-KTx 1
BmTX1	Q9NII6	MKISF-LLLALVICSIGWSEAQFTDVK**C**TGSKQ**C**WPV**C**KQMFGKPNGK**C**MNGK**C**R**C**YS	93	
pMeKTx12-1	KF612525	MKISFVLLLTLFICSIGWSEARPTDIK**C**SESYQ**C**FPV**C**KSRFGKTNGR**C**VKGF**C**D**C**F		γ-KTx 2
BeKm-1	Q9BKB7	MKISFVLLLTLFICSIGWSEARPTDIK**C**SESYQ**C**FPV**C**KSRFGKTNGR**C**VNGF**C**D**C**F	97	
pMeKTx13-1	KF612512	MKVFFAVLITLFVCSMIIGIH-GVGINVK**C**KHSGQ**C**LKP**C**KDAGMRFGK**C**MNGK**C**D**C**TPKG		
pMeKTx13-2a	KF612527	MKMFFAVLITLFVCSMIIGICEGREIPVK**C**KGSKQ**C**LQS**C**KEAGMTYGK**C**MNGK**C**N**C**TPKG	78	
pMeKTx13-2b	KF612526	MKMFFTVLVTLFVCSMIIGICEGREIPVK**C**KGSKQ**C**LQS**C**KEAGMTYGK**C**MNGK**C**N**C**TPKG	75	α-KTx 3
pMeKTx13-2c	KF612528	MKMFFTVLVTVFVCSMIIGICEGREIPVK**C**KGSKQ**C**LQS**C**KEAGMTYGK**C**MNGK**C**N**C**TPKG	73	
BmKTX	Q9NII7	MKVFFAVLITLFICSMIIGIH-GVGINVK**C**KHSGQ**C**LKP**C**KDAGMRFGK**C**INGK**C**D**C**TPKG	97	
MeuKTx-3	P86396	----------VGINVK**C**KHSGQ**C**LKP**C**KDAGMRFGK**C**MNGK**C**D**C**TPK-	100	
pMeKTx14-1	KF612493	MKIFFAILLILAICSMAIWTVNGTAIAVR**C**SSDAD**C**FGK**C**PGYPP**C**KDKF**C**S**C**TG		α-KTx 14
pMeKTx14-2	KF612494	MKIFFAILLILAICSMAIWTVNGTPIAVR**C**STNSD**C**FGK**C**PGYPI**C**KNKF**C**A**C**T-	87	
BmKK3	Q9BJX2	MKIFFAILLILAVCSMAIWTVNGTPFEVR**C**ATDAD**C**SRK**C**PGNPP**C**RNGF**C**A**C**T-	76	
pMeKTx15-1	KF612511	MKFSSIILLTLLICSLSIFGNCQVQTNVK**C**QAGS**C**ASV**C**RGEIGVAAGK**C**INSR**C**V**C**YPN		α-KTx 15
BmKKx1	Q86BX0	MKFSSIILLTLLICSMSIFGNCQVQTNVK**C**QGGS**C**ASV**C**RREIGVAAGK**C**INGK**C**V**C**YRN	90	
pMeKTx16-1	KF612517	MKTSAIVIIAFLICSMLILCESQIHTEVP**C**KYSGQ**C**VQL**C**IILVNNKNAK**C**SNDT**C**T**C**YR		
Tx677	B8XH38	MKISALVMITLLICSMMILCQGQKILSNR**C**NNSSE**C**IPH**C**IRIFGTRAAK**C**INRK**C**Y**C**YP	46	
pMeKTx17-1	KF612521	MKSFSQIVCYVLILTLMTVIFSDTLVDAVD**C**NVAQ**C**DKD**C**KARGYKKGT**C**HDFNDIG**C**K**C**HKWS-		
CoTx1	O46028	MEGIAKITLILLFLFVTMHTFANWNTEAAV**C**VYRT**C**DKD**C**KRRGYRSGK**C**INNA---**C**K**C**YPYGK	34	
pMeKTx18-1a	KF612495	MQKLFIVLVLFCILQFDGGVDGNVMAF**C**DRDD**C**QKT**C**ELVNMNGI**C**VIETEHGLFYHI**C**R**C**Y		α-KTx 22
pMeKTx18-1b	KF612496	MQKLFIVLVLFCIFRFDGGVDGNVMAF**C**DRDD**C**QKT**C**ELVNMNGI**C**VIETEHGLFYHI**C**R**C**Y	97	
pMeKTx18-2	KF612498	MQKLFIVLVLFCILRFNGGVDGNVMAF**C**DRDD**C**QKT**C**ELVNMNGI**C**VIETEHDLFYHI**C**R**C**Y	95	
pMeKTx18-3	KF612497	MQKLFIVLVLFCILRFDGGVDGNIMAF**C**DRDD**C**QKT**C**ELVDMNGI**C**VIETEHDLFYHI**C**R**C**Y	94	
BmK38	Q8MUB1	MQKLFIVFVLFCILRLDAEVDGRTATF**C**TQSI**C**EES**C**KRQNKNGR**C**VIEAEGSLIYHL**C**K**C**Y	56	
pMeKTx19-1	KF612523	MNRLTTIILILIVINVIMDGIHESKVTAGMG**C**AM**C**KIK**C**VFQGKKVDT**C**EAPPK**C**T**C**KKG		
BmTXKS1	Q95P89	MNRLTTIILMLIVINVIMDDISESKVAAGIV**C**KV**C**KII**C**GMQGKKVNI**C**KAPIK**C**K**C**KKG	73	

Название	GenBank / UniProt ID	Последовательность	Идентичность, %	Группа КТх
pMeKTx20-1a	KF612513	MKLTISFLILVLFSVFFTIEGIIKWFPASVNGKGHSS**C**SNGLEMTEEDF**C**KML**C**GIDGKLRESK**C**VDHW**C**Y**C**SQILFP		
pMeKTx20-1b	KF612514	MKLTISFLILVLFSVFFTIGGIIKWFPASVNGKGHSS**C**SNGLEMTEEDF**C**KML**C**GIDGKLRESK**C**VDHW**C**Y**C**SQILFP	99	
BmTxKS4	Q5F1N4	MKLKISFLILVLFSVFFAIEGIIKWFPASVNGKGHSS**C**TNGLEMTEEDF**C**KML**C**GIDGKLRESK**C**VDHW**C**Y**C**SQILFP	96	
pMeKTx21-1	KF612538	MK-IVTVILLLAFILCS-QEIA--NVEASG**C**VFWR**C**NSD**C**IRRRYRGGI**C**QGILNNRY**C**Y**C**LS---		
CoTx1	O46028	MEGIAKITLILLFLFVTMHTFANWNTEAAV**C**VYRT**C**DKD**C**KRRGYRSGK**C**--INNA--**C**K**C**YPYGK	40	
pMeKTx22-1	KF612518	MNKAYLVAVLVLFLALTINESNEAVPTGG**C**PFSDLL**C**AKR**C**KDMKFGKTGR**C**TGPNKTV**C**K**C**SI		
α-KTx J123	B5KF99	MNKVYLVAVLVLFLALTINESNEAVPTGG**C**PFSDFF**C**AKR**C**KDMKFGNTGR**C**TGPNKTV**C**K**C**SI	94	
pMeKTx23-1	KF612484	MTYAILIIVSLLLISDGISNVVDKY**C**SEDPLD**C**NEH**C**-KTKNQIGV**C**HGANGKEK**C**S**C**MDS		
pMeKTx23-2	KF612485	MTYAILIIVSLLLISDGISNVVDKY**C**SEDPLE**C**NEH**C**-KTKNQIGV**C**HGANGKEK**C**S**C**MDS	98	
TXKs2	Q95P88	MTYAILIIVSLLLISDRISNVVDKY**C**SENPLD**C**NEH**C**LKTKNQIGI**C**HGANGNEK**C**S**C**MES	90	
pMeKTx24-1	KF612519	MNNYYKIVLIMVAFFAVTITFSNIQVEAQ**C**NKIG**C**YAY**C**WRKRLIGH**C**VTKEN**C**K**C**FNQNK		
pMeKTx25-1	KF612486	MNNYYKILLIMAAFFTVTITFPNIQVEAA**C**RSRS**C**TRI**C**TRKLKVGI**C**NGDE**C**K**C**FEASKYQF		
pMeKTx26-1	KF612488	MNNYFKIVLIMAAFFVVTITFSNMQVE-AG**C**DRKN**C**FWE**C**RRKHNKLQGN**C**NSGK**C**E**C**IV-GKLR--PGGRMAEW		
pMeKTx26-2	KF612487	MNNYFKIVLIMAAFFVVTITFSNIQVE-AG**C**DWKK**C**QKE**C**TGK--KVVGM**C**MDGE**C**T**C**VS-GQPRQKPGRRMAEW	70	
BmP05	Q9TVX3	MHNYYKIVLIMVAFFAVIITFSNIQVEGAV**C**NLKR**C**QLS**C**RSLG--LLGK**C**IGDK**C**E**C**VKHGK----------	54	
pMeKTx27-1	KF612522	MQKLFIVLVLFCILRFDVEVDGRTMSL**C**NMSD**C**QER**C**KKQNKSGR**C**VTEFEMNYVYHF**C**R**C**Y		
α-KTx Tx308	B8XH30	MQKLFIVLLLFCILRLDAEVDGRTMSH**C**NQSE**C**QEK**C**KKKNKNGR**C**ITEFEMNYVYNR**C**R**C**N	79	
pMeKTx28-1	KF612530	MMKQQFFLFLAVIVMISSVIEA*GRGREFMSNLKEKLSGVKE*KMKNSWNRLTSMSEYA**C**PVIEKW**C**EDH**C**QAKNAIGK**C**ENTE**C**K**C**LNMSK		
pMeKTx28-2	KF612529	MMKQQFFLFLAVIVMISSVIEA*GRGKEFMSSLKEKLGGVKE*KIKHSWNKLTSMSEYA**C**PVIEKW**C**EDH**C**EAKKAIGK**C**ENTE**C**K**C**LKLSK	89	β-KTx 2
pMeKTx28-3	KF612531	MMKQQFFLFLAVIVMISSVIEA*GRGKEFMSSLKEKLGGVKE*KIKHSWNKLTSMSEYA**C**PVIEKW**C**EDH**C**EANKAIGK**C**ENTE**C**K**C**LKLSK	88	
MeuTXKβ3	P0CH57	MMKQQFFLFLAVIVMISSVIEA*GRGREFMSNLKEKLSGVKE*KMKNSWNRLTSMSEYA**C**PVIEKW**C**EDH**C**QAKNAIGR**C**ENTE**C**K**C**L--SK	98	
pMeKTx29-1	KF612532	MQRNLVVLLFLGMVALSSCGLREKHFQRLVKYAVPESTLRTILQTAVHKVGKTQFG**C**PAYQGY**C**DDH**C**QDIENKEGF**C**HGFK**C**K**C**GIPMGF		
pMeKTx29-2	KF612533	MQRNLVVLLFLGMVALSSCGLREKHFQRIVKYAVPESTLRTILQTAVHKVGKTQFG**C**PAYQGY**C**DDH**C**QDIENKEGF**C**HGFK**C**K**C**GIPMGF	99	β-KTx 1
MeuTXKβ1	A9XE60	MQRNLVVLLFLGMVALSSCGFREKHFQRFVKYAVPESTLRTVLQTVVHKVGKTQFG**C**PAYQGY**C**DDH**C**QDIEKKEGF**C**HGFK**C**K**C**GIPMGF	95	
pMeKTx30-1	KF612540	MNRF-FILLLLVVIVSHAKAEDEGYRGS**C**PSLGKP**C**NSNRD**CC**PYGEH**C**LSAGKGYF**C**KQDPGP		
pMeKTx30-2	KF612541	MNRL-FILLLLVVIVSHAKAVDEGYRGS**C**PSLGKP**C**NSNRD**CC**PYGEH**C**LSAGEGYF**C**KPDPGP	94	λ-KTx
pMeKTx30-3	KF612542	MNRF-FILLLLVVILSHAKAEDKGYRGS**C**PSLGKP**C**NSNKD**CC**PYGER**C**LSAGEGYF**C**KEDPGP	91	
λ-MeuTx-1	P86399	MSTFIVVFLLLTAILCHA*EHAIDETARG***C**NRLNKK**C**NSDAD**CC**RYGER**C**ISTGVNYY**C**RPDFGP	41	

Рисунок 54. Филогенетическое дерево зрелых КТх из базы данных кДНК *M. eupeus* с мотивом CSα/β. Для простоты названия даны не полностью, а только их числовая часть. Заштрихованы КТх, отнесенные к известным подсемействам.



3.5.2.2. Использование аналитической системы на основе химеры KcsA-K_v1.1

Скрининг активности фракций яда *M. eupeus* мы проводили с использованием оригинального подхода — по вытеснению флуоресцентно-меченого КТх из комплекса с химерным белком KcsA-K_v1.1, экспрессированным в *E. coli*. Подход получения химерных каналов был опубликован французскими исследователями в начале 2000-х гг. (1018). Он основан на том, что структура ПД K^+ каналов чрезвычайно консервативна; это следовало из сравнения ами-

нокислотных последовательностей, и в настоящее время очевидно при сравнении пространственных структур (349, 835). А поскольку KTx взаимодействуют с P-петлями, образующими входной вестибюль каналов (подробно описано в Обзоре литературы, раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов»; см. рисунок 9 и таблицу 31, сегменты S5-P и P-S6) (347), то при пересадке этих петель из одного канала в другой можно реконструировать сайт связывания токсинов.

Наши коллеги из лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул и группы нанобиоинженерии ИБХ РАН получили химерные каналы KcsA-K_v1.1 и KcsA-K_v1.3 с заменой части P-петли (области S5-P) KcsA (^{52}RGAPGAQLITYPR^{64}) на гомологичный участок из K_v1.1 (^{349}AEEAESHFSSIPD^{361}) или K_v1.3 (^{421}ADDPTSGFSSIPD^{433}, см. таблицу 31), которые были экспрессированы в *E. coli*. Сферопласты, полученные из клеток *E. coli* с экспрессией KcsA-K_v1.1 или KcsA-K_v1.3, специфически связывают флуоресцентно-меченый AgTx-2-TAMRA и могут быть использованы в качестве компонентов флуоресцентной системы для исследования лигандов K_v1 (821, 948). AgTx-2 — один из самых высокоаффинных лигандов K_v1.1 и 1.3, для немеченого токсина K_d < 1 нМ (332), что обусловило его выбор для создания системы.

3.5.2.3. Разделение яда и очистка индивидуальных KTx

Для разделения яда *M. eupeus* мы использовали наш традиционный подход. На первом этапе яд разделили на три грубые фракции с помощью гель-фильтрации (I–III, см. рисунок 42А). Эти фракции протестировали с использованием гибридных каналов KcsA-K_v1.1, активность наблюдали только во фракции II (рисунок 55Б). Для выделения активных компонентов фракцию II подвергли разделению с помощью ОФ-ВЭЖХ (рисунки 42Б и 55А). В результате получили 40 субфракций, которые тестировали на KcsA-K_v1.1 (рисунок 55В). Шесть субфракций (3–5, 8, 12, 15) конкурировали с AgTx-2 за связывание с гибридными каналами. Небольшие эффекты ингибирования наблюдались в некоторых соседних субфракциях из-за загрязнения активными компонентами. Две субфракции характеризовались слабой и нестабильной способностью снижать интенсивность сигнала, а их активность не демонстрировала концентрационной зависимости.

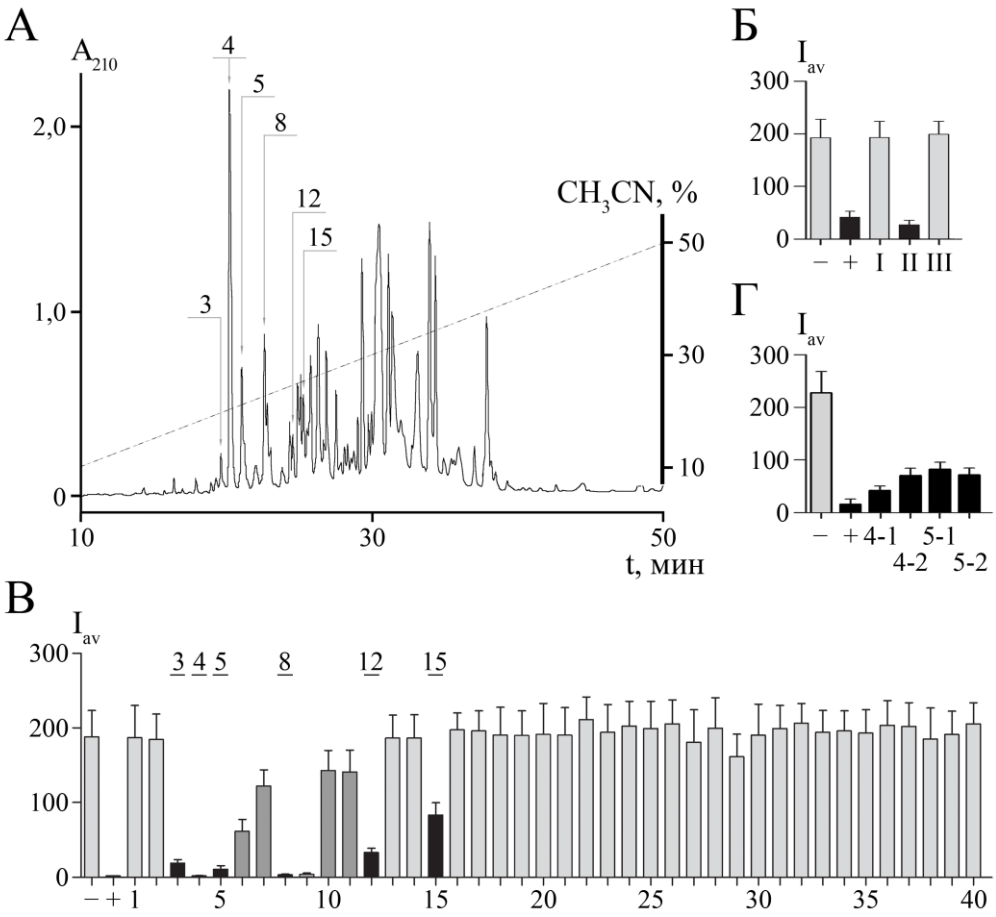
Второй раунд ОФ-ВЭЖХ позволил очистить активные компоненты в индивидуальном состоянии. Для этого использовали 90-минутный линейный градиент элюента, содержащего 50% ацетонитрила и 20% изопропилового спирта в 0,1% ТФУ. Каждая из субфракций 3, 8, 12 и 15 содержала один активный компонент. В субфракции 5 идентифицировали два активных компонента (5-1 и 5-2; рисунки 42Г и 55Г).

Таблица 31. Сравнение аминокислотных последовательностей ПД K^+ каналов.

Название	UniProt ID	Последовательность
		326 331 340 350 360 370 380 390 400 410 417
$rK_v1.1$	P10499	RELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEAEEAESHFSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMYPVTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFY
$rK_v1.2$	P63142	RELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADERDSQFPSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMVPTTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFY
$hK_v1.3$	P22001	RELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADDPTSGFSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMHPVTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFY
$rK_v1.4$	P15385	RELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADEPTTHFQSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMKPITVGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFY
$rK_v1.5$	P19024	RELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADNHGSHFSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMRPITVGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFY
$rK_v1.6$	G3V8L6	RELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADDVDSLFPSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMYPMTVGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFY
Shaker	P08510	RELGLLIFFLFIGVVLFSSAVYFAEAGSENSFFKSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMTPVGVWGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNYFY
KcsA	P0A334	RAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAERGAPGAQLITYPRALWWSVETATTVGYGDLYPVTLWGRLVAVVVMVAGITSFGLVTAALAT---WFV
		27 40 50 60 70 80 90 100 110 115
		← S5 → ← P →← SF → ← S6 →

Сверху нумерация для $rK_v1.2$, снизу — для KcsA. Трансмембранные сегменты S5 и S6, обнаруженные в структуре $rK_v1.2$ (PDB ID: 3LUT) (972), отмечены голубым, поровая спираль (P) — зеленым, область селективного фильтра (SF) — малиновым; эти же элементы обозначены стрелками снизу. Спиральные участки структуры KcsA (1BL8) (835) подчеркнуты, SF выделен малиновым. Серым обозначены а.о., отличающиеся от $rK_v1.2$. Разрыв в последовательность KcsA внесен для удобства сравнения.

Рисунок 55. Разделение яда *M. eupeus* и анализ фракций с помощью флуоресцентной системы на основе сферопластов. (А) Разделение фракции II, полученной с помощью гель-фильтрации (см. рисунок 42А), на субфракции при помощи ОФ-ВЭЖХ (дублирует рисунок 42Б). Активные субфракции обозначены числами. (Б–Г) Интенсивность флуоресценции сферопластов, содержащих KcsA-K_v1.1. К сферопластам добавлен чистый буфер (−, отрицательный контроль), AgTx-2 (10 нМ; +, положительный контроль) или фракции / субфракции / очищенные компоненты яда. (Б) Анализ активности фракций, полученных с помощью гель-фильтрации. (В) Анализ субфракций, полученных при помощи ОФ-ВЭЖХ. (Г) Анализ компонентов, очищенных путем дополнительной стадии ОФ-ВЭЖХ (см. рисунок 42В, Г). Черные столбцы обозначают активные фракции / субфракции / компоненты; темно-серые столбцы — субфракции, которые были загрязнены примесями активных компонентов; светло-серые столбцы — неактивные фракции / субфракции / компоненты. Данные показаны как средние значения ± SD.



Субфракция 4 тоже содержала два активных компонента, но их нельзя было разделить даже с помощью второго раунда ОФ-ВЭЖХ. Поэтому мы изменили стратегию очистки: использовали другой элюент [50% ацетонитрила в 10 мМ Трис-HCl (pH 7,0)] — и успешно разделили 4-1 и 4-2 (рисунки 42В и 55Г).

Всего в яде *M. eupeus* мы обнаружили восемь блокаторов K_v1.1. Гомогенность активных соединений 3, 4-1, 4-2, 5-1, 5-2, 8, 12 и 15 была подтверждена с помощью МАЛДИ МС. Следующие КТх были ранее обнаружены в яде *M. eupeus*: три α-КТх [MeuKTx-1

(MeuTXKα1), UniProt ID: P86400, Kalium ID: α-KTx 8.6; MeuKTx-3, P86396, α-KTx 3.13; MeuTx3B, D3JXM1, α-KTx 16.4] (595, 1019, 1020); один β-KTx (MeuTXK-β-1, A9XE60, β-KTx 1.6) (663), один γ-KTx (BeKm-1, Q9BKB7, γ-KTx 2.1) (318) и один токсин с мотивом ICK (λ-MeuTx-1, P86399, λ-KTx 2.1) (325). Принимая во внимание, что β- и λ-KTx известны как слабые ингибиторы K^+ каналов, а γ-KTx являются блокаторами каналов hERG, мы сосредоточили наше исследование на α-KTx. С помощью комбинации ОФ-ВЭЖХ, МС и флуоресцентного анализа мы идентифицировали пять новых и три уже описанных активных пептида в яде *M. eupeus* (таблица 32). Три известных α-KTx (MeuKTx-1, MeuKTx-3 и MeuTx3B) обнаружили в субфракциях 4 (компонент 4-1), 5 (компонент 5-2) и 15. Их идентичность подтвердили с помощью частичной N-концевой деградации по Эдману, МС и сравнения времен удерживания при ОФ-ВЭЖХ с опубликованными данными.

Новые пептиды секвенировали по Эдману, а последовательности зарегистрировали в UniProt (так же поступали с другими новыми белковыми последовательностями, полученными в работе, об этом далее не упоминаем). Помимо уже известных токсинов, в субфракциях 4 и 5 мы обнаружили два дополнительных активных компонента. Компонент 4-2 (MeKTx1-2) является очень близким гомологом MeuKTx-1 и отличается от него двумя заменами (E8P и D20E), а компонент 5-1 (MeKTx13-3) имеет идентичную последовательность с токсином из родственного вида *M. martensii* BmKTX (Q9NII7) (1021) и отличается одним а.о. от MeuKTx-3 (I28M). В случае MeKTx11-3 и 11-1 (компоненты 8 и 12) первоначальное секвенирование по Эдману не удалось из-за блокирования N-конца остатком пироглутаминовой кислоты. Блокировку мы удалили с помощью пироглутаматаминопептидазы, после чего получили полные последовательности пептидов. MeKTx11-1 и 11-3 являются близкими гомологами и отличаются двумя заменами (G9V и P37S). Для токсинов MeKTx13-2, MeKTx13-3 и MeuKTx-3 из подфракций 3 и 5 предположено C-концевое амидирование, поскольку сравнение экспериментально измеренных Мм с рассчитанными значениями выявило отличие в 1 Да. Наличие этой модификации подтверждается транскриптомными данными: в структуре предшественников pMeKTx13 обнаруживается дополнительный C-концевой остаток глицина, служащий сигналом амидирования (759).

3.5.2.4. Активность новых токсинов

Чтобы детально описать активность новых токсинов, мы исследовали их эффект на каналах K_v, экспрессированных в ооцитах *X. laevis*, с использованием метода двухэлектродной фиксации потенциала. На рисунке 56 показано ингибирование токов, опосредованных каналами K_v1.1–1.3 и 1.6 при приложении токсинов MeKTx1-2, 11-1, 11-3, 13-2 и 13-3, а также кривые «доза–ответ»; мы рассчитали значения IC_{50} по уравнению 26 (таблица 33).

Таблица 32. Лиганды K_v1.1, полученные из яда *M. eupeus* и *O. scrobiculosus*.

ВЭЖХ[1]	Название пептида		UniProt ID	Последовательность[2]	Длина, а.о.	Мм, Да[3]
				1 5 10 15 20 25 30 35 37		
3	MeKTx13-2	α-KTx 3.18	C0HJQ4	REIPVK**C**KGSKQ**C**LQS**C**KEAGMTYGK**C**MNGK**C**N**C**TPK-NH_2	37	4046,8
4-1	MeuKTx-1	α-KTx 8.6	P86400	VS**C**ED**C**PEH**C**ATKDQRAK**C**DNDK**C**V**C**EPK	29	3249,6
4-2	MeKTx1-2	α-KTx 8.7	C0HJQ5	VS**C**ED**C**PPH**C**ATKDQRAK**C**ENDK**C**V**C**EPK	29	3231,6
5-1	MeKTx13-3	α-KTx 3.19	C0HJQ6	VGINVK**C**KHSGQ**C**LKP**C**KDAGMRFGK**C**INGK**C**D**C**TPK-NH_2	37	3961,7
5-2	MeuKTx-3	α-KTx 3.13	P86396	VGINVK**C**KHSGQ**C**LKP**C**KDAGMRFGK**C**MNGK**C**D**C**TPK-NH_2	37	3979,8
8	MeKTx11-3	α-KTx 1.17	C0HJQ7	ZFTDVK**C**TVTKQ**C**WPV**C**KKMFGRPNGK**C**MNGK**C**R**C**YS	37	4254,0
12	MeKTx11-1	α-KTx 1.16	C0HJQ8	ZFTDVK**C**TGTKQ**C**WPV**C**KKMFGRPNGK**C**MNGK**C**R**C**YP	37	4222,0
15	MeuTx3B	α-KTx 16.4	D3JXM1	FGLIDVK**C**SASRE**C**WVA**C**KKVTGSGQGK**C**QNNQ**C**R**C**Y	37	4065,6
	OSK1	α-KTx 3.7	P55896	GVIINVK**C**KISRQ**C**LEP**C**KKAGMRFGK**C**MNGK**C**H**C**TPK	38	4205,2
	OSK3	α-KTx 8.8	C0HK17	VS**C**ED**C**PEH**C**STQKARAK**C**DNDK**C**V**C**EPI	29	3206,6

[1]Обозначение компонента при разделении яда *M. eupeus*, см. рисунок 55. [2]Z, остаток пироглутаминовой кислоты. -NH_2, С-концевое амидирование. Различающиеся а.о. в парах α-KTx 1.16 и 1.17, 3.13 и 3.19, 8.6 и 8.7 отмечены серым. [3]Приведены расчетные средние Мм.

Чтобы выяснить, связано ли наблюдаемое подавление тока с блокированием поры или с воздействием на воротные механизмы, мы получили вольт-амперную характеристику каналов в контроле и в присутствии наиболее активного токсина MeKTx13-3 (рисунки 6Б и 56В). Значение $V_{1/2,K}$ не изменилось (3,7 ± 1,6 мВ в контроле и 2,1 ± 1,5 мВ в присутствии токсина, соответственно, n = 4), что свидетельствует в пользу прямого блокирования поры. Блок K_v1.1 наступал быстро и был обратимым: ток быстро и полностью восстанавливался после отмывки.

С использованием сферопластов, содержащих KcsA-K_v1.1, для MeKTx13-2 мы получили значение K_{ap} = 44 ± 12 нМ. Это значение близко к IC_{50}, полученной на ооцитах, экспрессирующих K_v1.1 (90 ± 2 нМ). Вместе с данными по активности других лигандов K_v, тоже показавших очень сходные значения в двух тестах (1022), это наблюдение демонстрирует адекватность использования химерных каналов KcsA-K_v.

Результаты изучения многообразия KTx из яда *M. eupeus* были нами опубликованы (1022-1024).

Рисунок 56. Активность токсинов из яда *M. eupeus* на канах K_v1.1. (А) Репрезентативные записи токов через каналы в контроле и после приложения токсинов (50 нМ; отмечены звездочками). (Б) Кривые «доза–ответ». (В) Вольт-амперная характеристика каналов не меняется при воздействии токсина MeKTx13-3 (1 нМ).

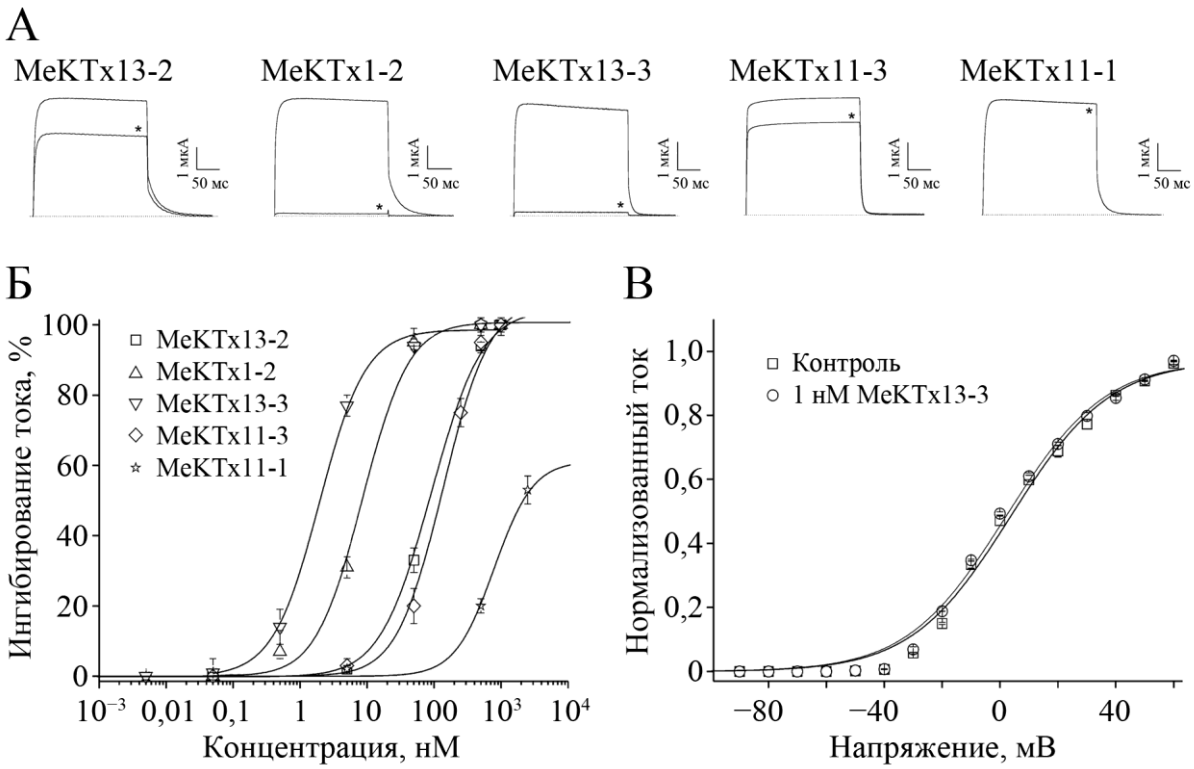


Таблица 33. Активность лигандов K_v, полученных из яда *M. eupeus* и *O. scrobiculosus*, СТХ и их искусственных производных. Указаны рассчитанные значения IC_{50} в нМ.

Токсин	K_v1.1	K_v1.2	K_v1.3	K_v1.6
MeKTx1-2	8,5 ± 1,2	102 ± 12	2525 ± 422	180 ± 18
MeKTx11-1	2110 ± 146	0,19 ± 0,01	67 ± 5	8923 ± 857
MeKTx11-3	135 ± 10	3,1 ± 0,2	79 ± 11	911 ± 107
MeKTx13-2	90 ± 2	2678 ± 101	312 ± 20	266 ± 23
MeKTx13-3	1,9 ± 0,2	106 ± 15	8,9 ± 0,9	63 ± 5
MeKTx13-3_AAAR	542 ± 49	208 ± 15	9,1 ± 0,4	1522 ± 183
MeKTx13-3_RMRH	0,11 ± 0,02	10,7 ± 0,8	8,1 ± 0,2	16,3 ± 1,0
CTX	1473 ± 140	12,7 ± 1,3	0,2[1]	22[1]
CTX_M29I	>2000	0,0060 ± 0,0004	4,1 ± 0,8	>2000
OSK3	>>1000[2]	331 ± 17	503 ± 31	9983 ± 172

[1]Данные из (332). [2]OSK3 не показал эффекта на K_v1.1 в концентрации 1 мкМ.

3.5.3. Блокаторы K^+ каналов из яда скорпиона Orthochirus scrobiculosus

Анализ транскриптома *O. scrobiculosus* мы провели по схеме, описанной выше для *M. eupeus*. Всего получили 2073 нуклеотидных последовательностей, которые преобразовали в 12 438 белковых, среди которых нашли 56 предполагаемых предшественников пептидов, причем только с укладкой CSα/β [мотивы ICK и CSα/α 2(S-S) не обнаружены]. В результате анализа с помощью программ SignalP и BLAST мы идентифицировали 28 уникальных последовательностей, среди которых можно выделить группы: девять предшественников предполагаемых KTx, 11 — NaTx, два АМП и шесть последовательностей, не имеющих значительного сходства с известными токсинами. Предполагаемые предшественники токсинов мы назвали pOsKTx (Os — *O. scrobiculosus*) и разделили на семь групп в соответствии со сходством (по одному-два представителя; см. таблицу 34). В случае pOsKTx3-1, как и ранее упомянутого pMeKTx1-1, SignalP показывает, что сигнальный пептид заканчивается на T19 или V28 и что наиболее вероятный вариант процессинга — расщепление предшественника после T19, однако в яде мы обнаружили именно зрелый пептид, начинающийся с V29.

Яд *O. scrobiculosus* мы разделили по той же схеме, что подробно описана выше для *M. eupeus*. Для поиска KTx использовали химерные каналы KcsA-K_v1.3. На первом этапе цельный яд разделили с помощью гель-фильтрации на четыре фракции. Две фракции вытесняли меченый AgTx-2 из комплекса с каналами, и их разделили с помощью ОФ-ВЭЖХ на 19 и 43 субфракции.

Таблица 34. Предполагаемые предшественники KTx, идентифицированные в транскриптоме ядовитых желез *O. scrobiculosus*.

Название	GenBank / UniProt ID	Последовательность	Идентичность, %	Группа KTx
pOsKTx1-1		MKVFFAILITLFVCSMIIGSHGGVIINVK**C**KISRQ**C**LEP**C**KKAGMRFGK**C**MNGK**C**H**C**TPK		α-KTx 3
BoiTx1	P0C908	MKVFFAVLIALFVCSMVIGIHGGVPINVK**C**RGSRD**C**LDP**C**KKAGMRFGK**C**INSK**C**H**C**TP-	81	
pOsKTx2-1		MSRLFTLVLIVLAMNAMMAIISDPGVEAVG**C**EV**C**PMH**C**KGKNALPT**C**DDGV**C**N**C**NV		α-KTx 9
pOsKTx2-2		MSRLFTLVLIVLAMNAMMAIISDPGVEAVG**C**EE**C**PMH**C**KGKNALPT**C**DDGV**C**N**C**NV	98	
BmP02	Q9NJP7	MSRLFTLVLIVLAMNVMMAIISDPVVEAVG**C**EE**C**PMH**C**KGKNAKPT**C**DDGV**C**N**C**NV	93	
pOsKTx3-1	KX355614	MCRLYAIILIVLVMNVIMTIIPDSKVEVVS**C**ED**C**PEH**C**STQKARAK**C**DNDK**C**V**C**EPI		α-KTx 8
BmP01	Q9U8D2	MSRLYAIILIALVFNVVMTITPDMKVEAAT**C**ED**C**PEH**C**ATQNARAK**C**DNDK**C**V**C**EPK	80	
pOsKTx4-1		MKFLFLTLLVCCFIAVLVIPNEAQIDINVP**C**KHGPEE**C**AEP**C**KRLK**C**LLPSK**C**GNGK**C**S**C**YPSIKIPN**C**KV---		α-KTx 27
BoiTx771	B8XH44	MKFLFLTLFVCCFIAVLVIPSEAQIDINVS**C**RYGSD-**C**AEP**C**KRLK**C**LLPSK**C**INGK**C**T**C**YPSIKIKN**C**KVQTY	85	
pOsKTx5-1		MMTYVFLIVVSLLLISVGITNAVDKY**C**SKNPLD**C**NEH**C**LKTKNETGF**C**HGPKGKEK**C**S**C**MKT		
pOsKTx5-2		MMTYVFLIVVSLLLISVGITNAVDKY**C**SKNPLD**C**NEY**C**LKTKNETGF**C**HGPKGNEK**C**S**C**MKT	97	
TXKs2	Q95P88	-MTYAILIIVSLLLISDRISNVVDKY**C**SENPLD**C**NEH**C**LKTKNQIGI**C**HGANGNEK**C**S**C**MES	74	
pOsKTx6-1		MKFIIVLILISVLMITTVPVSEAGGYGS**C**QNLQD**C**QRY**C**STPDR**C**SYGT**C**Y**C**KTTGK		α-KTx 17
BmKK4	Q95NJ8	MKFIIVLILISVLIATIVPVNEA--QTQ**C**QSVRD**C**QQY**C**LTPDR**C**SYGT**C**Y**C**KTTGK	75	
pOsKTx7-1		MQRNLVVLLFLGMVALSSCGLREKHFQKLVKYAVPEGTLRTILQTAVHKVGKTQFG**C**PAYQGY**C**DDH**C**QDIENKEGF**C**HGFK**C**K**C**GVPMGF		β-KTx 1
MeuTXKβ1	A9XE60	MQRNLVVLLFLGMVALSSCGFREKHFQRFVKYAVPESTLRTVLQTVVHKVGKTQFG**C**PAYQGY**C**DDH**C**QDIEKKEGF**C**HGFK**C**K**C**GIPMGF	91	

Условные обозначения — как в таблице 30.

Две субфракции из разных фракций конкурировали с AgTx-2 за связывание с каналами. Их гомогенность подтвердили с помощью ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ МС. Выявлена небольшая активность соседних субфракций, что объясняется примесью. Активный компонент этих субфракций — один и тот же пептид OSK1 (P55896, α-KTx 3.7) (333), что подтверждается МС, ОФ-ВЭЖХ и N-концевым секвенированием. Вероятно, он элюируется на границе двух фракций при разделении яда гель-фильтрацией и потому попадает в обе. В некоторых субфракциях предположительно содержатся низкоаффинные лиганды K_v1.3, так как наблюдалось частичное, но достоверное и воспроизводимое вытеснение меченого AgTx-2.

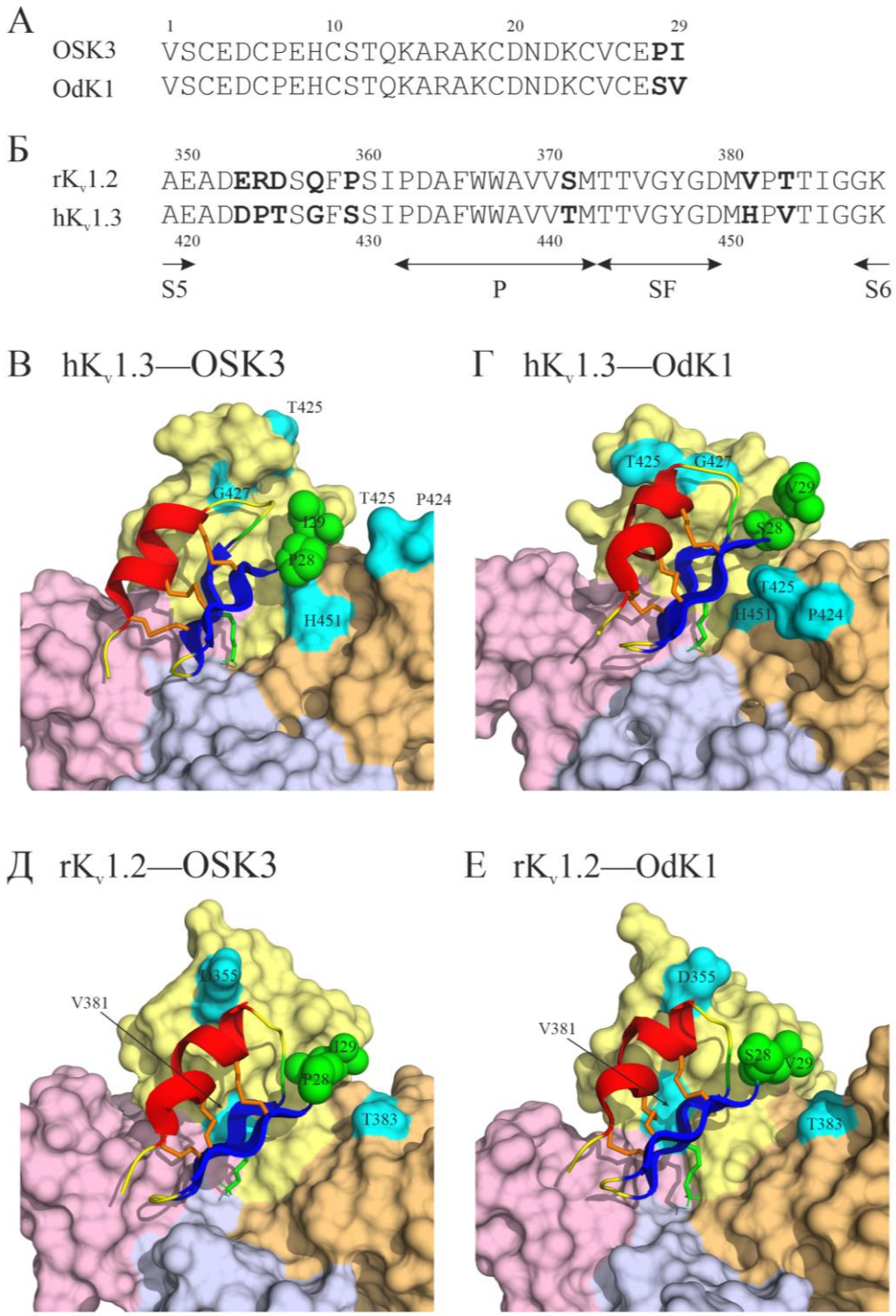
Мы также провели поиск KTx путем сравнения измеренных Мм компонентов яда *O. scrobiculosus* с расчетными значениями, исходя из транскриптомных данных. В результате мы обнаружили в яде пептид, получивший название OSK3 [OSK1 (333) и OSK2 (P83244, α-KTx 13.2) (1025) были известны ранее]. Схема выделения OSK3 включала две стадии ОФ-ВЭЖХ, его аминокислотную последовательность подтвердили секвенированием по Эдману (C0HK17; α-KTx 8.8; 29 a.o., 3 S-S; см. таблицу 32).

В Обзоре литературы [раздел «Токсины, воздействующие на терморецепторы (каналы TRPV1)»] мы упоминали о предположении, что природной мишенью α-KTx 8 служит TRPV1 (94). В концентрации 10 мкМ OSK3 не оказывал влияния на токи, опосредованные TRPV1, в том числе при закислении (pH 6,5). Это кажется удивительным, с учетом того, что вариабельность внутри подсемейства α-KTx 8 низка, а OSK3 содержит упомянутый ключевой K23. Если не принимать гипотезу об артефактах в исследованиях китайских коллег, приходится заключить, что минорные различия в аминокислотной последовательности могут иметь принципиальное значение для воздействия на TRPV1.

3.5.3.1. Структурно-функциональные особенности токсина OSK3

OSK3 — сравнительно слабый KTx: значения IC_{50} составляют сотни нМ и даже мкМ (см. таблицу 33), однако такая низкая эффективность — общее свойство членов подсемейства α-KTx 8 (595, 1026). Отличительной особенностью OSK3 служит его селективность: он активен в отношении K_v1.2 и 1.3, в то время как другие токсины подсемейства α-KTx 8 предпочтительно воздействуют либо на K_v1.2 (OdK1, α-KTx 8.5) (1026), либо на K_v1.3 (MeuKTx-1, α-KTx 8.6), либо на K_v1.1 и 1.3 (BmP01, α-KTx 8.2) (595). При этом в структурном отношении все члены α-KTx 8 очень близки, OSK3 и OdK1 различаются только двумя C-концевыми a.o. (P28 и I29 у OSK3, S28 и V29 у OdK1, см. рисунок 57A).

Рисунок 57. Модели комплексов OSK3 и OdK1 с $rK_v1.2$ и $hK_v1.3$. (А) Сравнение аминокислотных последовательностей OSK3 и OdK1. Полужирным выделены различающиеся а.о. (Б) Сравнение аминокислотных последовательностей внеклеточной области ПД каналов $rK_v1.2$ и $hK_v1.3$ (см. таблицу 31). Нумерация а.о. указана над (для $K_v1.2$) и под (для $K_v1.3$) последовательностями; различающиеся а.о. выделены полужирным. Структурные элементы обозначены стрелками снизу. (В–Е) Модели комплексов после 100 нс МД. Показан внешний вестибюль каналов, мономеры окрашены разными цветами. Остатки, которые различаются между $rK_v1.2$ и $hK_v1.3$ и участвуют во взаимодействии с КТх, окрашены в голубой цвет. Токсины в ленточном представлении; дисульфидные мостики окрашены оранжевым. Боковые цепи двух С-концевых а.о. показаны зелеными сферами, а ключевого остатка лизина (К18) — зелеными линиями.



Мы попытались объяснить селективность OSK3. Для этого мы построили модели комплексов OSK3 и OdK1 с K_v1.2 и 1.3, провели МД и оценку наблюдаемых межмолекулярных контактов (рисунок 57; подробней о молекулярном моделировании комплексов КТх и K_v см. в Методах и в следующем разделе).

Если комплексы с rK_v1.2 мало отличались друг от друга, то в случае hK_v1.3 мы наблюдали существенные различия: OSK3 образовывал существенно больше водородных связей и гидрофобных контактов с каналом по сравнению с OdK1. В частности, С-концевые различающиеся а.о. токсинов формировали множественные контакты с изоформ-специфичными а.о. каналов. К примеру, I29 у OSK3 формирует контакты с T425 двух соседних субъединиц K_v1.3 и P424 — все они отсутствуют в комплексе с OdK1 (рисунок 57В, Г). Обобщая, можно сказать, что массивные С-концевые а.о. OSK3 плотно упаковываются во входном вестибюле K_v1.3, в то время как сравнительно небольшие а.о. OdK1 не формируют стабильных взаимодействий, что приводит к падению аффинности.

Исследование OSK3 было нами опубликовано (1027).

3.5.4. Значение исследования природных блокаторов K^+ каналов

В любой области важна систематизация знаний. В этом ключе создание и развитие нами базы данных Kalium — важный этап. Теперь впервые исследователям доступна полная картина изученного многообразия лигандов K^+ каналов. Появилась возможность простой оценки: для каких каналов известны высокоаффинные селективные лиганды, каково их разнообразие, сравнительные характеристики, а в каких случаях, наоборот, необходимы дополнительные изыскания.

Наше исследование состава яда скорпионов *M. eupeus* и *O. scrobiculosus* демонстрирует успешность стратегии поиска блокаторов K_v в природном источнике с помощью подходов пептидомики и транскриптомики. К примеру, в яде *M. eupeus* мы обнаружили MeKTx11-1 (α-КТх 1.16) — один из самых высокоаффинных и селективных лигандов K_v1.2 (таблицы 32 и 33). В настоящее время эта стратегия получила распространение, яд многих скорпионов изучен именно таким образом (113-117). Вместе с тем, как мы указывали в Обзоре литературы (раздел «Молекулярный состав яда паукообразных»), эти работы не лишены недостатков. Полагаем, что предложенный нами способ поиска в транскриптомах последовательностей токсинов с помощью регулярных выражений должен использоваться наряду с традиционным подходом на основе Blast2GO, это обеспечит наиболее полный анализ.

3.6. Создание искусственных лигандов K^+ каналов

В предыдущем разделе мы показали, как может быть исследовано разнообразие природных лигандов K^+ каналов — на примере пептидных блокаторов из яда скорпионов. При всей привлекательности этих соединений они обладают и рядом недостатков. Далеко не всегда природные лиганды характеризуются высокой избирательностью к выбранной мишени. Кроме того, с точки зрения разработчиков лекарств, яд не самый удачный источник, поскольку немедленно ассоциируется с токсичностью. Как будет показано ниже, мы сумели получить искусственные лиганды K^+ каналов двумя способами: (1) путем внесения модификаций в структуру известных природных КТх и (2) взяв за основу пептид, который не обладает аффинностью к этим мишеням. Во втором случае мы применили скаффолд-инженерию: в качестве каркаса выбрали достаточно простой «минималистичный» тип укладки, введение в состав пептида ключевых а.о. в определенных позициях привело к появлению искомой активности.

3.6.1. Получение производных α-КТх с измененной активностью

За основу мы взяли хорошо изученные пептиды: СТХ (α-КТх 1.1; подробно о нем см. в Обзоре литературы раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов») (329, 330) и MeKTx13-3 (α-КТх 3.19), охарактеризованный нами (см. предыдущий раздел). С помощью молекулярного моделирования мы оценили вклад а.о. токсинов во взаимодействие с K_v, на основании чего предложили аминокислотные замены для изменения аффинности в отношении определенных изоформ каналов. Мы затем получили пептиды с предложенными заменами и изучили их активность.

3.6.1.1. Моделирование комплексов α-КТх с K_v

Работы по моделированию комплексов токсинов и ионных каналов были выполнены главным образом в группе анализа структуры мембранных белков *in silico* и лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН, вновь об этом упоминать не будем. В настоящее время известна структура комплекса СТХ с K^+ каналом (химерой $K_v1.2/K_v2.1$; PDB ID: 4JTA; см. Обзор литературы, раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов», рисунок 9) (347). Комплексы КТх с K_v мы моделировали на основе этой известной структуры, что подробно описано в Методах. Как упоминалось выше, MeKTx13-3 имеет идентичную последовательность с BmKTX из *M. martensii* (α-КТх 3.6) (1021), пространственная структура которого изучена (PDB ID: 1BKT) (1028). Другие пептиды мы моделировали по гомологии. Структуру нужных КТх совмещали (проводили 3D-выравнивание) со структурой СТХ в комплексе, которую затем убирали. Таким образом получали комплекс

KTx с K_v1.2. Комплексы с другими K_v моделировали аналогично, но в этом случае первым шагом было совмещение модели нужного канала с химерой K_v1.2/K_v2.1, которую затем убирали. Полученные комплексы помещали внутрь мембраны, состав которой (ПОФХ / ПОФЭ / Хол; 2 : 1 : 1) был выбран для имитации мембран нейронов (1029, 1030), и проводили МД. В качестве примера на рисунке 58А показана модель комплекса K_v1.3 с MeKTx13-3. Образующиеся межмолекулярные контакты в траекториях МД идентифицировали и оценивали, используя набор алгоритмов, описанных в Методах, с помощью программы IMPULSE.

3.6.1.2. Получение рекомбинантных α-KTx

Рекомбинантные CTX, MeKTx13-3 и их производные мы получали по стандартной процедуре, описанной в Методах, в бактериальной системе экспрессии. Мы использовали штамм *E. coli* SHuffle T7 Express. Синтетические гены, кодирующие пептиды, встраивали в экспрессионный вектор pET-32b(+), в качестве белка-помощника использовали Trx для обеспечения высокого выхода дисульфид-богатых пептидов с нативной укладкой. Целевые пептиды получали в результате расщепления гибридного белка энтеропептидазой с последующим разделением с помощью ОФ-ВЭЖХ (см. рисунок 49) и идентификацией с помощью МАЛДИ МС. Измеренные Мм очищенных пептидов соответствовали расчетным значениям. Конечный выход пептидов составил ≈5 мг с 1 л питательной среды.

Следует отметить, что природный MeKTx13-3 имеет С-концевое амидирование, тогда как у рекомбинантных пептидов эта модификация отсутствует. В результате у рекомбинантного MeKTx13-3 несколько снижена активность: IC_{50} в отношении K_v1.1 составляет 6,7 ± 2,7 нМ (у нативного токсина 1,9 ± 0,2 нМ).

3.6.1.3. MeKTx13-3_AAAR, переключение селективности с K_v1.1 на K_v1.3

Электрофизиологические эксперименты, выполненные нами, показали предпочтительную активность MeKTx13-3 против K_v1.1 и (на порядок хуже) K_v1.3 (см. раздел «Активность новых токсинов», рисунок 56, таблица 33). Анализ моделей комплексов K_v1.1–1.3 с MeKTx13-3 (рисунок 58) позволяет выявить существенные различия во взаимодействии токсина с тремя изоформами. Во-первых, в случае K_v1.2 токсин не образует с каналом π-катионных или стэкинг-контактов, в отличие от K_v1.1 или 1.3, что согласуется со сравнительно низкой активностью на K_v1.2. Во-вторых, Q12 образует водородную связь с D355 у K_v1.2. Аналогичный контакт с T425 у K_v1.3 не наблюдается, поскольку этот а.о. слишком мал, Q12 до него не дотягивается, а конформация петли у K_v1.1 такова, что здесь Q12 не дотягивается до E353. В-третьих, K15 образует солевой мостик с E353 у K_v1.1. Этот контакт отсутствует в случае других двух изоформ: с D355 у K_v1.2 он не формируется из-за соседне-

го R354, который отталкивает K15, а T425 у K_v1.3 слишком мал, K15 до него не дотягивается. В-четвертых, K18 образует водородную связь с S354 и π-катионный контакт с H355 у K_v1.1, водородную связь с Q357 у K_v1.2, в то время как конформация петли у K_v1.3 такова, что K18 до нее не дотягивается (ситуация похожа на Q12). Если поменять указанные а.о. токсина на инертный аланин, мы ожидаем возрастания селективности в отношении K_v1.3, ведь с этой изоформой они контактов не формируют. Кроме того, анализ моделей показывает, что в случае всех трех изоформ D33 невыгоден, поскольку сближен с D377/379/449. Если произвести замену этого а.о. на положительно заряженный, мы ожидаем увеличение аффинности.

Мы получили MeKTx13-3 с четырьмя заменами: Q12A, K15A, K18A и D33R — в *E. coli* и назвали его MeKTx13-3_AAAR. Тестирование на K_v показало, что наши предположения верны: активность в отношении K_v1.1 и K_v1.2 снизилась (рисунок 59, таблица 33). Она также упала против K_v1.6, а вот на K_v1.3 не изменилась. В результате мы получили K_v1.3-селективный пептид.

Рисунок 58. Молекулярная модель комплексов K_v1.1–1.3 с MeKTx13-3 и MeKTx13-3_RMRH. (А) Сравнение аминокислотных последовательностей MeKTx13-3 и его производных. Полужирным выделены а.о., отличающиеся от MeKTx13-3. (Б) Сравнение аминокислотных последовательностей внеклеточной области ПД каналов rK_v1.1, rK_v1.2 и hK_v1.3 (см. таблицу 31). Нумерация а.о. указана над соответствующими последовательностями; различающиеся а.о. выделены полужирным. Структурные элементы обозначены стрелками снизу. (В) Общий вид структуры комплекса K_v1.3 с MeKTx13-3 после 100 нс МД. Четыре α-субъединицы канала раскрашены в разные цвета; часть трансмембранных спиралей и внеклеточных петель не показана. Липиды представлены полусферическими полупрозрачнными моделями; атомы окрашены: кислород красный, фосфор оранжевый, азот синий, углерод ПОФХ светло-желтый, углерод ПОФЭ желтый, углерод Хол бежевый; некоторые липиды не показаны. Ленточная модель MeKTx13-3 окрашена розовым, показан K26, блокирующий пору канала. (Г, Д) Крупный план области внешнего вестибюля поры канала в комплексах K_v1.1 и 1.2 с MeKTx13-3. Каналы полупрозрачные; показаны K26 и а.о. токсина, участвующие в межмолекулярных контактах, которые отсутствуют в комплексе с K_v1.3. Солевые мостики и водородные связи показаны желтыми пунктирными линиями. Липиды не показаны. (Е) Крупный план вестибюля K_v1.1 в комплексе с MeKTx13-3_RMRH; две панели представляют вид с разных ракурсов. Показаны боковые цепи а.о., участвующих в межмолекулярных контактах; для P36, K37 и G376 показаны некоторые атомы основной цепи. Солевые мостики и водородные связи отмечены зелеными пунктирными линиями.

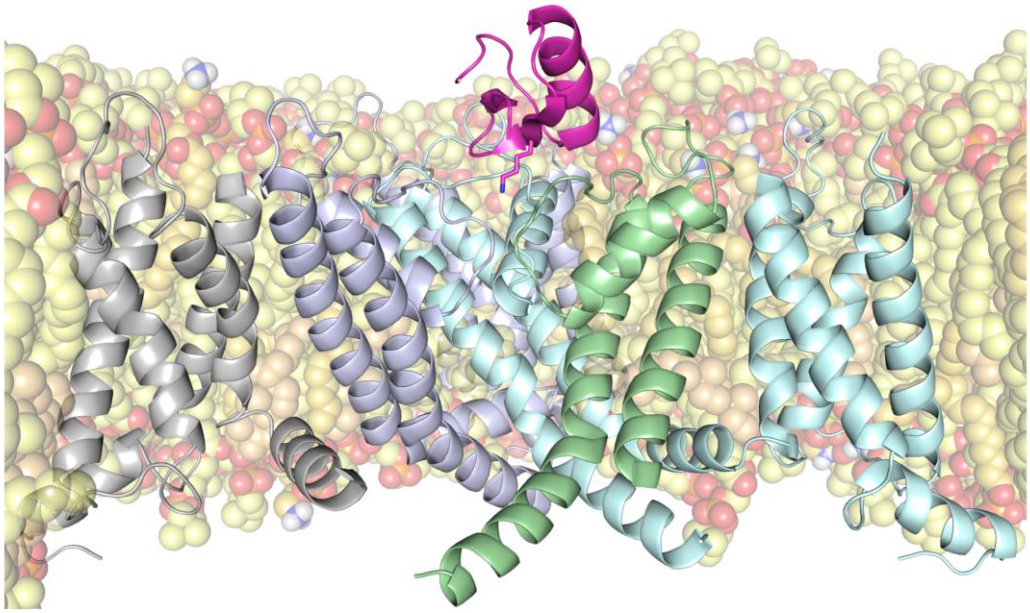
А

```
                    1         10        20        30   37
MeKTx13-3           VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCINGKCDCTPK
MeKTx13-3_AAAR      VGINVKCKHSGACLAPCADAGMRFGKCINGKCRCTPK
MeKTx13-3_RMRH      VGINVKCKHSRQCLKPCKDAGMRFGKCMNRKCHCTPK
```

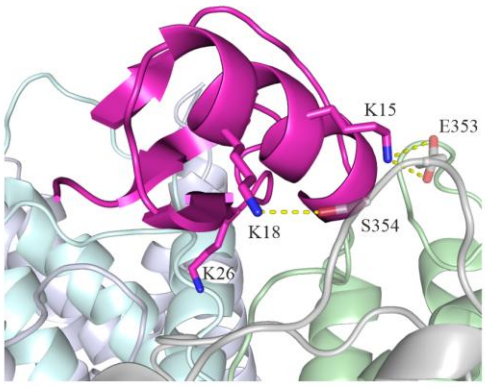
Б

```
                    350       360       370       380
rKv1.1              AEAEEAESHFSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMYPVTIGGK
                    350       360       370       380
rKv1.2              AEADERDSQFPSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDMVPTTIGGK
                    420       430       440       450
hKv1.3              AEADDPTSGFSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMHPVTIGGK
                    →         ←————————→←————→         ←
                    S5                  P     SF        S6
```

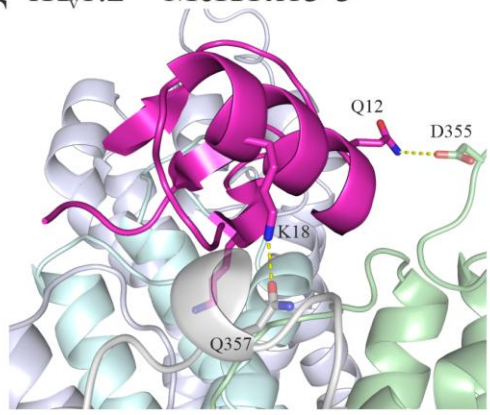
В hKv1.3—MeKTx13-3



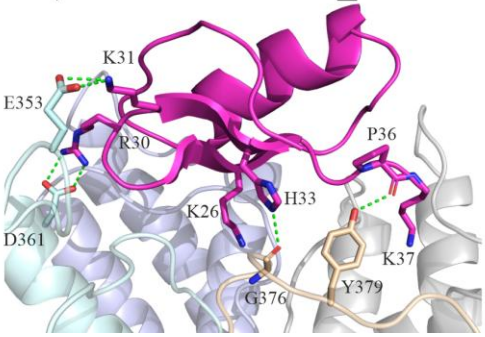
Г rKv1.1—MeKTx13-3



Д rKv1.2—MeKTx13-3



Е rKv1.1—MeKTx13-3_RMRH



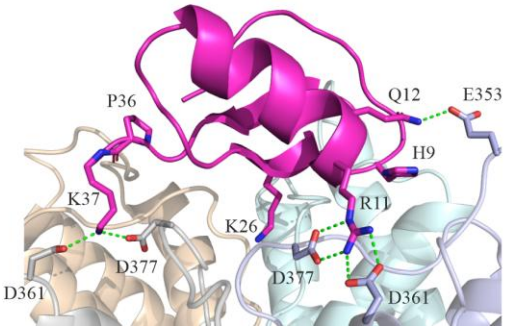
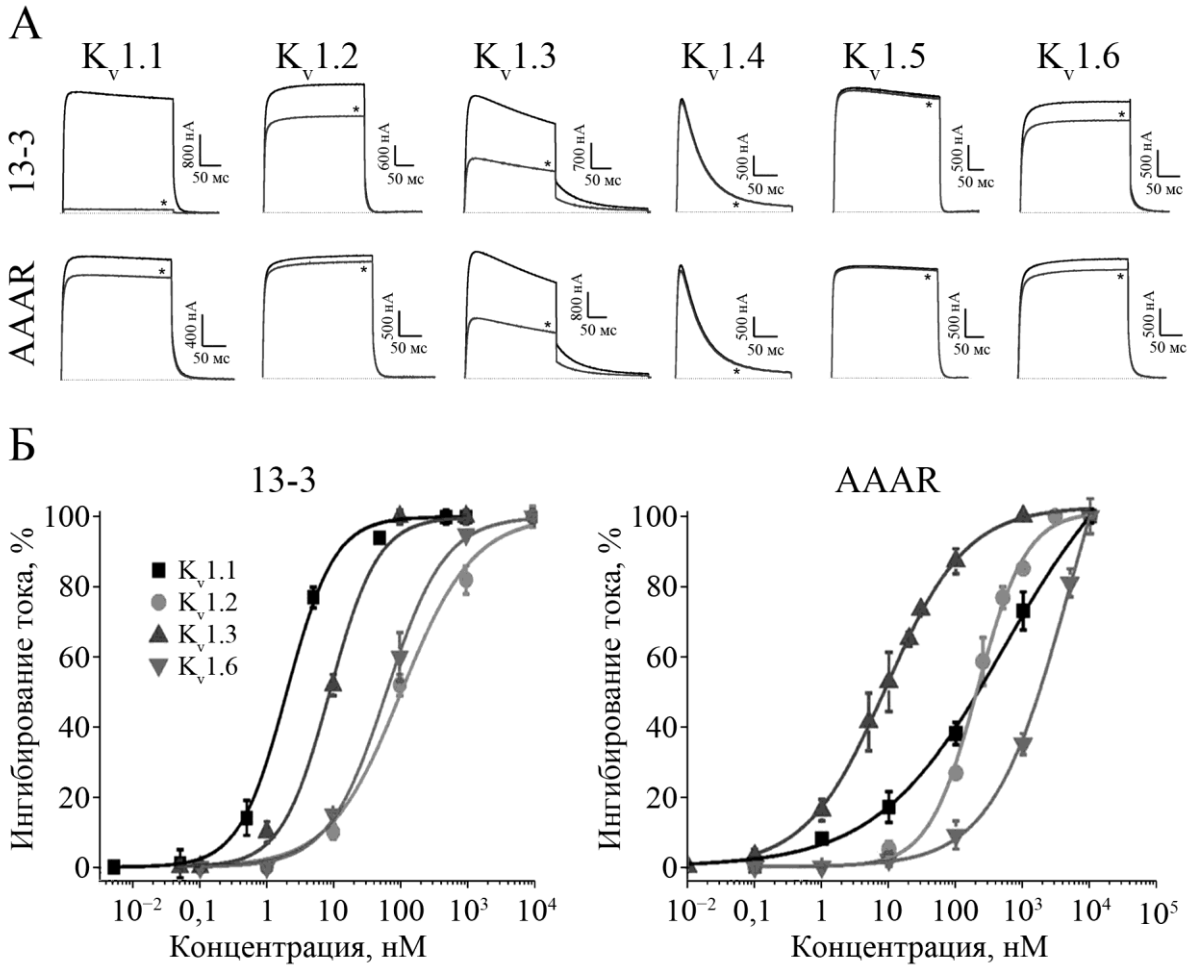


Рисунок 59. Активность MeKTx13-3 и MeKTx13-3_AAAR канах K_v1.1–1.6. (А) Репрезентативные записи токов через каналы в контроле и после приложения 10 нМ пептидов (отмечены звездочками). (Б) Кривые «доза–ответ».



3.6.1.4. MeKTx13-3_RMRH, увеличение аффинности и селективности к K_v1.1

Мутагенез BmKTX, проведенный китайскими исследователями, показал, что замена D33H усиливает активность пептида в отношении K_v1.3 (1031). Другой мутантный вариант BmKTX — искусственный пептид ADWX-1 — содержит R11 и H33 и блокирует K_v в субнаномолярных концентрациях (1032), замена их на аланин приводит к значительному снижению активности. Анализ данных, собранных в Kalium, показывает, что представители подсемейства α-KTx 3, эффективно блокирующие K_v1.3, помимо этих двух а.о., имеют M28/29 и R30/31. MeKTx13-3 с четырьмя заменами G11R, I28M, G30R и D33H был получен в *E. coli* и получил название MeKTx13-3_RMRH. Тестирование его активности на K_v показало увеличение эффективности и селективности к K_v1.1 (таблица 33).

Для объяснения полученного результата мы прибегли к компьютерному моделированию и сравнили контакты, образуемые MeKTx13-3 и его производным в комплексах с K_v. Замены G11R, G30R и D33H приводят к значительному увеличению количества межмолеку-

лярных контактов со всеми изоформами, что не объясняет повышение селективности. Однако в ходе МД MeKTx13-3_RMRH занимает уникальное положение во входном вестибюле K_v1.1 (рисунок 58E) в сравнении с другими изоформами, что обусловлено контактами, формируемыми R11 и R30. В частности, контакты R30–F356 и R30–D361 фиксируют участок канала между этими а.о. рядом с токсином, что ограничивает подвижность соседнего фрагмента, обеспечивая оптимальное положение E353 для образования солевого мостика с K31. Аналогичные контакты не реализуются в комплексах с K_v1.2 или 1.3, поскольку боковые цепи D351/T375 не могут дотянуться до K31. MeKTx13-3_RMRH — один из самых специфичных лигандов K_v1.1. Его избирательность, по-видимому, обусловлена особым расположением молекулы пептида в комплексе с этой изоформой.

3.6.1.5. CTX_M29I, увеличение аффинности и селективности к K_v1.2

В лаборатории К. Миллера был получен ряд производных CTX, в частности пептид с заменой M29I. Если в канале дрозофилы Shaker произвести замену T449F, аффинность CTX_M29I падает в 1650 раз по сравнению с обычным CTX. В каналах млекопитающих в соответствующей позиции находятся различные а.о. (V381 у rK_v1.2, см. таблицу 31), в том числе ароматические. Мы получили рекомбинантные CTX и CTX_M29I и оценили их активность в отношении K_v. Оказалось, что CTX_M29I проявляет уникальную аффинность и селективность к K_v1.2 (таблица 33). Сопоставимой селективностью обладают охарактеризованный нами MeKTx11-1 (α-KTx 1.16; см. о нем в предыдущем разделе, таблица 33), уротоксин (α-KTx 6.21) (1033) и мезомартоксин (α-KTx 26.4) (1034), но их аффинность существенно ниже. Pi-4 (α-KTx 6.4) из яда скорпиона *P. imperator* обладает сходной аффинностью и даже превосходит ChTx_M29I по селективности (1035), однако он не тестировался на K_v1.6.

Результаты по получению и характеристике искусственных изоформ-специфичных блокаторов K_v за счет модификации известных KTx опубликованы (1036-1038).

3.6.2. Получение блокаторов K^+ каналов на основе α-гарпининов

3.6.2.1. Сходство защитных пептидов растений с токсинами паукообразных

Защитные пептиды (ЗП) — обширная группа пептидов, объединяемых по общей выполняемой функции защиты от патогенов. Растения синтезируют большое разнообразие ЗП, которые по родству и сходству структуры объединяют в семейства, такие как дефензины, тионины или хитин-связывающие гевеноподобные пептиды. Аналогично токсинам, ЗП растений — это часто дисульфид-богатые пептиды, которые характеризуются определенной пространственной укладкой (1039). Встречаются случаи, когда у ЗП растений и токсинов

животных оказывается общий фолд. Один из примеров — сходство α-KTx с дефензинами, да и вообще сходство всех полипептидов, содержащих мотив CSα/β (137).

Наша работа, начатая под руководством Ц.А. Егорова, привела к открытию и характеристике семейства ЗП растений, которые мы назвали α-гарпининами (англ. α-hairpinins) (1040-1042). Характерной особенностью α-гарпининов служат два мотива первичной структуры вида CX_3C, где C — остаток цистеина, X — любой а.о. В пространстве эти пептиды формируют α-спиральную шпильку (отсюда название семейства): две антипараллельные α-спирали, скрепленные двумя S-S-мостиками. По сути, мы имеем дело с пептидами, содержащими мотив CSα/α 2(S-S), описанный у некоторых токсинов скорпионов (κ-KTx; см. разделы «Пространственная структура дисульфид-содержащих пептидов» и «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов» Обзора литературы) (319, 320) и конусов (1043). Очевидно, что среди не только крупных белковых доменов, но и достаточно небольших пептидов, мы находим общие устойчивые типы укладки, при том, что конкретные соединения обладают различающимися свойствами и выполняют разнообразные функции. Мы решили использовать α-гарпининовую укладку для скаффолд-инженерии блокаторов K^+ каналов.

3.6.2.2. Tk-hefu-1 — пептид на основе α-гарпинина, блокирующий K^+ каналы

В качестве шаблона мы выбрали α-гарпинин Tk-AMP-X2 (28 а.о., 2 S-S; таблица 35) из семян пшеницы *Triticum kiharae* (1044). Выбор этот достаточно случаен, мы стремились взять в работу пептид, исследованный нами, не слишком большой, чтобы мог достаточно свободно взаимодействовать с устьем K^+ каналов; решили использовать Tk-AMP-X2, потому что он в тот момент нами интенсивно изучался. Сравнение аминокислотных последовательностей Tk-AMP-X2 и κ-хефутоксина-1 показывает, что в структуре пептида пшеницы отсутствуют а.о. функциональной диады блокаторов K^+ каналов (Y5 и K19 у κ-хефутоксина-1). Мы решили попросту внедрить эти а.о. в Tk-AMP-X2 (произвести замены E6Y и M22K). Вдобавок мы заменили остаток лизина, оказавшийся соседним с ключевым лизином диады (K23), на глутамат, имеющий место у κ-хефутоксина-1: дело в том, что наши бельгийские коллеги, изучавшие активность κ-хефутоксина-1 и его производных, пришли к выводу, что соседство лизина негативно сказывается на активности в отношении K^+ каналов (1045). Итак, мы решили получить тройной мутант Tk-AMP-X2 с заменами E6Y, M22K и K23E; этот пептид был назван Tk-hefu или Tk-hefu-1 (поскольку в дальнейшем мы занимались получением его аналогов с порядковыми номерами).

Таблица 35. Аминокислотные последовательности пептидов Tk-hefu и их активность против K^+ каналов.

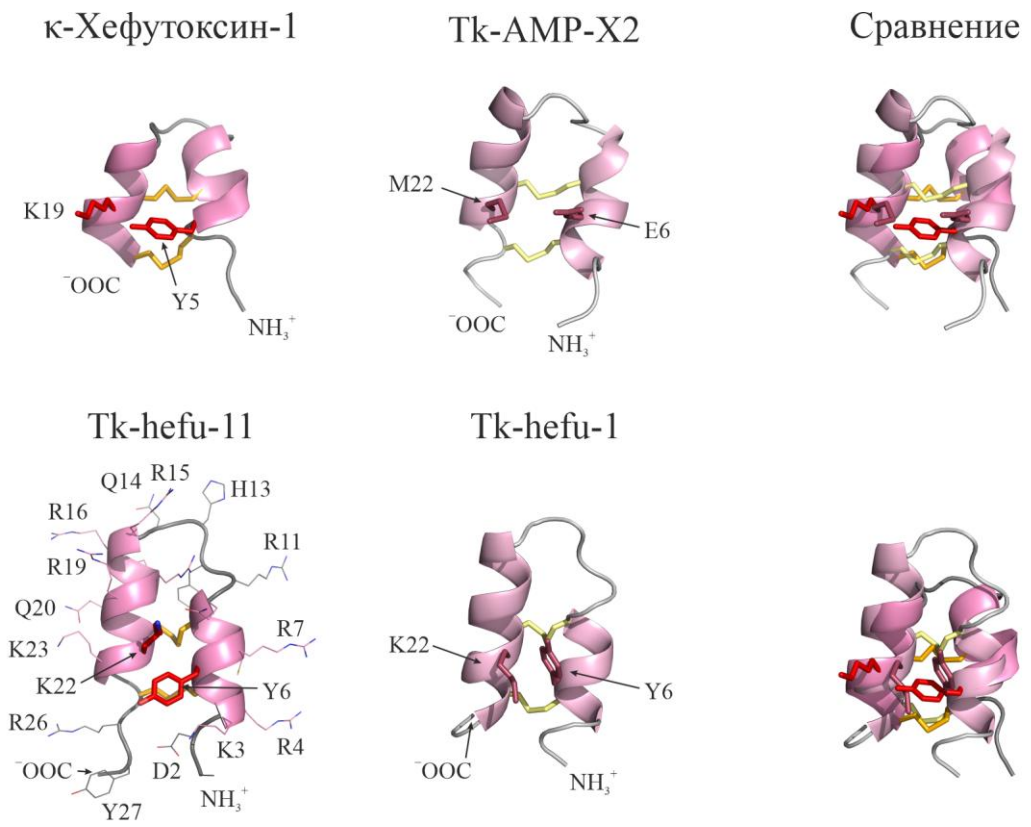
Название	Последовательность	IC_{50}, нМ			
		$K_v1.1$	$K_v1.2$	$K_v1.3$	$K_v1.6$
	1 5 10 15 20 22				
к-Хефутоксин-1	-GHACYRNCWR--EGNDEETCKERC---	-[1]	150 000 (K_d)[2]	40 000 (K_d)	[3]
Tk-AMP-X2	ADDRCERMCQRYHDRREKKQCMKGCRYG	-	-	-	-
Tk-hefu-1	ADDRCYRMCQRYHDRREKKQCK**E**GCRYG	-	40 000 / 8[4]	34 000 ± 2800	40 000 / 7
Tk-hefu-2	ADDRCYRMCQRYHDRREKKQCKKGCRYG	-	40 000 / 12	2300 ± 400	40 000 / 17
Tk-hefu-3	ADDRCYRMCQRYHDRREKKQCMKGCRYG	-	-	-	-
Tk-hefu-4	ADDRCERMCQRYHDRREKKQCKKGCRYG	-	40 000 / 12	11 100 ± 2800	40 000 / 5
Tk-hefu-5	A**K**DRCYRMCQRYHDRREKKQCKKGCRYG		10 000 / 12	2700 ± 300	10 000 / 11
Tk-hefu-6	AD**K**RCYRMCQRYHDRREKKQCKKGCRYG			700 ± 100	2000 / 31
Tk-hefu-7	A**QK**RCYRMCQRYHDRREKKQCKKGCRYG			700 / 39	2000 / 64
Tk-hefu-8	A**QK**RCYRMCQRYHDRRE**RR**QCKKGCRYG		5000 / 40	700 / 59	2000 / 21
Tk-hefu-9	A**QK**RC**KQ**MCQRYHDRRE**RR**QCKKGCRYG		5000 / 24	700 / 62	
Tk-hefu-10	A**QK**RC**KQ**MCQRYH**Q**RR**QRR**QCKKGCRYG		5000 ± 2000	152,7 ± 34,2	5000 / 30
Tk-hefu-11	AD**K**RCYRMCQRYH**Q**RR**QRR**QCKKGCRYG	1000 / 41	1000 / 50	70,4 ± 2,9[5]	10,0 ± 0,5[5]
	1 5 10 15 20 25 28				

Прочерки в последовательность к-хефутоксина-1 добавлены для удобства сравнения. Сверху представлена нумерация а.о. для к-хефутоксина-1, снизу — для Tk-AMP-X2 и Tk-hefu. Остатки цистеина показаны на желтом фоне; аминокислотные замены, введенные в Tk-AMP-X2 для получения пептидов Tk-hefu, выделены жирным шрифтом, а.о. функциональной диады окрашены красным. [1]-, нет активности при 20 мкМ. [2]Значения K_d приведены в (319). [3]Пустые клетки означают, что тестирование не проводилось. [4]«X / Y» означает, что при концентрации X нМ наблюдалось Y процентов ингибирования тока. [5]Эти данные представляют значения EC_{50} в нМ.

Мы получили рекомбинантные Tk-AMP-X2 и Tk-hefu-1 по стандартной процедуре в бактериальной системе экспрессии [использовали штамм *E. coli* BL21(DE3) и энтеропептидазу для расщепления гибридного белка с Trx] с выходом ≈ 4–5 мг с 1 л питательной среды. Для структурных исследований с помощью спектроскопии ЯМР мы получили ^{15}N-меченые Tk-AMP-X2 и Tk-hefu-1 с таким же выходом; в этом случае мы использовали минимальную среду M9 с добавкой ISOGRO-^{15}N. Пространственную структуру пептидов в растворе изучали в лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН (большинство других токсинов тоже исследовались в этой лаборатории, далее об этом специально не упоминаем). Химические сдвиги и координаты атомов депонировали в базах данных PDB и Biological Magnetic Resonance Data Bank (BMRB; PDB IDs: 2M6A для Tk-AMP-X2 и 5LM0 для Tk-hefu-1; то же делали в случае других изученных пространственных структур, далее об этом не упоминаем).

На рисунке 60 показана пространственная структура обоих пептидов в сравнении с κ-хефутоксином-1. Хорошо заметна их общая α-гарпининовая укладка: две антипараллельные α-спирали, удерживаемые двумя S-S-мостиками. Очевидно также структурное подобие κ-KTx (см. разделы «Пространственная структура дисульфид-содержащих пептидов» и «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов» Обзора литературы) и очень близкое относительное расположение а.о. диады κ-хефутоксина-1 (Y5 и K19) и Tk-hefu-1 (Y6 и K22). Стоит упомянуть и некоторую неожиданность: пространственная структура Tk-hefu-1 все-таки значимо отличается от Tk-AMP-X2, несмотря на то что по аминокислотной последовательности они отличаются всего лишь тремя а.о. В частности, у Tk-AMP-X2 первая α-спираль на один виток короче и сопровождается витком 3_{10}-спирали, а вторая α-спираль короче на два а.о. Кроме того, различается угол скрещивания спиралей: 158 ± 3° у Tk-hefu-1, 133 ± 5° у Tk-AMP-X2. Tk-hefu-1 плотнее упакован, в его структуре обнаруживаются 29 дальних контактов в сравнении с только тремя у Tk-AMP-X2 (по спектрам NOESY). Наконец, если конформация дисульфидов у Tk-AMP-X2 не фиксирована, то в случае Tk-hefu-1 преобладает определенная конформация S-S-мостиков. Детальный анализ структуры пептидов позволяет понять причину этих различий; дело в том, что привнесенные а.о. образуют дополнительные контакты у Tk-hefu-1: Y6 формирует π-катионные взаимодействия с K18 и K22, а E23 образует солевой мостик с K19. Про возможность подобного влияния единичных замен на структуру пептидов стоит помнить при рациональном дизайне биологически активных соединений.

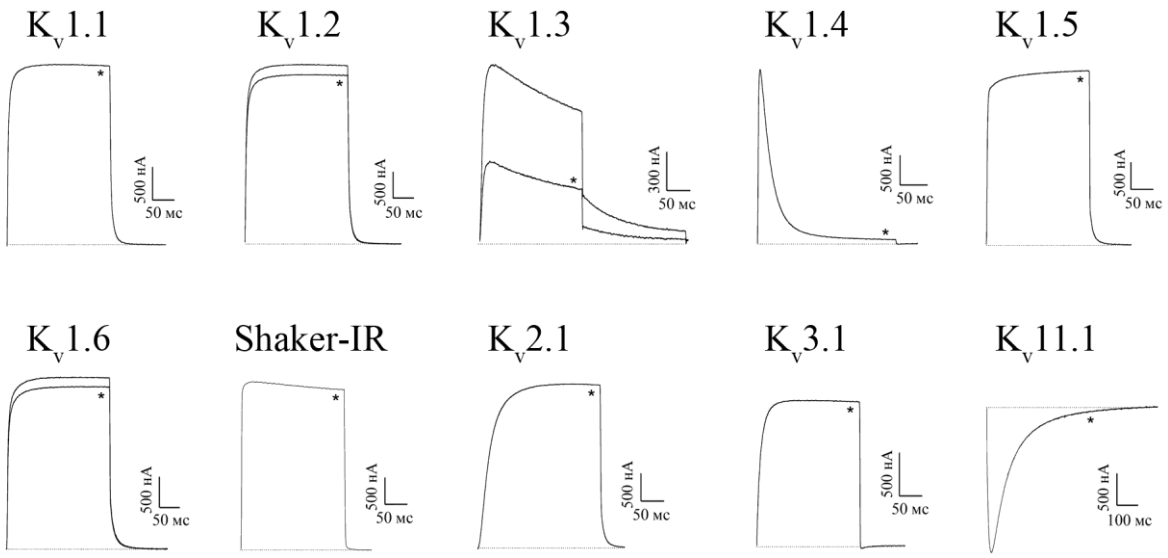
Рисунок 60. Пространственная структура поровых блокаторов K^+ каналов, созданных на основе α-гарпинина. Показаны структуры: κ-хефутоксина-1 (PDB ID: 1HP9), Tk-AMP-X2 (2M6A), Tk-hefu-1 (5LM0, внизу в центре) и Tk-hefu-11 (7QXJ, внизу слева). Справа показано сравнение структуры κ-хефутоксина-1 и Tk-AMP-X2 (вверху) или Tk-hefu-1 (внизу). Обозначения и цвета как на рисунке 7. Tk-AMP-X2 и Tk-hefu-1 раскрашены в отличающиеся от κ-хефутоксина-1 тона для удобства сравнения. Боковые заместители а.о. у Tk-hefu-11, не принадлежащих функциональной диаде и не формирующих S-S-мостики, показаны линиями и окрашены в цвета атомов: азот синий, кислород красный, сера желтая.



Мы протестировали активность Tk-AMP-X2 и Tk-hefu-1 на панели K^+ каналов. Оказалось, что пептид пшеницы не оказывает на них влияния в очень высоких концентрациях (250 мкМ), в то время как искусственный пептид в концентрации 40 мкМ блокировал токи, опосредованные K_v1.2, 1.3 и 1.6, на 8,3 ± 1,3%, 58,4 ± 1,6% и 7,3 ± 2,3%, соответственно (рисунок 61). Значение IC_{50} в отношении K_v1.3 составило 34,0 ± 2,8 мкМ. Tk-hefu-1 не влиял на воротные процессы каналов; в частности, не менялось значение потенциала полумаксимальной активации каналов ($V_{1/2,K}$ = −8,4 ± 1,8 мВ в контроле и −5,5 ± 2,4 мВ при приложении 40 мкМ пептида к K_v1.3); не изменялся уровень блока в диапазоне активирующих потенциалов от −30 до 30 мВ.

Таким образом, замена всего лишь трех а.о. в структуре не активного в отношении K^+ каналов природного пептида приводит к получению нового селективного лиганда K_v1.3. α-Гарпининовая укладка оказывается поддающейся манипуляциям скаффолд-инженерии.

Рисунок 61. Активность Tk-hefu-1 в отношении K^+ каналов. Показаны репрезентативные записи токов через каналы в контроле и после приложения 40 мкМ Tk-hefu-1 (отмечены звездочками).



3.6.2.3. Tk-hefu-2 и 10 — улучшенные блокаторы $K_v1.3$

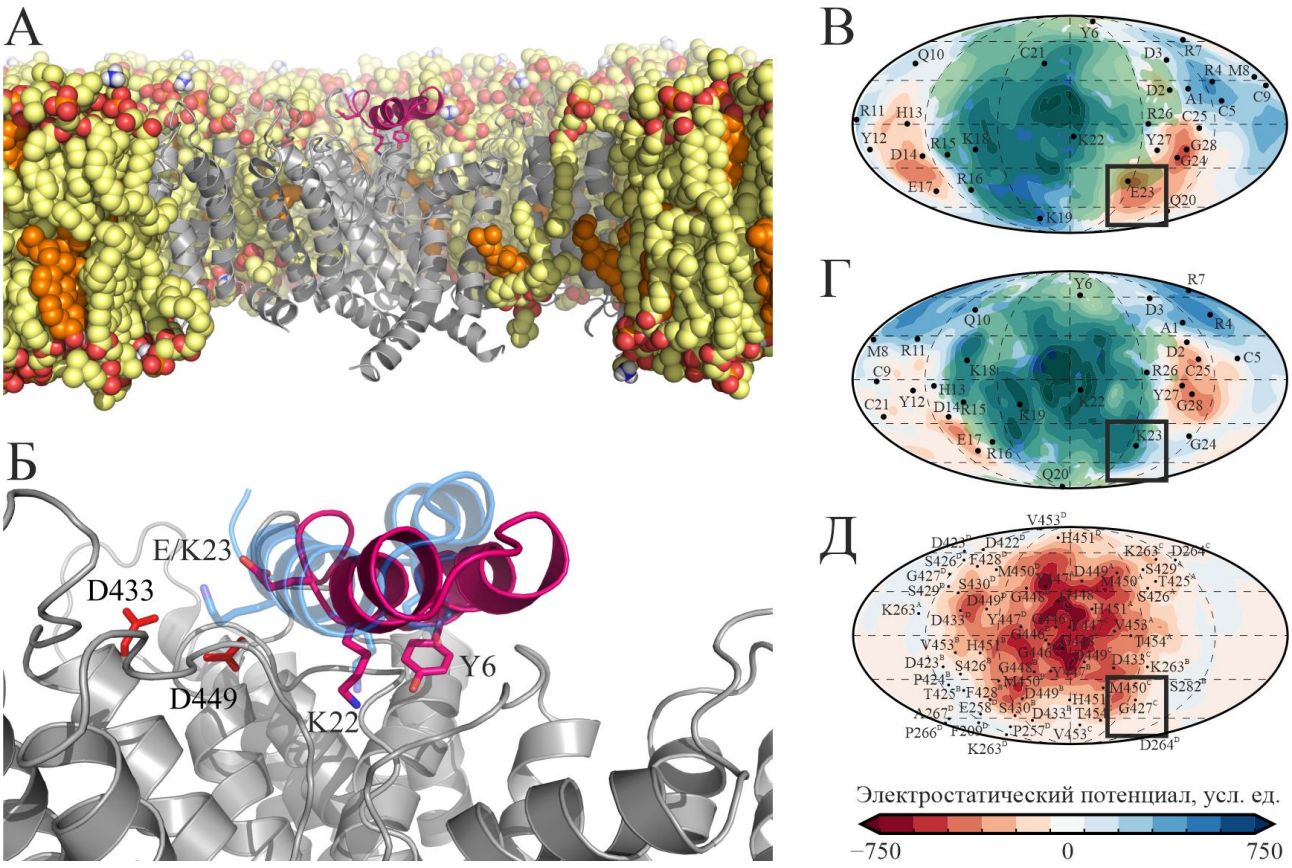
Измеренное значение IC_{50} для Tk-hefu-1 в отношении $K_v1.3$ (34 мкМ) слишком велико, чтобы рассматривать его в качестве исследовательского инструмента или прообраза лекарственного средства. Повышение аффинности можно ожидать, если провести оптимизацию структуры нового лиганда, а для этого хорошо бы понимать, каким образом пептид взаимодействует с каналом.

Поскольку при создании Tk-hefu-1 мы руководствовались известными в настоящее время сведениями о структуре и функционально важных а.о. поровых блокаторов K^+ каналов, а также поскольку полученные нами данные электрофизиологии говорят в пользу именно такого механизма действия нового лиганда, мы решили провести моделирование его комплекса с $K_v1.3$ на основе структуры комплекса CTX с $K_v1.2/K_v2.1$ — аналогично описанной выше процедуре для KTx (раздел «Моделирование комплексов α-KTx с K_v»). Для этого мы осуществили пространственное совмещение функциональной диады Tk-hefu-1 с диадой CTX и заменили токсин в составе комплекса на наш искусственный пептид. Модель структуры $K_v1.3$ мы построили по сходству с известной структурой $K_v1.2$ (3LUT), после чего ее аналогичным образом совместили со структурой химеры $K_v1.2/K_v2.1$ в составе комплекса и заменили последнюю. Таким образом мы получили «ручную» модель комплекса Tk-hefu-1 с $K_v1.3$, послужившую стартовой конформацией для МД. Отметим, что в настоящее время уже известна структура $K_v1.3$ (PDB ID: 7SSX) (1046); сравнительный анализ показывает, что она практически не отличается от нашей модели, во всяком случае в области поры. МД провели

по стандартной процедуре, описанной выше для KTx. Длительность составила 200 нс, в течение которых атом N^{ε} лизина диады (K22) фиксировали в поре канала (рисунок 62А, Б).

Затем поверхности внешнего вестибюля канала и пептида окрасили в соответствии с распределением электростатического потенциала, построили двумерные карты проекции поверхностей на воображаемую сферу, описывающую Tk-hefu-1, по методу белковой топографии (985). Карты построили с усреднением свойств поверхностей по всему ансамблю конформаций, наблюдаемых в ходе МД.

Рисунок 62. Молекулярная модель комплекса $K_v1.3$ с Tk-hefu-1 и 2. (А) Общий вид структуры комплекса $K_v1.3$ с Tk-hefu-1 после 200 нс МД внутри бислойной липидной мембраны. Канал окрашен серым; часть трансмембранных спиралей и внеклеточных петель не показана. Липиды представлены полусферическими моделями; атомы окрашены: кислород красный, фосфор оранжевый, азот синий, углерод фосфолипидов желтый; углерод Хол оранжевый; некоторые липиды не показаны. Ленточная модель Tk-hefu-1 окрашена розовым, показаны а.о. функциональной диады, а также E23. (Б) Крупный план Tk-hefu-1 и наложение на модель Tk-hefu-2 для сравнения. Отмечены отрицательно заряженные а.о. вестибюля канала D433 и D449. Tk-hefu-2 представлен полупрозрачной синей моделью, липиды опущены. (В–Д) Топографические карты поверхности белков, отображающие распределение электростатического потенциала в комплексах, для: (В) Tk-hefu-1, (Г) Tk-hefu-2 (Д) $K_v1.3$. Области контакта пептидов с каналом показаны на панелях В и Г полупрозрачным зеленым. Область, где комплементарность поверхности может быть улучшена за счет замены E23K в Tk-hefu-1 с получением Tk-hefu-2, обведена рамкой.

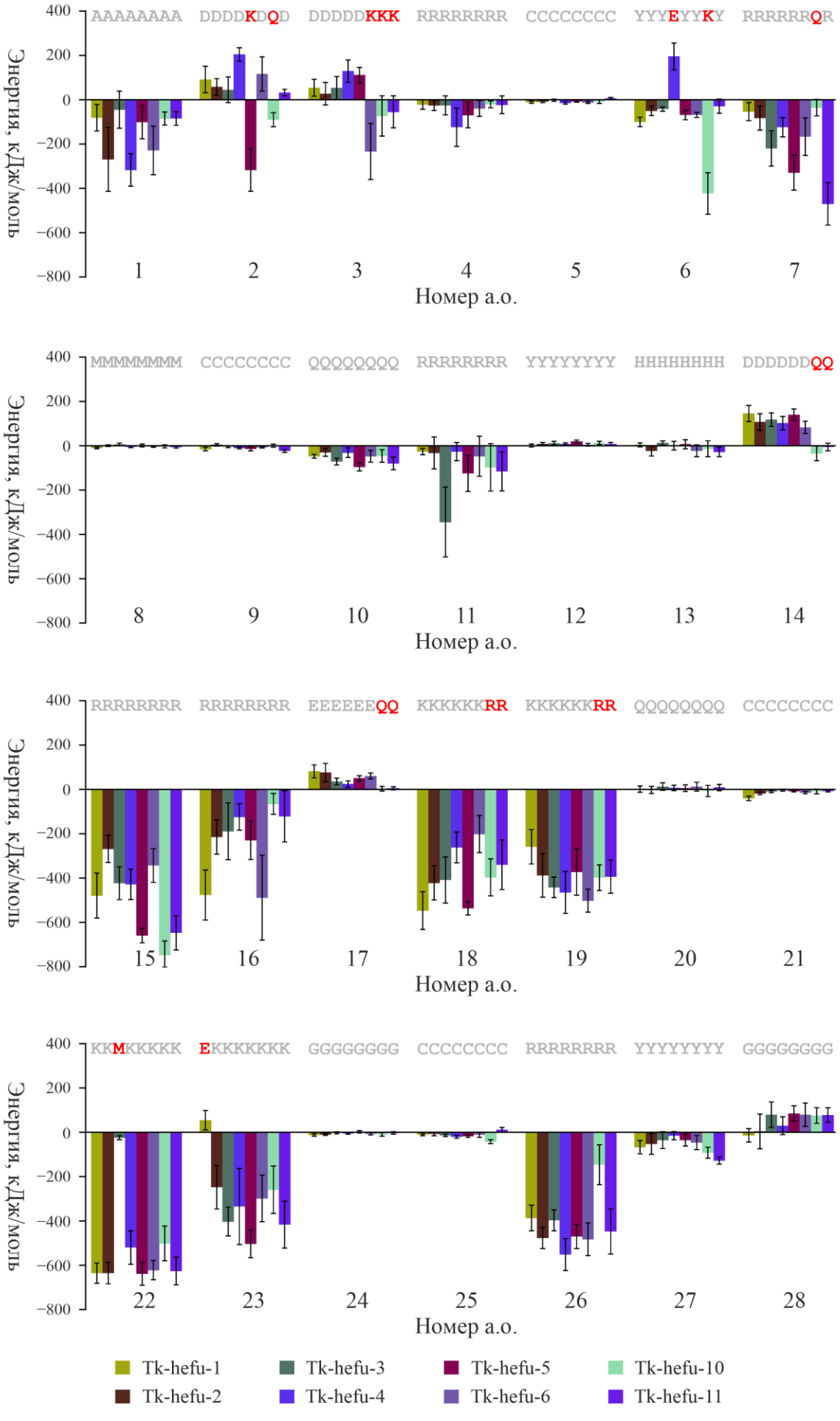


Полученные карты использовали для оценки комплементарности взаимодействующих поверхностей Tk-hefu-1 и K_v1.3 (рисунок 62В–Д). Хорошо видно, что внешний вестибюль канала заряжен отрицательно, а взаимодействующий с ним фрагмент поверхности пептида — положительно. Однако имеет место явное несоответствие: E23 лиганда попадает в область отрицательного заряда в вестибюле K_v1.3. Если же произвести «обратную» замену E23K (вернуть остаток лизина, который мы ранее заменили у Tk-AMP-X2), то несоответствие ликвидируется, и карты становятся более комплементарными (рисунок 62В–Д).

Пептид с «обратной» заменой мы назвали Tk-hefu-2; он отличается от родительского Tk-AMP-X2 только двумя а.о. (функциональной диадой). Кроме того, мы последовательно вносили в структуру Tk-hefu-1 другие замены, приведшие к пептидам Tk-hefu-3–11, которые являются модификациями Tk-hefu-2 (см. таблицу 35), после чего проводили анализ стабильности комплекса с K_v1.3 в ходе МД. Для этого мы: (1) оценивали число и качество образующихся выгодных контактов, как описано выше для КТх, а также (2) рассчитывали энергию взаимодействия пептидов с каналом — с помощью (а) программы IMPULSE, а также (б) утилиты g_mmpbsa пакета GROMACS. Сравнение двух подходов расчета энергии показало линейную корреляцию получаемых с их помощью значений. Результаты расчетов мы представляли в виде диаграммы, отображающей вклад каждого а.о. пептида в общую энергию взаимодействия с каналом (рисунок 63).

На первом этапе мы оценили влияние двух замен в N-концевой области, увеличивающих положительный заряд пептида (D2K у Tk-hefu-5 и D3K у Tk-hefu-6). Оказалось, что Tk-hefu-6 обладал увеличенной активностью по сравнению с Tk-hefu-2 (см. ниже, таблица 35), поэтому дальнейшие модификации вносили в его структуру. Попытка вдобавок к одной из двух названных замен ввести в структуру Tk-hefu-2 еще положительно заряженные а.о. (например, замену D14K) не увенчалась успехом: такие пептиды не удалось получить в *E. coli*, по-видимому, из-за мисфолдинга. Поэтому мы далее стремились: (1) увеличить число положительно заряженных а.о. пептида, взаимодействующих с каналом, или уменьшить число отрицательно заряженных а.о.; (2) убрать излишние положительно заряженные а.о. пептида, расположенные вдали от области взаимодействия с каналом; (3) повысить способность образовывать водородные связи без изменения заряда путем замены остатков лизина на аргинины.

Рисунок 63. Энергетические профили взаимодействия пептидов Tk-hefu с K_v1.3. Гистограммы представляют вклад каждого а.о. в общую энергию взаимодействия, усредненный по траекториям МД; усы показывают SD. Буквы над группами столбцов обозначают а.о. каждого из пептидов; а.о., идентичные Tk-hefu-2, показаны серым, отличающиеся — красным.


AAAAAAAA DDDDKDQD DDDDDKKK RRRRRRRR CCCCCCCC YYYEYYKY RRRRRRQR
MMMMMMMM CCCCCCCC QQQQQQQQ RRRRRRRR YYYYYYYY HHHHHHHH DDDDDDQQ
RRRRRRRR RRRRRRRR EEEEEEQQ KKKKKKRR KKKKKKRR QQQQQQQQ CCCCCCCC
KKMKKKKK EKKKKKKK GGGGGGGG CCCCCCCC RRRRRRRR YYYYYYYY GGGGGGGG
Энергия, кДж/моль
400
200
0
−200
−400
−600
−800
1 2 3 4 5 6 7
8 9 10 11 12 13 14
15 16 17 18 19 20 21
22 23 24 25 26 27 28
Номер а.о.
Tk-hefu-1
Tk-hefu-2
Tk-hefu-3
Tk-hefu-4
Tk-hefu-5
Tk-hefu-6
Tk-hefu-10
Tk-hefu-11

С помощью расчетов мы оценили эффект следующих замен: A1S, D2N, D2Q, K3R, R4Q, Y6K, R7Q, Q10K, R11Q, D14Q, E17Q, K18R, K19R K23R — поодиночке и в комбинации. Замена остатков лизина на аргинины увеличивало число образующихся водородных связей и солевых мостиков. Мутация Y6K привела к появлению водородных связей, солевых мостиков и π-катионных взаимодействий. Замены D2N и D2Q также давали водородные связи, Q10K привела к дополнительному солевому мостику и π-катионному взаимодействию. А вот R4Q, R7Q, R11Q, D14Q и E17Q существенно не влияли на число межмолекулярных контактов. Замены, по результатам моделирования давшие наибольшее число контактов, были выбраны для получения соответствующих пептидов (Tk-hefu-7–10, таблица 35).

Рекомбинантный Tk-hefu-2 мы получили в бактериальной системе экспрессии по нашей стандартной прцедуре, выход составил ≈7 мг с 1 л питательной среды. Анализ активности Tk-hefu-2 в отношении K^+ каналов показал, что по сравнению с Tk-hefu-1 существенно возросла эффективность против K_v1.3, значение IC_{50} составило 2,3 ± 0,4 мкМ. При этом пептид сохранил селективность: в концентрации 40 мкМ он блокировал токи, опосредованные K_v1.2 и 1.6, на 11,7 ± 1,9% и 17,4 ± 4,5%, соответственно, и не воздействовал на K_v1.1.

Аналогичным способом мы получили пептиды Tk-hefu-3 и 4 (см. таблицу 35), которые отличаются от Tk-hefu-2 (и родительского пептида Tk-AMP-X2) одиночными заменами а.о. функциональной диады. Тестирование их активности на K^+ каналах показало, что K22 имеет принципиальное значение: Tk-hefu-3, в структуре которого данный а.о. отсутствует, в концентрации 100 мкМ не вызывал никакого эффекта. Y6 менее важен: значение IC_{50} для Tk-hefu-4 против K_v1.3 составило 12,9 ± 1,8 мкМ.

Кроме того, мы получили пептиды Tk-hefu-5–10 (использовали штамм *E. coli* SHuffle T7 Express) с выходом ≈ 2 мг с 1 л среды. Сравнение их активности на K_v1.3 (таблица 35) показало, что, в целом, наши предположения, основанные на моделировании, оказались верны. Наибольшую эффективность проявил пептид Tk-hefu-10, значение IC_{50} составило 152,7 ± 34,2 нМ, что в 15 раз превосходит Tk-hefu-2 и >200 раз лучше Tk-hefu. Пептид Tk-hefu-10 также сохранил селективность, его эффективность в отношении других каналов ниже в 33 и более раз.

Таким образом, введение а.о. функциональной диады КТх в структуру α-гарпинина оказалось достаточным для получения селективного блокатора K_v1.3 с микромолярной аффинностью. Совместное использование белковой топографии и МД при моделировании комплексов K^+ каналов с пептидными блокаторами служит удобным подходом для увеличения активности последних. В результате получен α-гарпинин с субмикромолярной аффинностью к K_v1.3.

3.6.2.4. Tk-hefu-11 — уникальный высокоаффинный блокатор K_v1.6

В ходе получения и тестирования Tk-hefu-5–10 мы заметили, что при увеличении числа введенных замен эффективность действия пептида в отношении K_v1.3 не всегда повышается. К примеру, она падает при переходе от Tk-hefu-6 к 7 и практически не меняется при переходе от Tk-hefu-8 к 9 (таблица 35). Поэтому мы решили ввести «обратные» замены Q2D, K6Y и Q7R в структуру Tk-hefu-10. Соответствующий пептид был назван Tk-hefu-11 и получен по процедуре, описанной выше, выход составил ≈6 мг с 1 л питательной среды.

При тестировании активности Tk-hefu-11 на K_v1.3 мы действительно наблюдали увеличение эффективности: значение EC_{50} составило 70,4 ± 2,9 нМ. А вот при оценке его активности на других изоформах совершенно неожиданно оказалось, что Tk-hefu-11 проявляет высокую эффективность и селективность в отношении K_v1.6: EC_{50} = 10,0 ± 0,5 нМ. В концентрациях выше 2 мкМ наблюдался лизис ооцитов. Мы не можем дать адекватное объяснение этому явлению: на других типах клеток (бактериальных или эукариотических — мы тестировали *E. faecalis, E. coli, P. aeruginosa, S. aureus*, эритроциты и линию A549 человека) не обнаружили цитолитической активности.

Пространственную структуру пептида Tk-hefu-11 исследовали в водном растворе с помощью спектроскопии ЯМР (PDB ID: 7QXJ; рисунок 60). Для этого мы получили ^{15}N-меченый пептид по процедуре, аналогичной для Tk-AMP-X2 и Tk-hefu-1 (см. выше). Оказалось, что структура Tk-hefu-11 отличается от Tk-hefu-1. Основные различия заключаются в угле между α-спиралями и расположении остатка Y6. В то время как у Tk-hefu-1 α-спирали более скрещенные с межспиральным углом ≈ 160°, у Tk-hefu-11 они более параллельны с углом ≈ −170°. Поворот ≈30° мы объясняем π-катионным взаимодействием между Y6 и K3, обнаруженным у Tk-hefu-11. D3 у Tk-hefu-1 не может вступить в такой контакт, а Y6 меняет положение, чтобы взаимодействовать с Q10 и K18. Эти непредвиденные изменения структуры приводят к различиям во взаимодействии пептидов с каналами и должны учитываться при молекулярном моделировании.

Мы использовали полученную структуру Tk-hefu-11, а также гомологичную модель Tk-hefu-10, построенную на ее основе, для моделирования комплекса этих пептидов с K_v1.3 и 1.6 (рисунок 64). Анализ межмолекулярных контактов, образующихся в ходе МД, показывает, что замены, введенные в Tk-hefu-11, сложным образом влияют на связывание пептида с K_v. Дело в том, что в МД пептиды могут менять свое положение относительно исходного состояния. Так, Tk-hefu-11 слегка вращается вокруг оси поры K_v1.6, что приводит к множественным полярным контактам: R11 образует солевые мостики с E399 и D404, водородные связи с S405 и Y430 и π-катионный контакт с F407. Более того, переориентация Tk-hefu-11 позволяет R7 достичь боковых цепей D412 и D428 с образовыванием солевых мостиков, а

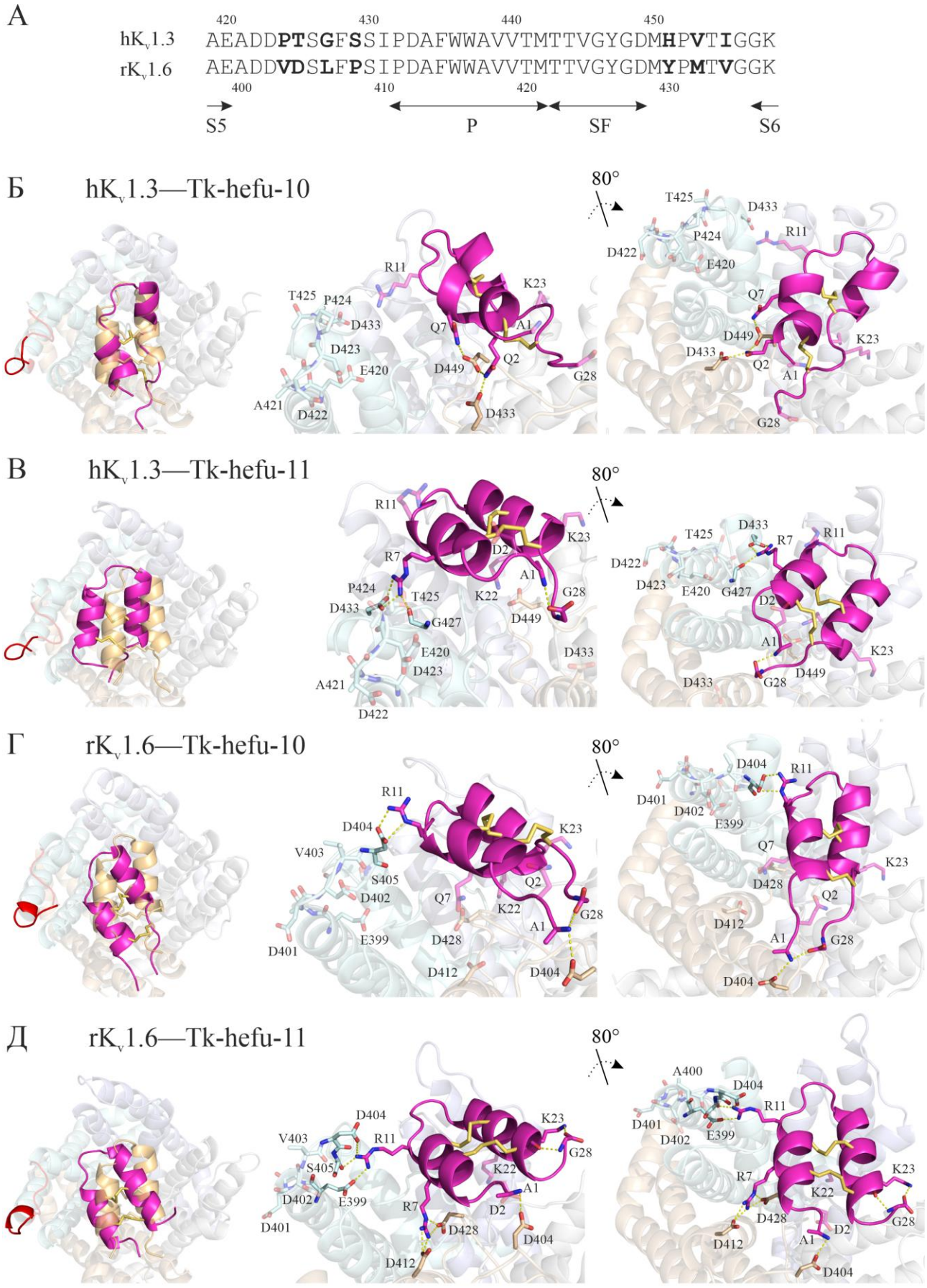
также боковых цепей W415 и Y430 соседней субъединицы канала с образовыванием π-катионных контактов, что значительно стабилизирует комплекс. Более короткая и незаряженная боковая цепь Q7 у Tk-hefu-10 не может дотянуться до этих остатков канала, поэтому положение пептида в комплексе менее стабилизировано, и R11 образует только один солевой мостик с D404.

В комплексе с K_v1.6 остаток D2 у Tk-hefu-11 отталкивается от D404, однако он же отталкивает С-концевую карбоксильную группу пептида, которая взаимодействует с K23, образуя внутримолекулярный солевой мостик, стабилизирующий вторичную структуру. У Tk-hefu-10, имеющего Q2 вместо D2, взаимодействуют N и С-концевые а.о. Это приводит к искажению вторичной структуры пептида и сближению С-концевой карбоксильной группы с D404 канала, дестабилизируя комплекс. Наш анализ показывает, что N-концевая область, R7 и R11 обеспечивают высокую стабильность комплекса Tk-hefu-11 с K_v1.3 и 1.6.

Tk-hefu-11 — один из самых высокоэффективных лигандов K_v1.6. Другие известные лиганды либо проявляют высокую эффективность, но обладают невысокой селективностью, либо наоборот, будучи селективными в отношении K_v1.6, характеризуются низкой эффективностью (1047-1049). Ближайшим конкурентом выступает конопептид Y-PI1 (1047), но он менее эффективен ($IC_{50} \approx 170$ нМ), и неизвестна его активность в отношении K_v1.1.

Результаты нескольких этапов дизайна блокаторов K_v на основе α-гарпинина, представленные здесь, опубликованы (1050-1053).

Рисунок 64. Взаимодействие Tk-hefu-10 и 11 с K_v1.3 и 1.6 по данным молекулярной динамики. (А) Сравнение аминокислотных последовательностей внеклеточной области ПД каналов hK_v1.3 (UniProt ID: P22001) и rK_v1.6 (P17659; см. таблицу 31). Нумерация а.о. указана над и под последовательностями; различающиеся а.о. выделены полужирным. Структурные элементы обозначены стрелками снизу. (Б–Д) Расположение пептидов и межмолекулярные контакты в комплексах: hK_v1.3—Tk-hefu-10 (Б), hK_v1.3—Tk-hefu-11 (В), rK_v1.6—Tk-hefu-10 (Г) и rK_v1.6—Tk-hefu-11 (Д). Общее положение пептидов (вид на комплекс с внеклеточной стороны) показано слева на каждой панели; специфичные для каналов мотивы ^{420}EADDPT^{425} / ^{399}EADDVD^{404} петли S5-P обозначены красным, Tk-hefu-10 или 11 показаны розовым; исходное положение пептидов показано песочно-желтым. Взаимодействующие а.о. пептидов и каналов представлены стержневыми моделями; а.о., не участвующие во взаимодействиях, полупрозрачные. Межмолекулярные контакты (водородные связи и солевые мостики) показаны пунктирными желтыми линиями.


А
420 430 440 450
hK$_v$1.3 AEADDPTSGFSSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMHPVTIGGK
rK$_v$1.6 AEADDVDSLFPSIPDAFWWAVVTMTTVGYGDMYPMTVGGK
400 410 420 430
S5 P SF S6
Б hK$_v$1.3—Tk-hefu-10
80°
В hK$_v$1.3—Tk-hefu-11
80°
Г rK$_v$1.6—Tk-hefu-10
80°
Д rK$_v$1.6—Tk-hefu-11
80°

3.6.3. Значение исследования искусственных лигандов K^+ каналов

Если для K_v1.2 мы отыскали селективный высокоаффинный блокатор в природном источнике (MeKTx11-1 из яда *M. eupeus*; таблицы 32 и 33), то для других чувствительных к токсинам изоформ (K_v1.1, 1.3, 1.6) пришлось прибегнуть к созданию искусственных пептидов с искомой активностью. Для K_v1.1 и 1.3 мы получили новые блокаторы путем внесения модификаций в MeKTx13-3, характеризующийся слабой селективностью (см. таблицы 32 и 33). И если в случае K_v1.3 мы использовали замены, ослабившие взаимодействие пептида с другими изоформами каналов (MeKTx13-3_AAAR; рисунок 58, таблица 33), то в случае K_v1.1, напротив, введенные замены усиливали связывание блокатора с целевой изоформой (MeKTx13-3_RMRH). Наконец, для K_v1.6 мы использовали скаффолд-инженерию.

Мы убедительно показали, что α-гарпининовая укладка применима для получения селективных блокаторов различных изоформ K_v. Интересно, что полученный нами Tk-hefu-11 превосходит не только все известные ранее искусственные α-гарпинины, но и природные токсины с тем же типом укладки (CSα/α), такие как к-хефутоксин-1 (к-КТх 1.1) (319) или HelaTx1 (к-КТх 5.1) (1054). Подход «скаффолд-инженерии» с использованием в качестве каркасов структур пептидных токсинов применялся ранее. Например, β-шпилька в СТХ была заменена на центральную петлю α-токсина из яда кобры, и полученная химера связывалась, правда со значительно худшей аффинностью, с nAChR электрического органа ската (1055). Мы же продемонстрировали возможность использования сходства укладки пептидов растений и животных токсинов для получения селективных и эффективных блокаторов ионных каналов.

В Обзоре литературы (раздел «Синтетические аналоги с новыми свойствами») помимо скаффолд-инженерии мы упомянули фаговый дисплей как еще один метод получения новых лигандов ионных каналов. А бурно развивающиеся на наших глазах технологии с использованием искусственного интеллекта и машинного обучения подсказывают еще один способ, и мы ожидаем его реализацию в ближайшее время.

3.7. Токсины паукообразных, воздействующие на Na^+ каналы

Как мы отмечали в Обзоре литературы (раздел «Токсины, воздействующие на Na^+ каналы»), Na_v служат своеобразным «фокусом» активности природных токсинов и искусственных соединений, используемых человеком. Это обусловлено ведущей ролью этих белков в возникновении и распространении потенциала действия. В настоящее время продолжается исследование как специфических функций различных изоформ Na_v человека, так и поиск селективных лигандов Na^+ каналов млекопитающих и насекомых — для создания новых лекарств и безопасных инсектицидов.

Вначале мы провели скрининг коллекции ядов пауков на Na_v (таблица 36); оказалось, что яд пауков-бокоходов *Heriaeus melloteei* (NCBI/UniProt taxon identifier: 504442) и *Misumena vatia* (оба из семейства Thomisidae) обладает мощной ингибирующей активностью в отношении различных изоформ Na_v. Яд *H. melloteei* как наиболее активный использовали далее для выделения новых полипептидных токсинов, модулирующих Na_v.

Таблица 36. Тестирование активности цельных ядов пауков на Na_v. Приведены значения относительного снижения амплитуды натриевых токов (в %), опосредованных различными изоформами каналов, при действии яда в концентрации 0,1 мг/мл.

Семейство	Вид	$Na_v1.2$	$Na_v1.5$	$Na_v1.7$
Agelenidae	*Agelena orientalis*	9	3	9
Eresidae	*Eresus* sp.	–	34	17
	Stegodyphus sp.	26	52	–
Gnaphosidae	*Drassodes* sp.	33	71	35
Philodromidae	*Tibellus oblongus*	47	53	9
Theridiidae	*Latrodectus dahli*	6	36	8
Thomisidae	*Heriaeus melloteei*	87	81	80
	Misumena vatia	69	36	100

Показаны усредненные данные трех измерений; значения SE не приведены, но составляли не более 5%. –, тестирование не проводилось.

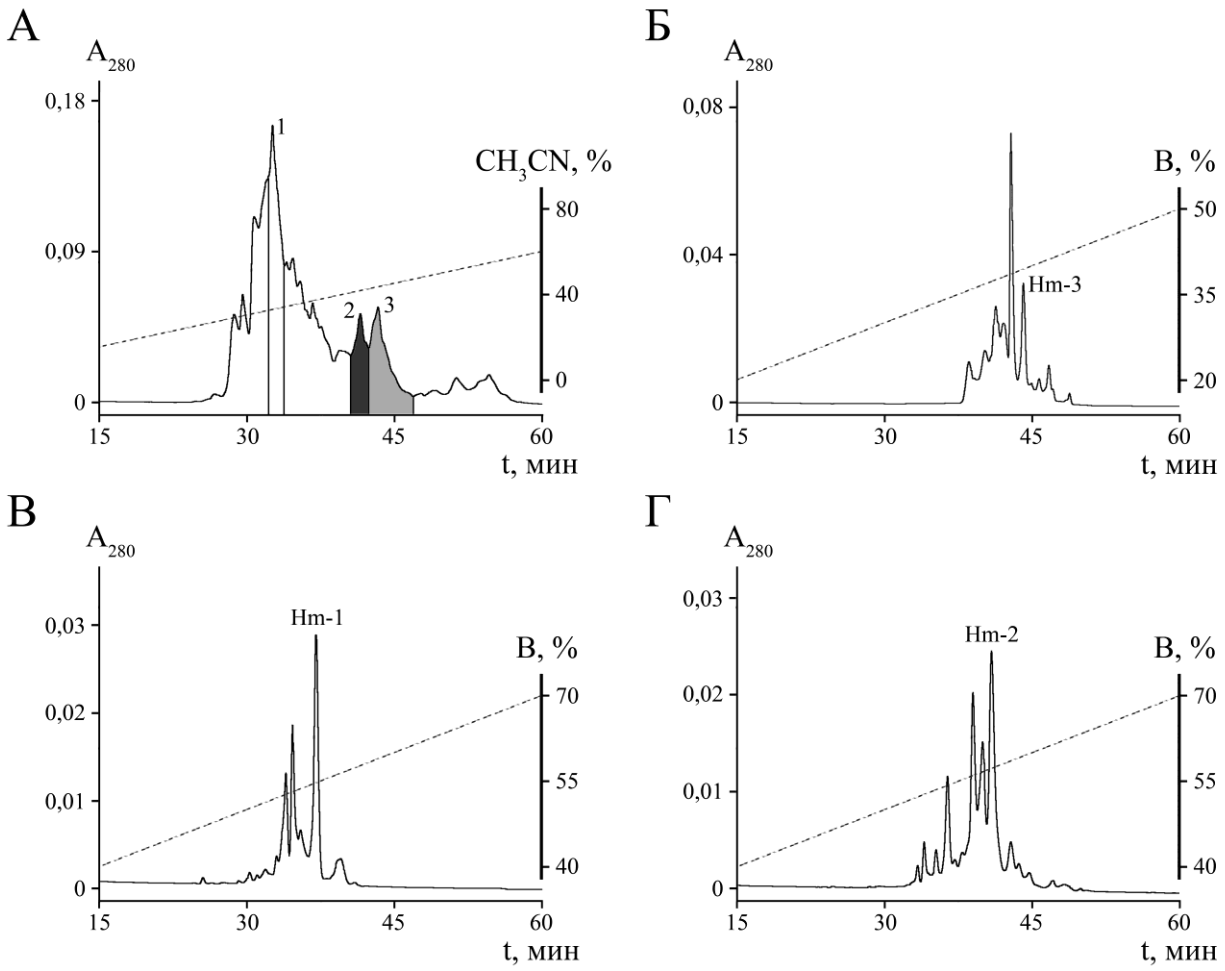
3.7.1. Токсины из яда паука Heriaeus melloteei

3.7.1.1. Выделение и первичная структура токсинов *H. melloteei*, воздействующих на Na_v

Для разделения яда *H. melloteei* мы использовали подход, отличающийся от нашего традиционного: в качестве первой стадии разделения цельного яда использовали сразу ОФ-ВЭЖХ. Разделение дало несколько широких пиков (рисунок 65А), которые объединили в 10

фракций и протестировали. Активные фракции дополнительно разделили с помощью ОФ-ВЭЖХ на другой колонке и с использованием смеси ацетонитрила и изопропанола в качестве подвижной фазы (рисунок 65Б–Г). Полученные активные субфракции содержали пептидные компоненты, которые мы назвали Hm-1, 2 и 3, а их чистоту ≥ 95% подтвердили с помощью аналитической хроматографии и МАЛДИ МС. Измеренные средние Мм новых пептидов составили 4171,9 Да (Hm-1), 4555,3 Да (Hm-2) и 3907,7 Да (Hm-3).

Рисунок 65. Фракционирование яда *H. melloteei* и очистка индивидуальных токсинов. (А) ОФ-ВЭЖХ цельного яда на колонке Jupiter C_5 (4,6×150 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Фракции обозначены цифрами. (Б–Г) ОФ-ВЭЖХ фракций 1–3 из (А) на колонке Luna C_8 (4,6×150 мм). Использовали линейный градиент растворителя (B, показан пунктиром), содержащего 50% ацетонитрила, 20% изопропилового спирта и 0,1% ТФУ. Пики, содержащие токсины Hm-1–3, обозначены.



Алкилирование невосстановленных Hm 4-винилпиридином не выявило свободных тиольных групп в нативных пептидах. Однако различия между Мм нативных и модифицированных пептидов показали, что Hm содержат по три остатка цистина. Полные аминокислотные последовательности пептидов (35–40 а.о.; UniProt IDs: P85505, P85506 и C0HJK5; табли-

ца 37) мы установили с помощью N-концевого секвенирования по Эдману. Для подтверждения полученных последовательностей восстановленные и алкилированные пептиды гидролизовали эндопротеиназой Glu-C и бромцианом. Все фрагменты отделяли с использованием ОФ-ВЭЖХ и идентифицировали МАЛДИ МС. Измеренные Мм С-концевых фрагментов Hm-1 (бромциан: 1045,2 Да; Glu-C: 3546,1 Да) отличалась от расчетных значений (1046,2 и 3547,3 Да, соответственно) на 1 Да. Мы сделали вывод, что Hm-1 имеет амидированный С-концевой а.о. Для других пептидных фрагментов измеренные Мм соответствуют расчетным значениям.

Таблица 37. Токсины из яда *H. melloteei*, ингибирующие Na_v.

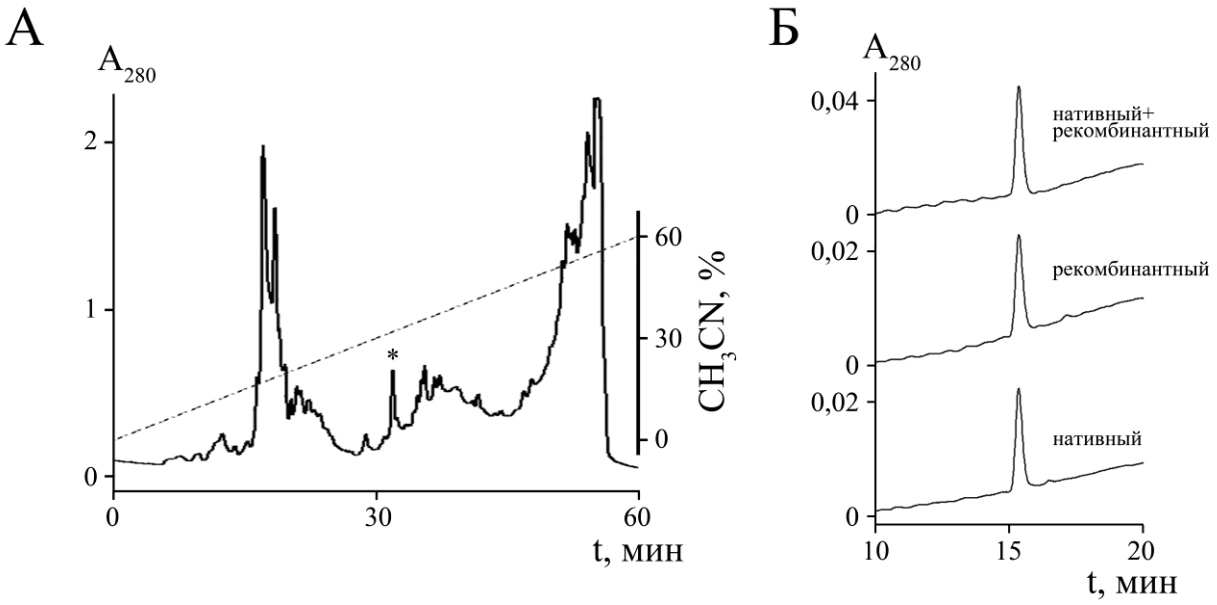
Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.	Мм, Да
		1 5 10 15 20 25 30 35 37		
Hm-1	P85505	GCIPYGKTCEFWSGPWCC-AGKCKLNVWSMTLSCTRNF-NH_2	37	4171,9
Hm-2	P85506	GCIPSFGECAWFSGESCC-TGICKWVFFTSKFMCRRVWGKD	40	4555,3
Hm-3	C0HJK5	GCIAKNKECAWFSGEWCCGALSCKYSIKRNLKICV	35	3907,6

Данные как в таблице 32. В последовательность пептидов внесены разрывы для удобства сравнения. А.о. раскрашены в соответсвии со свойствами (как в таблице 8).

3.7.1.2. Получение рекомбинантного Hm-3

Мы получили рекомбинантный Hm-3 в бактериальной системе экспрессии по нашей стандартной прцедуре [использовали штамм *E. coli* Origami B(DE3)], выход составил ≈0,7 мг с 1 л питательной среды. Поскольку Hm-3 не содержит остатков метионина, его отделение от белка-помощника мы проводили путем селективного расщепления химеры бромцианом по такому а.о., специально введенному непосредственно перед последовательностью токсина. Целевой пептид очищали путем разделения гидролизата Trx-Hm-3 с помощью ОФ-ВЭЖХ (рисунок 66А). Средняя Мм полученного рекомбинантного Hm-3, измеренная с помощью МАЛДИ МС, составила 3907,8 Да и была равна Мм нативного токсина (см. выше) с точностью до ошибки измерений. Для доказательства эквивалентности рекомбинантного и нативного Hm-3 мы провели их совместное разделение в условиях аналитической ОФ-ВЭЖХ и показали, что они имеют одинаковое время удерживания (рисунок 66Б).

Рисунок 66. Получение рекомбинантного Hm-3. (А) ОФ-ВЭЖХ гидролизата гибридного белка Trx-Hm-3, расщепленного бромцианом, на колонке Jupiter C_5 (10×250 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Звездочкой отмечен пик, соответствующий искомому Hm-3. (Б) Сравнение времени удерживания нативного токсина (0,5 нмоль; нижний график), рекомбинантного Hm-3 (0,5 нмоль; средний график) и смеси нативного и рекомбинантного пептидов (1 : 1, 0,5 нмоль каждого; верхний график) в условиях ОФ-ВЭЖХ на колонке Vydac C_{18} (4,6×250 мм), элюцию проводили линейным градиентом концентрации ацетонитрила (25–50% за 50 мин) в 0,1% ТФУ при скорости потока 1 мл/мин.

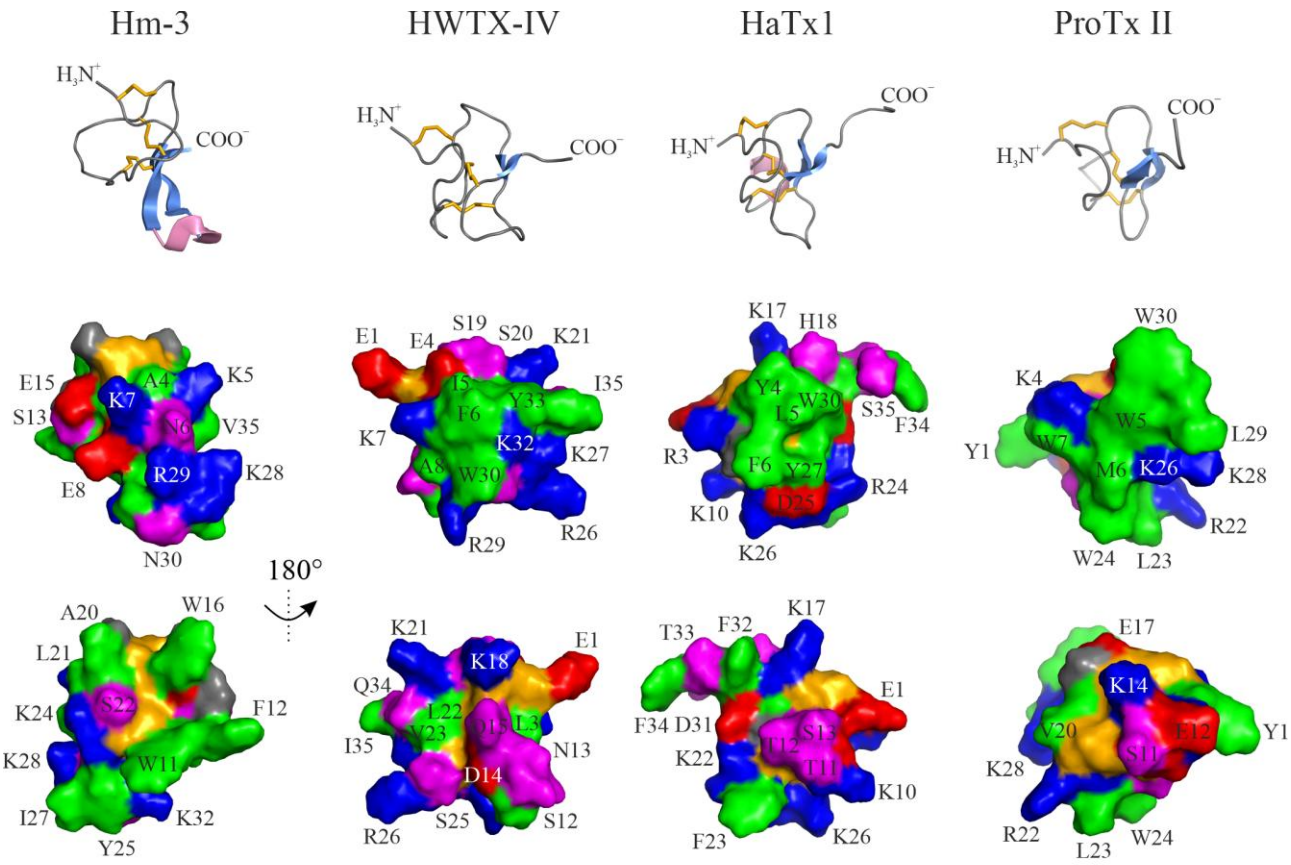


3.7.1.3. Пространственная структура Hm-3

Мы изучили пространственную структуру Hm-3 в водном растворе методами спектроскопии ЯМР (PDB ID: 2MQU; рисунок 67); эксперименты выполнены в лаборатории структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН. Структура токсина представлена мотивом цистинового узла и включает β-шпильку, образованную двумя тяжами (C23–S26 и L31–C34), которые соединены изгибом в конформации 3_{10}-спирали (I27–R29). β-Шпилька выступает из «миниглобулярного ядра», стабилизированного тремя дисульфидными мостиками (C2–C18, C9–C23 и C17–C34). Другие возможные схемы расположения дисульфидных связей проверяли в ходе расчетов пространственной структуры, они не соответствовали экспериментальным данным ЯМР. В дополнение к S-S-мостикам структура пептида стабилизируется 11 водородными связями между атомами основной цепи.

Анализ свойств поверхности Hm-3 показывает амфифильную природу пептида. Два ярко выраженных соседствующих гидрофобных кластера на поверхности токсина образованы а.о., принадлежащими петле 10–16 и центральной части β-шпильки. Эти кластеры, состоящие из W11, F12, W16, Y25, I27 и L31, окружены кольцом заряженных групп: E8 и E15, а также N-концом, K24, K28, R29 и K32. Положительные и отрицательные заряды распределены почти равномерно на гидрофильной стороне поверхности Hm-3 (суммарный заряд +4).

Рисунок 67. Пространственная структура Hm-3 и сравнение ее с другими ингибиторами активации ионных каналов из яда пауков. Изображение аналогично рисунку 10. Показаны структуры Hm-3 (PDB ID: 2MQU), HWTX-IV (2M4X), HaTx1 (1D1H) и ProTx II (2N9T). В верхнем ряду ленточные представления, в среднем и нижнем ряду — молекулярные поверхности пептидов, раскрашенные в соответствии со свойствами а.о. как в таблице 8.



3.7.1.4. Взаимодействие Hm-3 с липидными везикулами

Амфифильные свойства Hm-3 указывают на способность пептида взаимодействовать с липидными мембранами. Для исследования мембранной активности Hm-3 в условиях, близких к физиологическим (150 мМ NaCl), а также при низком содержании соли использовали малые липосомы (SUV), состоящие из цвиттерионных (ПОФХ) или смеси цвиттерионных и анионных липидов (ПОФХ / ДОФГ, 3 : 1). Титрование образца Hm-3 липосомами приводило к постепенному снижению интенсивности сигнала ЯМР пептида, что можно объяснить взаимодействием пептидных молекул с поверхностью везикулы. В этом случае из-за очень медленной переориентации липосом в растворе молекулы связанного пептида становятся ненаблюдаемыми с помощью спектроскопии ЯМР высокого разрешения, и интенсивность сигнала ЯМР прямо пропорциональна концентрации свободного пептида в растворе. Использование изотермы Ленгмюра обеспечило надежную аппроксимацию экспериментальных данных и позволило определить параметры связывания пептида с липосомами (таблица 38). Независимо от липидного состава липосом и концентрации соли сайт связывания

пептида на поверхности везикулы формируется из ≈10 молекул липида. Отсутствие выраженной зависимости в эффективности связывания Hm-3 с везикулами при изменении заряда головок липидов и концентрации соли указывает на то, что гидрофобные контакты играют главную роль во взаимодействии пептида с мембранами.

Таблица 38. Параметры взаимодействия Hm-3 с липидными везикулами.

Состав везикул, условия	K_p[а] ($\times 10^3$, M^{-1})	Параметры изотермы Ленгмюра[б]	
		K_l ($\times 10^6$, M^{-1})	N
ПОФХ / ДОФГ (3 : 1)	12,5 ± 3,0	1,09 ± 0,57	9,7 ± 0,8
ПОФХ / ДОФГ (3 : 1), 150 мМ NaCl	8,6 ± 1,3	0,29 ± 0,09	10,6 ± 0,8
ПОФХ, 150 мМ NaCl	9,5 ± 1,4	0,27 ± 0,05	9,4 ± 0,7

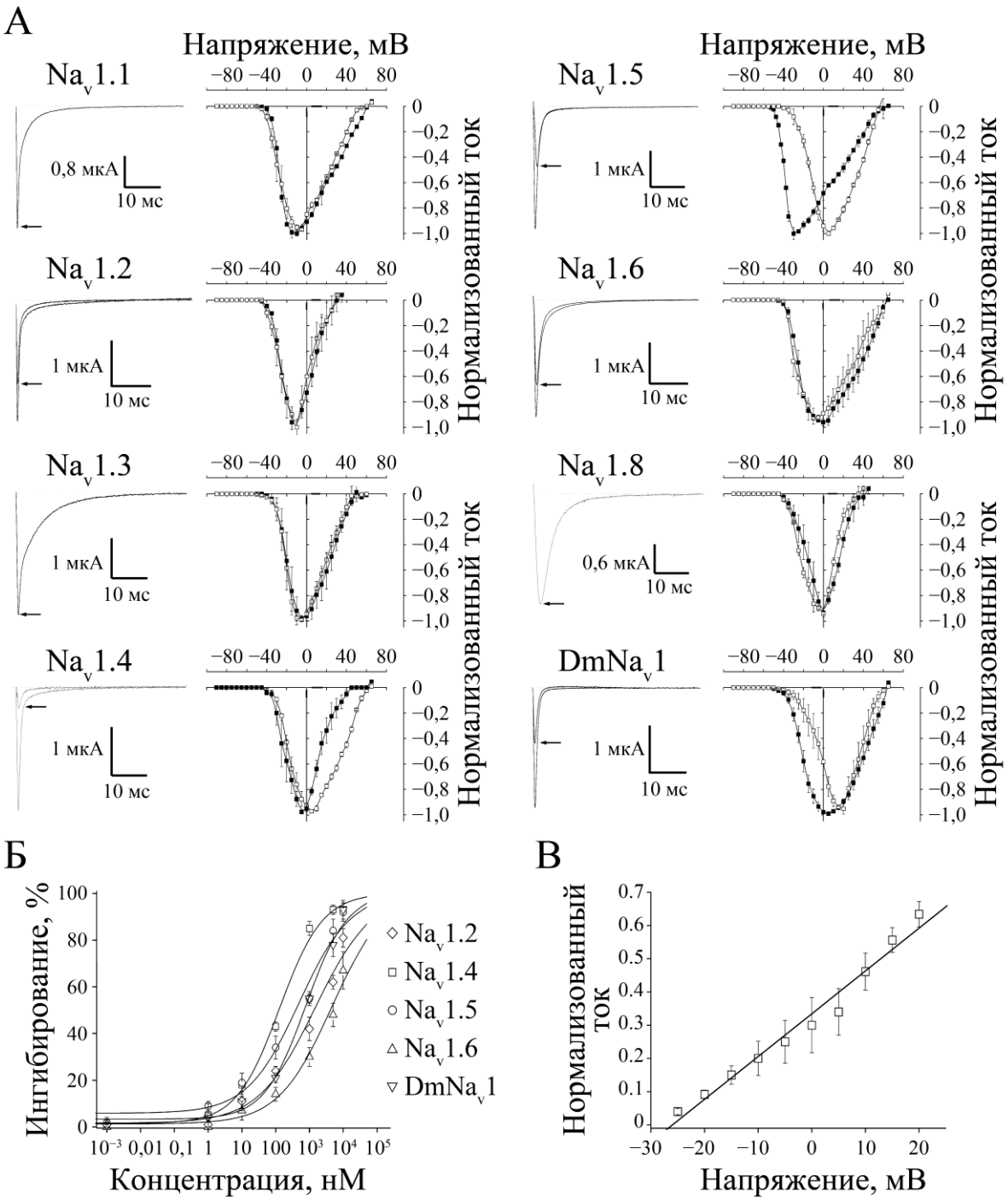
[а]См. уравнение 1, [б]уравнение 3.

3.7.1.5. Активность токсинов *H. melloteei* на Na_v

Используя технику двухэлектродной фиксации потенциала, мы оценили влияние Hm-1, 2 и 3 на изоформы Na_v, экспрессируемые в ооцитах *X. laevis*. В концентрации 0,1–1 мкМ все три токсина значительно снижали пиковый ток, опосредованный большинством испытанных каналов, исключением служила изоформа $Na_v1.8$, на которой эффекта не наблюдали. При этом, если действие Hm-1 в отношении затрагиваемых изоформ было неселективным, то Hm-2 проявлял бóльшую активность против $Na_v1.2$ и 1.4, а Hm-3 — против $Na_v1.4$ и 1.5 (рисунок 68).

Поскольку эффекты Hm оказались наиболее выраженными на $Na_v1.4$, мы решили их изучить более подробно. Мы построили кривые «доза–ответ» (см. рисунок 68Б для Hm-3) и рассчитали значения IC_{50}: 336 ± 40 нМ (h = 1,0 ± 0,1), 155 ± 11 нМ (h = 1,2 ± 0,1) и 103 ± 15 нМ (h = 0,7 ± 0,1) для Hm-1, 2 и 3, соответственно. Вольт-амперные характеристики $Na_v1.4$ в контроле и при приложении токсинов показывают, что потенциал реверсии не меняется, т.е. Hm не изменяют ионную селективность каналов. Токсины Hm-1 и 2 не сдвигают пороговый потенциал активации или напряжение, соответствующее максимальному току. Кривые стационарной инактивации показывают, что Hm-1 и 2 вызывают небольшой сдвиг V_h в сторону более отрицательных потенциалов. Кривые зависимости активации от потенциала не меняются при приложении Hm-1 и 2. Таким образом, по характеру воздействия на Na_v эти токсины более всего напоминают классические поровые блокаторы TTX и STX (1056). Альтернативной гипотезой служит стабилизация инактивированного (функционально закрытого) состояния, на что указывает сдвиг кривой стационарной инактивации под действием Hm-1 и 2.

Рисунок 68. Активность Hm-3 в отношении различных Na_v. (А) На левых панелях показаны репрезентативные записи токов через каналы в контроле и после приложения токсина (1 мкМ; отмечены стрелками). На правых панелях приведены нормализованные вольт-амперные характеристики Na_v в контрольных измерениях (■) и после приложения 1 мкМ Hm-3 (□). (Б) Кривые «доза–ответ». (В) Зависимость активности Hm-3 от мембранного потенциала. Пиковый ток, опосредованный $DmNa_v1$, после приложения 1 мкМ токсина был нормализован относительно контроля и аппроксимирован линейной зависимотью. Данные показаны как средние значения ± SE ($n \geq 5$).



Hm-3, несмотря на сходство с Hm-2 (46% идентичных а.о.), по-видимому, характеризуется иным механизмом действия. На рисунке 68А заметен отчетливый сдвиг вольт-амперной характеристики каналов под действием этого токсина (ср.: рисунок 13Г). Этот эффект мы наблюдали для каналов $Na_v1.4$, 1.5 и $DmNa_v1$, он был менее выражен для изоформ $Na_v1.2$ и 1.6, но проявлялся при увеличении концентрации токсина. Более того, степень ингибирования Na_v, вызванного Hm-3, зависела от мембранного потенциала (рисунок 68В).

Чтобы оценить селективность Hm-3 к Na^+ каналам, мы исследовали его активность в отношении K_v и Ca_v. Никакой активности не наблюдали на целой панели каналов: $K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v2.1$, $K_v4.2$, $K_v10.1$ или $Ca_v3.3$ — при 1 мкМ Hm-3.

3.7.1.6. Механизм действия Hm-3 на Na_v

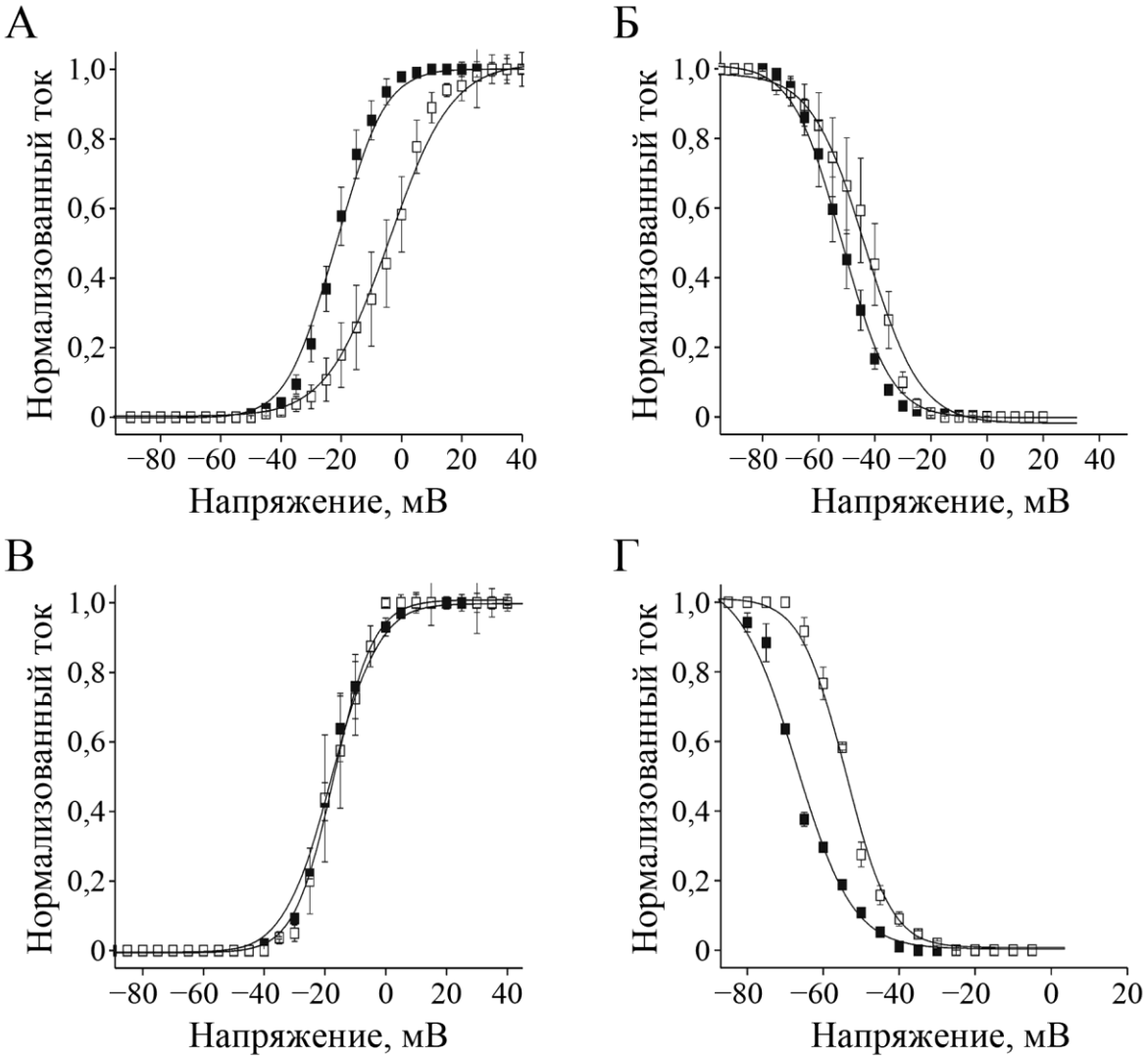
Мы детально исследовали характер влияния Hm-3 на работу каналов $Na_v1.4$ и $DmNa_v1$. В случае $DmNa_v1$ наблюдали значительный сдвиг кривой активации (рисунок 69А): $V_{1/2,Na}$ смещался с −21,7 ± 0,1 мВ в контроле до −4,1 ± 0,4 мВ после приложения 1 мкМ токсина. Для $Na_v1.4$, напротив, значительного сдвига не наблюдали (рисунок 69В). А для кривых стационарной инактивации наблюдали обратную ситуацию (рисунок 69Б, Г). У $DmNa_v1$ изменения незначительны, в то время как в случае $Na_v1.4$ виден отчетливый сдвиг значения V_h с −56,0 ± 0,3 мВ в контроле до −62,1 ± 0,7 мВ после приложения 1 мкМ токсина.

Интересно, что у разных каналов, чувствительных к действию Hm-3, по-разному изменяются вольт-амперные характеристики при приложении токсина. Вполне вероятно, что это связано с различиями скоростей диссоциации комплекса Hm-3 с каналом. Мы применили такой протокол: за сильным деполяризующим предварительным импульсом до +100 мВ увеличивающейся длительности следовал короткий интервал при потенциале удерживания (−100 мВ, 20 мс), после чего подавали тестовый импульс (0 мВ). Оказалось, что предварительный импульс снижает эффективность действия Hm-3 (рисунок 70А): амплитуда тока возрастает до 68% ($Na_v1.4$) и 90% ($DmNa_v1$) от контрольных значений при длительности импульса 635 мс (n = 5). Для количественной оценки различий мы применили вышеуказанный протокол с предварительными импульсами в диапазоне от +40 до +100 мВ. Для обоих каналов ослабление действия Hm-3 было самым быстрым при +100 мВ и самым медленным при +40 мВ, однако скорость ослабления была выше для $DmNa_v1$ (рисунок 70Б, В); при +100 мВ время, необходимое для восстановления 60% тока, $t_{100\ мВ}$ = 227 мс для $Na_v1.4$ и $t_{100\ мВ}$ = 114 мс для $DmNa_v1$; при +40 мВ: $t_{40\ мВ}$ = 910 мс для $Na_v1.4$ и $t_{40\ мВ}$ = 370 мс для $DmNa_v1$ (см. подробности в протоколе 5, раздел «Метод двухэлектродной фиксации потенциала» Методов).

Мы также построили кривые изохронной активации каналов, связанных с токсином, нанося на график нормированную пиковую проводимость при тестовом импульсе после

предварительного импульса длительностью 700 мс в зависимости от потенциала предварительного импульса. При действии Hm-3 наблюдали сдвиг кривых в сторону более положительных потенциалов. Более заметный сдвиг отмечен для канала $Na_v1.4$: значение $V_{1/2,Na}$ возросло на 30 мВ по сравнению с умеренным сдвигом на 10 мВ для каналов $DmNa_v1$ (рисунок 70Г, Д).

Рисунок 69. Влияние Hm-3 на свойства токов, опосредованных каналами $Na_v1.4$ и $DmNa_v1$. Показаны кривые активации и стационарной инактивации для $DmNa_v1$ (А и Б) и $Na_v1.4$ (В и Г) в контроле (■) и после приложения 1 мкМ Hm-3 (□). Данные представлены как средние значения ± SE ($n \geq 5$).



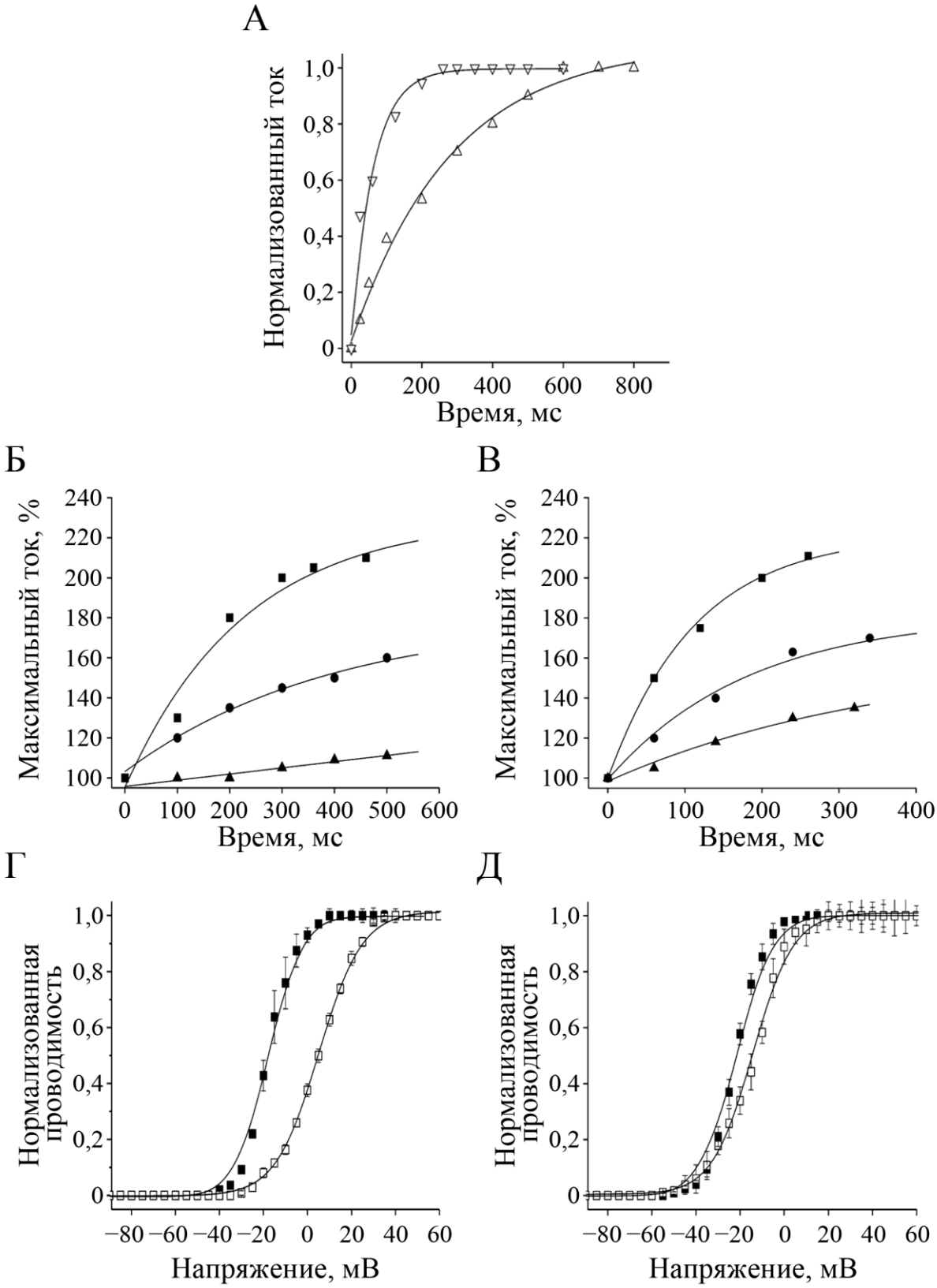
Целый ряд наблюдений позволяет отнести Hm-3 к модуляторам воротных механизмов Na_v (gating modifiers; см. подробно о таких токсинах в Обзоре литературы, раздел «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков»). (а) Эффективность ингибирования токсином натриевого тока зависит от потенциала (рисунок 68В). Во многих исследованиях было показано, что это свойство можно рассматривать как отличительный признак модификаторов воротных меха-

низмов (367, 509, 1057). (б) Предварительные деполяризующие импульсы обеспечивают ослабление действия Hm-3 (рисунок 70А), что так же характерного для подобных токсинов (508, 509). (в) Наконец, ослабление действия Hm-3 зависит от потенциала предварительного импульса (рисунок 70Б–Д), это ранее было описано для модификаторов воротных механизмов Na_v из яда пауков, например ProTx I и II (509) и HWTX-IV (507). Мы пришли к выводу, что Hm-3 представляет собой первый описанный модификатор воротных механизмов-ингибитор Na_v из яда аранеоморфных пауков: действительно, все другие известные до нашей работы токсины пауков с похожим механизмом действия (например, показанные на рисунках 10 и 67) были выделены из яда мигаломорфных пауков.

Наблюдаемые различия в сродстве к каналам, характеризуемые различиями в скорости диссоциации Hm-3 из комплекса с $Na_v1.4$ и $DmNa_v1$ (рисунок 70А–В), предоставляют возможное объяснение разницы изменений вольт-амперных характеристик этих Na_v в ответ на приложение токсина (рисунок 68А). Согласно модели захвата сенсора потенциала (voltage sensor trapping; см. подробное описание в Обзоре литературы, раздел «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков») (508, 509), ингибиторы активации каналов, такие как Hm-3, связываются с сенсором напряжения в его «нижнем» положении и могут быть «сброшены» движением сенсора наружу клетки при деполяризации. Мы обнаружили, что предварительные деполяризующие импульсы обеспечивают необходимую энергию для принудительного перемещения сенсора наружу в активированное положение и, таким образом, предоставляют необходимую энергию для «сбрасывания» Hm-3 с его рецепторного сайта. Однако энергия, необходимая для диссоциации Hm-3 из комплекса с $Na_v1.4$, больше, чем для $DmNa_v1$. Мы заключаем, что оба канала, связанные с Hm-3, могут быть активированы, но активация сильно задерживается, и ее зависимость от потенциала смещается в область более положительных значений из-за необходимости диссоциации Hm-3.

Рисунок 70. Зависимость активности Hm-3 в отношении Na_v от мембранного потенциала. (А) Кинетика увеличения амплитуды тока в результате подачи предварительного импульса при +100 мВ. Нормализованный ток, опосредованный $Na_v1.4$ (△) или $DmNa_v1$ (▽), представлен как функция длительности предварительного импульса. (Б, В) Увеличение амплитуды тока при различных потенциалах предварительного импульса. Приведены данные для +100 мВ (■), +80 мВ (●) и +40 мВ (▲) для $Na_v1.4$ (Б) и $DmNa_v1$ (В). (Г, Д) Зависимость активации модифицированных токсинами каналов от напряжения. Показаны данные для $Na_v1.4$ (Г) и $DmNa_v1$ (Д). Амплитуда токов, измеренных в ответ на тестовый импульс после предварительного импульса длительностью 700 мс различного потенциала, была нормализована по отношению к контрольному значению, достигнутому при +100 мВ. Нормализованные значения проводимости (□) изображены как функция потенциала предварительного импульса и анализированы с помощью уравнения Больцмана (уравнение 21). Контрольные кривые активации (■) приведены для сравнения. Данные показаны как средние ± SE ($n \geq 5$).

Различия в активности Hm-3 в отношении активации и стационарной инактивации $Na_v1.4$ и $DmNa_v1$ (рисунок 69) могут быть интерпретированы следующим образом. Hm-3 практически не диссоциирует из комплекса с $Na_v1.4$ при деполяризации, для этого требуется предварительный импульс. Каналы, связанные с Hm-3, не активируются, и это приводит к



сильному снижению g_{Na}. Кривая активации при этом получена в основном для не связанных с токсином каналов, показывающим контрольные характеристики (рисунок 69В). Кроме того, связанный Hm-3 препятствует стационарной инактивации $Na_v1.4$ (рисунок 69Г). Напротив, Hm-3 легче «сбрасывается» при деполяризации из комплекса с $DmNa_v1$. Кривая активации в этом случае представляет собой суперпозицию значений для связанных и не связанных с токсином каналов (рисунок 69А). Аналогичным образом стационарная инактивация меньше подвержена влиянию легко диссоциирующего токсина (рисунок 69Б).

3.7.2. Токсин Hm-3 — основа для создания лекарства от периодического паралича

Гипокалиемический периодический паралич (гипоПП) — редкое (орфанное) заболевание, характеризующееся эпизодами мышечной слабости или паралича, связанных со снижением уровня калия в крови (1058). Приступы часто начинаются в подростковом возрасте, их тяжесть варьирует (может развиваться тяжелый паралич всего тела), а продолжительность может достигать многих часов и даже нескольких дней. У пациентов с гипоПП зачастую развивается постоянная мышечная слабость, и им требуется помощь в передвижении в старшем возрасте (1059). Пациентам рекомендуется избегать известных причин приступов. Ацетазоламид и другие ингибиторы карбоангидразы помогают предотвратить приступы периодического паралича; тем не менее, для некоторых пациентов эти препараты неэффективны или даже ухудшают симптомы (1060).

Потенциал покоя мембран мышечных волокон у пациентов с гипоПП деполяризован по сравнению со здоровыми людьми, что приводит к инактивации Na_v, утрате способности к возбудимости и параличу мышц (1061). С гипоПП ассоциированы мутации в генах ионных каналов, экспрессируемых в скелетной мускулатуре: $Ca_v1.1$ (*CACNA1S*; гипоПП первого типа), обеспечивающего связь между возбуждением и сокращением, и $Na_v1.4$ (*SCN4A*; гипоПП второго типа), ответственного за возбудимость (1062, 1063). Интересно, что молекулярный патомеханизм гипоПП одинаков для этих каналов, несмотря на их различную физиологическую роль и селективность. Мутации, обнаруженные у пациентов с гипоПП, затрагивают остатки аргинина в сегментах S4 (сенсорах потенциала) ПЧД указанных каналов. Как отмечалось выше (Обзор литературы, раздел «Изучение Na^+ каналов»), при деполяризации эти сегменты перемещаются ко внеклеточной стороне мембраны (в «верхнее» положение), а реполяризация притягивает их ко внутриклеточной стороне (в «нижнее» положение). Верхнее и нижнее положение сенсоров и соответствующие конформации ПЧД стабилизируют открытое и закрытое состояния поры каналов, соответственно. Сегменты S4 движутся внутри структуры, называемой «воротной порой» (“gating pore”), которая сформирована ПЧД, при этом консервативные положительно заряженные а.о. (воротные заряды) перемещаются отно-

сительно центра переноса заряда (1064, 1065). Когда эти а.о. заменяются другими в результате мутаций, ионы могут просачиваться через воротную пору (1066, 1067). Возникающие при этом токи в литературе получили название ω-токов или «токов через воротную пору» (“gating pore currents”, I_{GP}), которые протекают через мутантные каналы в дополнение к току через основную пору или α-току (I_{Na}). ω-Токи служат причиной аномальной деполяризации мышц при гипоПП (1061), а соответствующие мутантные каналы являются молекулярной мишенью при этом заболевании. ω-Токи зависят от потенциала: например, мутация одного из двух самых внешних аргининов (R1 или R2) ПЧД II приводит к появлению тока в нижнем положении сенсора потенциала (1068-1070). Напротив, мутация третьего аргинина (R3) ПЧД II приводит к токам, когда сенсор потенциала находится в верхнем положении (1071).

Связанные с гипоПП ω-токи были описаны у каналов с заменами различных воротных зарядов в различных ПЧД. В качестве примера рассмотрим свойства мутантного канала $Na_v1.4$ с заменой R222W (ClinVar accession: VCV000143199.25), соответствующий вариант гена которого был обнаружен у пациентов с гипоПП нашими коллегами из Института неврологии Университетского колледжа Лондона (Великобритания) (1062) и который был изучен в совместной с нами работе (1072).

3.7.2.1. Свойства ω-токов, опосредуемых мутантными каналами $Na_v1.4$

Вначале мы изучили свойства α-токов через каналы $Na_v1.4$ с заменой R222W в условиях экспрессии в клетках HEK293. Плотность тока при экспрессии мутантных каналов была снижена по сравнению с каналами дикого типа. Многие мутанты, характерные для гипоПП, демонстрируют аналогичную потерю функции α-токов (1073, 1074). Это может приводить к снижению возбудимости мышц и играть роль в клиническом фенотипе, но не может объяснить деполяризацию, наблюдаемую в мышечных волокнах у пациентов с гипоПП. Потенциалы полумаксимальной активации ($V_{1/2,Na}$) и быстрой или медленной инактивации (V_h) не изменились. При этом постоянная времени быстрой инактивации (τ_h) была увеличена у мутантных каналов. Сниженная скорость инактивации Na_v — приобретение функции, ассоциированное с парамиотонией и гиперкалиемическим периодическим параличом, но не с гипоПП. Считается, что замедленная кинетика инактивации Na_v не способствует появлению симптомов гипоПП, который часто определяют как паралич без миотонии. Других различий биофизических параметров мутантных и нормальных каналов мы не обнаружили.

Затем мы изучили ω-токи, опосредуемые мутантными каналами $Na_v1.4$ с заменой R222W, в условиях экспрессии каналов в ооцитах *X. laevis*. Для работы со сравнительно малыми по амплитуде ω-токами мы блокировали α-токи с помощью ТТХ. Мы обнаружили токи, активируемые гиперполяризацией, величина которых при −80 мВ составила −49 ± 11 нА

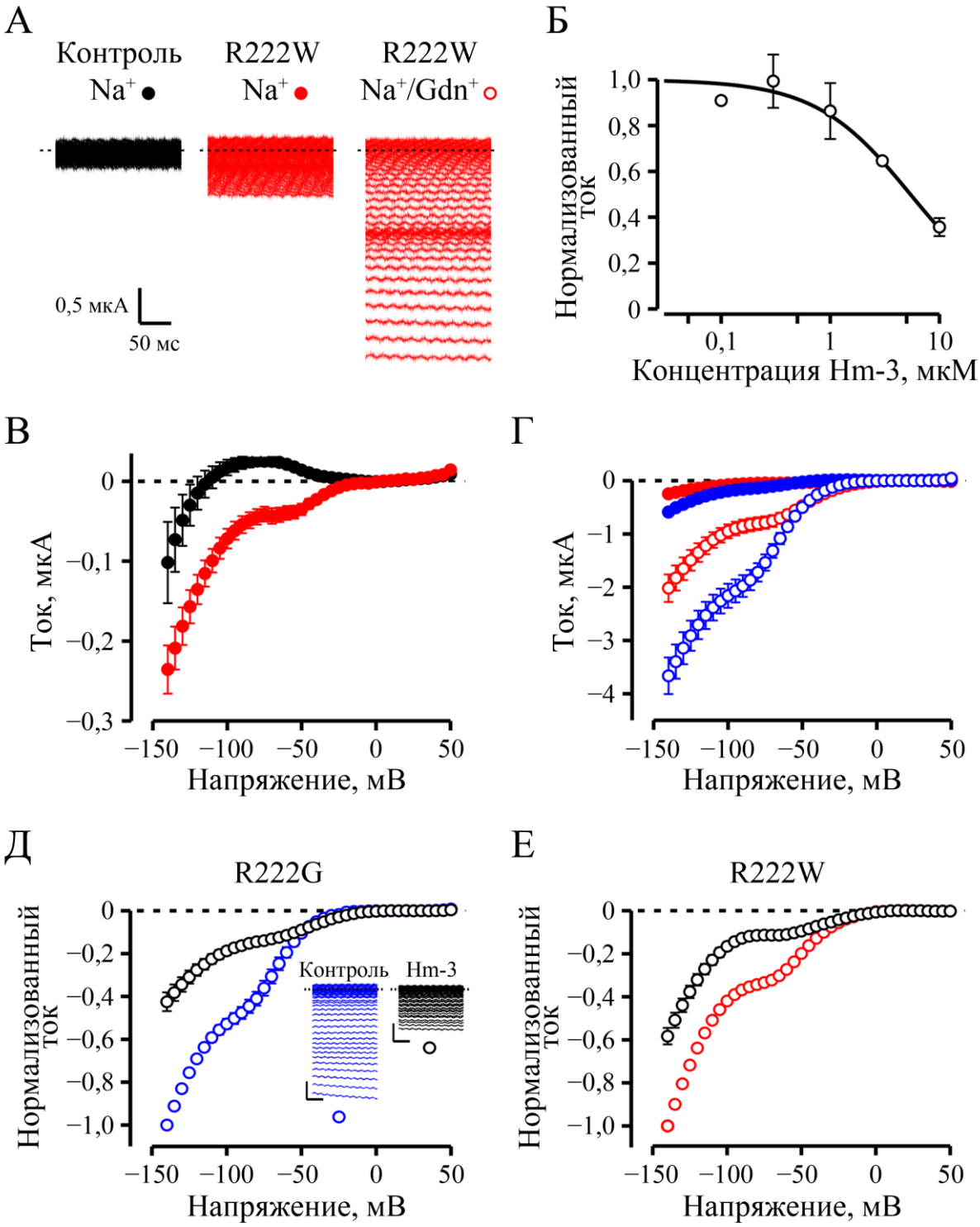
(n = 21); для каналов дикого типа в тех же условиях зарегистрировали ток величиной 25 ± 6 нА (n = 20; рисунок 71А, В). Замечено, что гуанидин увеличивает амплитуду I_{GP} через каналы с заменой остатков аргинина в S4 (1067, 1075) и его можно использовать для подтверждения наличия ω-токов, вызванных такими мутациями. Когда половину внеклеточного натрия заменили гуанидином, величина тока при −80 мВ составила −0,8 ± 0,1 мкА в клетках, экспрессирующих мутантные каналы, тогда как ток в клетках, экспрессирующих каналы дикого типа, был незначительным (0 ± 15 нА; рисунок 71Г). Для контрольных ооцитов, в которые не вводили РНК, величина тока составляла 28 ± 12 нА и 10 ± 3 нА в отсутствие и в присутствии гуанидина соответственно (n = 4). Эти данные указывают на то, что каналы с заменой R222W проводят активированный гиперполяризацией ω-ток — аналогично каналам с мутацией R222G (VCV001723232.1), обнаруженной у другого пациента (1076). Амплитуда тока через каналы с заменой R222G при −80 мВ составила −138 ± 28 нА в отсутствие и −1,7 ± 0,2 мкА в присутствии гуанидина (n = 42; рисунок 71Г).

3.7.2.2. Hm-3 ингибирует ω-токи

Токсины-модификаторы воротных механизмов, как было отмечено ранее (Обзор литературы, раздел «Ингибиторы активации K_v из яда пауков», несколько частей раздела «Токсины, воздействующие на Na^+ каналы»), связываются с ПЧД и препятствуют конформационным переходам, удерживая сенсор потенциала в определенном положении. Мы решили проверить, могут ли такие токсины ингибировать ω-токи. В качестве объекта мы выбрали детально изученный нами токсин Hm-3 из яда *H. melloteei*. Действительно, оказалось, что Hm-3 способен ингибировать ω-токи через каналы $Na_v1.4$ с заменами R222W и R222G (рисунок 71Б, Д, Е). При −80 мВ в концентрации 10 мкМ Hm-3 подавлял ω-токи через каналы с заменой R222W на 67 ± 5% (n = 4), а и через каналы с заменой R222G — на 64 ± 4% (n = 10).

Рисунок 71. Hm-3 ингибирует ω-токи через мутантные каналы $Na_v1.4$ с заменами R222W и R222G. (А) Репрезентативные записи токов через каналы дикого типа или с заменой R222W в отсутствие и присутствии гуанидина (Gdn^+). (Б) Кривая «доза–ответ» ингибирования ω-токов через мутантные каналы с заменой R222G токсином Hm-3 при −80 мВ (n = 3–10). (В) ω-Токи через каналы дикого типа (черные кривые, n = 20) и с заменой R222W (красные кривые, n = 21) в отсутствие гуанидина. (Г) ω-Токи через каналы с заменами R222W (красные кривые, n = 21) и R222G (синие кривые, n = 42) в отсутствие (закрашенные символы) и в присутствии гуанидина (пустые символы). (Д) Вольт-амперные характеристики ω-токов через мутантные каналы с заменой R222G в отсутствие (синие кривые) или в присутствии 10 мкМ Hm-3 (черные кривые; n = 10). Во вставках представлены записи токов. Данные были нормализованы к амплитуде тока при потенциале −140 мВ в отсутствие Hm-3. [Шкала: 50 мс (x), 1 мкА (y).] (Е) Вольт-амперные характеристики ω-токов через мутантные каналы с заменой R222W в отсутствие (красные кривые) или в присутствии 10 мкМ Hm-3 (черные кривые; n = 4). Данные показаны как средние ± SE.

Значение IC_{50} для каналов с заменой R222G, составило 5,4 ± 0,8 мкМ при −80 мВ. Это более чем в 10 раз выше, чем IC_{50} в отношении α-токов $Na_v1.4$ (103 ± 15 нМ, см. выше раздел «Активность токсинов *H. melloteei* на Na_v»).

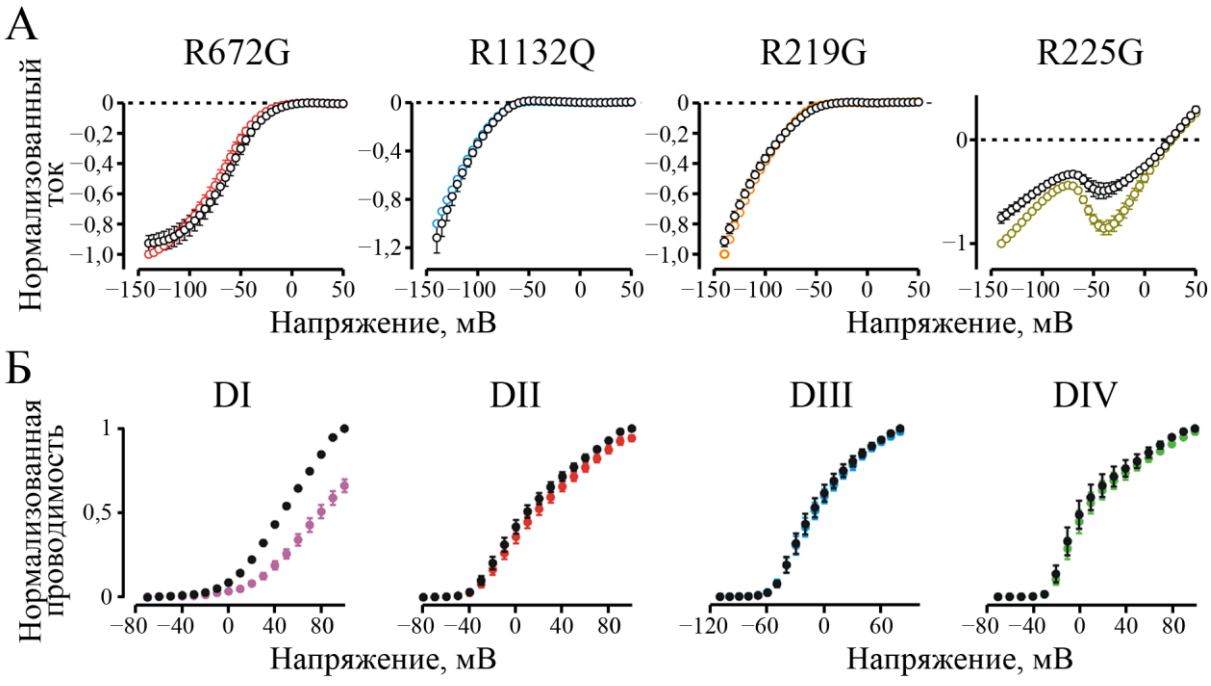


3.7.2.3. Специфичность действия Hm-3 в отношении ПЧД I

Мы проверили действие Hm-3 на серии мутантных каналов, которые проводят ω-токи и содержат замены: R219G (R1, ПЧД I), R225G (R3, ПЧД I), R672G (R2, ПЧД II; VCV000005913.47) и R1132Q (R2, ПЧД III; VCV000021155.22). В отличие от R672G и R1132Q, замены R219G и R225G пока что не были идентифицированы у пациентов с гипоПП, однако были обнаружены R225Q и R225W. Гуанидин существенно увеличивал амплитуду нелинейных токов утечки у всех мутантных каналов, подтверждая наличие ω-токов.

Для каналов с заменами R219G, R672G и R1132Q токи активировали гиперполяризацией, аналогично каналам с заменами R222G/W. Напротив, у каналов с заменой R225G ω-ток активировали деполяризацией, хотя присутствие гуанидина во внеклеточном растворе увеличивало амплитуду тока при всех напряжениях. В концентрации 10 мкМ Hm-3 не ингибировал ω-токи, активированные гиперполяризацией. При этом токсин оказался эффективен в отношении активированных деполяризацией ω-токов у каналов с заменой R225G при отрицательных напряжениях (рисунок 72А).

Рисунок 72. Специфичное действие Hm-3 на ПЧД I. (А) ω-Токи в отсутствие (цветные символы) и в присутствии 10 мкМ Hm-3 (черные символы) через каналы с мутациями в сегментах S4 (замена R672G: n = 4, R1132Q: n = 4, R219G: n = 6, R225G: n = 9). Во всех случаях вычтены токи утечки, кроме каналов с заменой R225G. Данные нормализованы к амплитуде тока в ответ на импульс −140 мВ в отсутствие Hm-3. (Б) Зависимость проводимости от потенциала для химерных каналов $K_v2.1$, содержащих мотив спираль-петля-спираль S3-S4 одного из четырех ПЧД $Na_v1.4$, до (черные графики) и после приложения 1,5 мкМ Hm-3 (цветные графики; n = 3). D, домен. Данные показаны как средние ± SE.



Мы также проверили, как влияют различные мутации канала $Na_v1.4$ на способность Hm-3 ингибировать α-ток (I_{Na}). Приложение 1 мкМ Hm-3 вызывало ингибирование каналов с заменами R672G и R1132Q с аналогичной каналам дикого типа силой, эффект на каналы с заменами R222W и R225G был несущественно меньше, а вот на каналы с заменами R219G и R222G действие токсина было значительно слабее ($p < 0,01$). Приложение бóльшей концентрации Hm-3 (10 мкМ) к каналам с заменами R219G и R222G также вызывало пониженное ингибирование по сравнению с каналами дикого типа ($p < 0,01$). Снижение ингибирующего действия Hm-3 на каналы с заменой R222G согласуется с более высоким значением IC_{50} при оценке ингибирования ω-токов через эти каналы по сравнению с IC_{50} в отношении I_{Na} каналов дикого типа. Сдвиг зависимости активации от потенциала при приложении 10 мкМ Hm-3 был очевиден для каналов с заменой R219G, хотя и меньше, чем для каналов дикого типа. Таким образом, отсутствие ингибирования ω-токов через эти каналы не вызвано потерей Hm-3 способности связываться с ними.

3.7.2.4. Hm-3 связывается с мотивом весла ПЧД I

Представленные выше данные по угнетению ω-токов позволяют предположить, что Hm-3 взаимодействует с ПЧД I. Поскольку общим для токсинов-модификаторов воротных механизмов служит их взаимодействие с мотивом весла (спираль-петля-спираль S3-S4; см. пояснение в Обзоре литературы, разделы «Ингибиторы активации K_v из яда пауков», «Токсины, воздействующие на Na^+ каналы»), мы изучили активность Hm-3 на каналах $K_v2.1$, в которых этот мотив был заменен соответствующей последовательностью различных ПЧД $Na_v1.4$ (396). Эксперименты были выполнены Ф. Босмансом (Медицинская школа Университета Джонса Хопкинса, США), автором оригинального подхода (см. Обзор литературы, раздел «Токсины, воздействующие на Na^+ каналы», рисунок 14). Токи через гибридные каналы значительно угнетались при приложении 1,5 мкМ Hm-3 только в случае внесения мотива из ПЧД I (рисунок 72Б).

Мы также получили мутантные каналы $Na_v1.4$ с заменами тех а.о., которые были предсказаны как важные для взаимодействия с Hm-3 на основании спектров ЯМР (D211H и E208A; см. ниже). Ингибирование I_{Na} при приложении 1 мкМ Hm-3 значительно снижалось в случае D211H ($n = 6$), в то время как для E208A наблюдалось лишь незначительное снижение ($n = 9$). При 10 мкМ Hm-3 ингибирование каналов с заменами D211H ($n = 4$) и E208A ($n = 3$) было как для дикого типа.

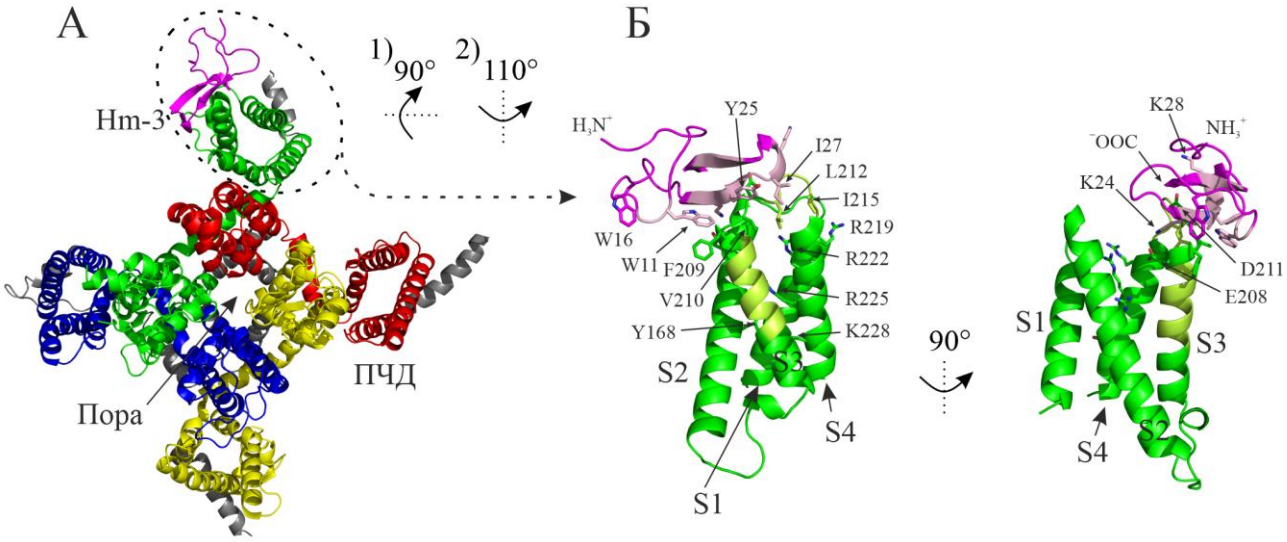
3.7.2.5. Модель комплекса Hm-3 с ПЧД I

Мы исследовали взаимодействие Hm-3 с ПЧД I с помощью спектроскопии ЯМР. ПЧД I канала человека $Na_v1.4$ (UniProt ID: P35499; a.o. L114–S246) был получен в бесклеточной системе экспрессии в лаборатории биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов ИБХ РАН. Ранее было установлено, что смешанные мицеллы цвиттерионных детергентов [додецилфосфохолин / N,N-диметилдодециламин N-оксид (ДФХ / ДДАО), 1 : 1] оптимальны для ЯМР (1077). В этой среде ПЧД I имеет ожидаемое содержание α-спиральной укладки около 60%, для ≈47% a.o. удалось получить отнесение сигналов атомов основной цепи.

Hm-3 проявляет сродство к липидным везикулам (см. раздел «Взаимодействие Hm-3 с липидными везикулами»). Теперь мы изучили взаимодействие токсина с мицеллами ДФХ / ДДАО. Равновесная константа диссоциации комплекса Hm-3 / мицелла (K_M) составляет 36,5 ± 3,1 мкМ, т.е. токсин обладает высоким сродством к поверхности мицеллы. Hm-3 взаимодействует с мицеллой своим гидрофобным кластером, образованным ароматическими a.o. (W11, F12, W16 и Y25; см. рисунок 67), при этом пространственная структура токсина существенно не изменяется.

Затем мы провели титрование ^{15}N-меченого ПЧД I в мицеллах ДФХ / ДДАО немеченым Hm-3 и наоборот. Изменения в положении и интенсивности основных сигналов спектра $^{1}H^{15}N$ указывают на образование комплекса токсина с доменом канала и выявляют контактирующие участки. Hm-3 взаимодействует с внешней половиной спирали S3 ПЧД I (S3b, a.o. S199–T207) и С-концевой частью внеклеточной петли S3-S4 (a.o. L212–I215) своим двухтяжевым антипараллельным β-листом (a.o. C23–K28 и L31–I33), а также W11 и F12, принадлежащими гидрофобному кластеру (рисунок 73Б). Петля S3-S4 в ПЧД I $Na_v1.4$ содержит два отрицательно заряженных a.o. (E208 и D211). Хотя их сигналы не идентифицированы в спектрах ЯМР, значимые изменения наблюдаются для соседних T207 и L212, что подразумевает участие их боковых цепей в образовании комплекса. Напротив, отсутствие каких-либо изменений в сигналах остатков A217 и R225 (R3) в спирали S4 указывает на то, что они не участвуют в связывании токсина; R219 и R222 (R1 и R2) не были отнесены. Отсутствие изменений химических сдвигов свидетельствует в пользу того, что связывание Hm-3 не вносит значительных перестроек в пространственную структуру ПЧД I вне спирали S3b или петли S3-S4, а топология взаимодействия Hm-3 / мицелла существенно не изменяется при связывании токсина с доменом канала. Равновесная константа диссоциации комплекса Hm-3 / ПЧД I была определена путем анализа изменений химических сдвигов ПЧД I при титровании Hm-3 и составила 6,2 ± 0,6 мкМ.

Рисунок 73. Взаимодействие Hm-3 с ПЧД I $Na_v1.4$. (А) Модель комплекса Hm-3 с каналом $Na_v1.4$ [для создания модели использована структура PDB ID: 6AGF (1079), расположение токсина взято из предсказания AlphaFold 3]. Показан вид «сверху», т.е. на плоскость мембраны со внеклеточной стороны, как на рисунках 14А и 16А. Молекула Hm-3 выделена малиновым; гомологичные повторы канала окрашены разными цветами как на рисунке 14А. (Б) Увеличенный вид Hm-3 и ПЧД I [предсказание AlphaFold 3 для токсина и изолированного домена rNav1.4 (UniProt ID: P15390), участок последовательности 132–233]. Обозначены сегменты S1–4. Светло-розовым и лимонным выделены участки молекул токсина и канала, сигналы в спектрах ЯМР которых меняются при образовании комплекса. Боковые цепи предположительно взаимодействующих а.о. токсина и канала, а также гидрофобного кластера токсина отмечены и показаны линиями. Также показаны воротные заряды (остатки аргинина) в S4 и остаток тирозина в S2 (центр переноса заряда).



Комплекс Hm-3 с активированным состоянием ПЧД I моделировали с использованием белок-белкового докинга с учетом ограничений, накладываемых данными ЯМР. Итоговое решение показывает, что токсин взаимодействует с областью S3b-S4, располагаясь периферически по отношению к ПЧД I. Комплекс стабилизируется двумя солевыми мостиками (K24–E208 и K28–D211) и многочисленными гидрофобными / стэкинг-взаимодействиями. Похожий результат предсказывает модель AlphaFold 3 (рисунок 73). По всей видимости, Hm-3 может связываться с поверхностью мембраны в положении, совместимом с одновременным взаимодействием с мотивом весла; формируется тройной комплекс канал–токсин–мембрана. Аналогичный механизм был предложен для ряда других токсинов-модуляторов воротных механизмов из яда пауков, действующих на K_v и/или Na_v (см. разделы «Ингибиторы активации K_v из яда пауков» и «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков» Обзора литературы) (386, 512-514). Hm-3 связывается с каналом своей β-шпилькой, взаимодействуя с отрицательно заряженными а.о. петли S3-S4; такие а.о. в той же петле других ПЧД необходимы для связывания других токсинов (365, 391, 507, 508, 513, 1078). Наша модель комплекса Hm-3 с ПЧД I хорошо согласуется как с моделью, описывающей механизм действия HaTx1 и

других ингибиторов активации K_v из яда пауков (365, 391, 400, 513), так и со структурой комплексов ProTx II и HWTX-IV с Na_v, изученных уже после опубликования нашей работы (516, 518), ср.: рисунки 18 и 73.

3.7.2.6. ПЧД I Na_v как сайт связывания токсинов

Мы получили убедительные свидетельства в пользу того, что Hm-3 взаимодействует с ПЧД I. (а) Hm-3 ингибирует ω-токи, вызванные мутациями в ПЧД I, но не в ПЧД II или III (рисунки 71Б, Д, Е и 72А). (б) Ингибирование α-токов уменьшается при мутациях R1 и R2 в ПЧД I и не изменяется при мутации R2 в ПЧД II или III. (в) При добавлении Hm-3 изменяются сигналы ЯМР в мотиве весла ПЧД I (рисунок 73Б). (г) Когда этот мотив переносится в каналы K_v2.1, он придает им чувствительность к Hm-3 (рисунок 72Б). (д) Наконец, мутация в петле S3-S4 ПЧД I, нарушающая образование солевого мостика с молекулой токсина, снижает ингибирующий эффект Hm-3. ПЧД I был ранее предложен в качестве одного из сайтов связывания ProTx II из яда *Th. pruriens*, но в этом случае он не является основным сайтом связывания токсина (396, 507, 516, 518, 816, 1080). Поэтому мы делаем вывод о ПЧД I как новом обнаруженном нами специфическом сайте связывания для токсинов-модуляторов воротных механизмов Na_v.

Hm-3 по-разному влияет на различные изоформы Na_v: он ингибирует Na_v1.4, 1.5 и $DmNa_v$1 в субмикромолярных концентрациях ($EC_{50} \approx$ 100, 250 и 550 нМ соответственно), слабо воздействует на Na_v1.2 и 1.6 ($EC_{50} \approx$ 1,5 и 3,5 мкМ соответственно) и вовсе не активен в отношении Na_v1.1, 1.3 или 1.8 в концентрации 1 мкМ (см. выше раздел «Активность токсинов *H. melloteei* на Na_v», рисунок 68Б). Вопреки ожиданиям, сравнение аминокислотных последовательностей области S3b-S4 ПЧД I (предполагаемого сайта связывания Hm-3; вехняя часть таблицы 39) разных изоформ не позволяет однозначно объяснить селективность токсина. С одной стороны, у канала Na_v1.8, устойчивого к Hm-3, эта область сильно отличается от других изоформ, в частности содержит положительно заряженный а.о. в петле S3-S4. С другой стороны, между чувствительными изоформами Na_v1.4 и 1.5 и устойчивыми Na_v1.1 и 1.3 здесь минимальные отличия. Наша модель (рисунок 73) предполагает важное значение отрицательно заряженных а.о. D211 и E208. У малочувствительной изоформы Na_v1.2 отсутствует аспартат, соответствующий D211, однако он имеет место у нечувствительных Na_v1.1 и Na_v1.3. Любопытно, что E208 консервативен для каналов млекопитающих, но отсутствует в канале $DmNa_v$1, который чувствителен к Hm-3.

Нам представляется две возможности для объяснения этих противоречий. (а) Hm-3 связывается не только с ПЧД I, но и с другими ПЧД — это, по всей видимости, распространенное явление для токсинов пауков (396, 507, 518). Тогда токсин должен связываться с пет-

лей S1-S2, а не S3-S4, ведь взаимодействие с последней не обнаружено на химерных каналах K_v2.1. В этой связи важно отметить структуру комплекса токсина Dc1a (UniProt ID: P49126) из яда паука *Diguetia canities* (Diguetidae) с каналом Na_vPaS, где не обнаружено контакта токсина с петлей S3-S4 (1081). Если предположить взаимодействие Hm-3 с петлей S1-S2, то ПЧД II вполне подходит на роль сайта связывания, и в данном случае сравнение последовательностей достаточно хорошо объясняет селективность токсина (см. нижнюю часть таблицы 39). Принципиально важными а.о. в таком случае могут служить отрицательно заряженные E604 и D607, а также соседние гидрофильные H605 и N608: их замены у нечувствительных изоформ коррелируют с активностью токсина. (б) Другое предположение — вклад β-субъединиц: β1 может «защищать» ПЧД III (1079), а β2 — ПЧД I (518) за счет взаимодействия с этими доменами и физического препятствования доступу токсинов. При этом разные β-субъединицы могут по-разному взаимодействовать с разными α-субъединицами, в результате селективность токсина будет обусловлена возможностью доступа к сайтам связывания, а не различиями в структуре сайтов. Проверка обеих возможностей — дело будущего.

3.7.2.7. Механизм действия Hm-3

Ряд данных свидетельствует о том, что Hm-3 стабилизирует нижнее (down) неактивированное состояние ПЧД I. (а) Токсин ингибирует α-токи через каналы Na_v1.4, сдвигая вольт-амперную характеристику в область более положительных значений потенциала (рисунок 68А, ср.: рисунок 13Г). (б) Он ингибирует ω-токи, активируемые гиперполяризацией, через каналы с заменами R222G/W (рисунок 71). (в) Аналогично α-токам, Hm-3 сдвигает вольт-амперную характеристику ω-токов через каналы с заменой R222G в сторону более положительных значений потенциала. (г) Наконец, он ингибирует ω-токи, активируемые деполяризацией, через каналы с заменой R225G аналогично α-токам: проводимость увеличивается при более положительных значениях потенциала (рисунок 72А). При этом Hm-3 не изменяет вольт-амперную характеристику ω-токов через каналы с заменой R219G. Это может быть связано с тем, что ω-токи через такие каналы активируются при большей гиперполяризации, чем в случае R222G.

Данные ЯМР, по всей видимости, относятся к активированному (up) состоянию ПЧД I, поскольку эксперименты были выполнены в отсутствие трансмембранного напряжения. Это говорит о том, что подобно другим токсинам-модуляторам воротных механизмов из яда пауков (367), Hm-3 взаимодействует как с активированным, так и неактивированным состояниями ПЧД, но имеет более высокое сродство к неактивированному состоянию. Действительно, ингибирование Hm-3 как α-токов (рисунок 70), так и ω-токов можно уменьшить путем приложения предварительных деполяризующих импульсов. При тестовом напряжении

−100 мВ ингибирование ω-токов Hm-3 достигает максимума после гиперполяризующих предварительных импульсов. Однако после деполяризующих предварительных импульсов амплитуда ω-тока в тесте увеличивается, что свидетельствует о том, что эффект токсина уменьшается, когда сенсор потенциала переходит в активированное состояние.

Связывание Hm-3 с ПЧД, вероятно, опосредовано мембраной. Данные титрования, полученные с помощью спектроскопии ЯМР, показывают, что основной вклад в свободную энергию стабилизации комплекса Hm-3 с ПЧД I дает связывание токсина с мицеллой ($\Delta G \approx -6{,}5$ ккал/моль), а связывание с ПЧД I в составе мицелл добавляет только −1,1 ккал/моль. Однако этот сравнительно низкий прирост свободной энергии не обязательно указывает на слабость комплекса токсина с каналом. Это скорее говорит о том, что Hm-3 образует гидрофобные и электростатические контакты с белком, аналогичные тем, которые уже имеют место между ПЧД I и липидами.

В настоящее время структура неактивированного состояния ПЧД I $Na_v1.4$ неизвестна. Поэтому комплекс Hm-3 с таким состоянием канала не может быть смоделирован точно. Представляется вероятным, что относительная ориентация связывающих Hm-3 элементов структуры ПЧД I, т.е. спирали S3b и петли S3-S4, изменяется от двух пространственно разделенных областей в активированном состоянии (рисунок 73Б) до непрерывной поверхности в неактивированном состоянии. Такая компактизация сайта связывания, возможно, лежит в основе повышенного сродства токсина к неактивированному состоянию каналов.

Наши данные говорят о том, что стабилизация сенсора потенциала посредством Hm-3 в неактивированном состоянии сама по себе не приводит к ингибированию ω-токов через каналы с заменами R222G/W. Скорее, предотвращая движение S4, токсин стабилизирует активное состояние воротной поры. Мы предполагаем, что Hm-3 либо непосредственно блокирует воротную пору, либо приводит к локальному конформационному изменению, достаточному для ее сужения. Пониженное ингибирование токсином α-токов через каналы с заменами R1 или R2 указывает на то, что Hm-3 напрямую взаимодействует с этими а.о. в неактивированном состоянии и в отсутствие R2 препятствует потоку ионов через воротную пору.

Разрывы внесены для удобства. Сверху нумерация для $hNa_v1.4$. Голубым отмечены трансмембранные сегменты S1–4, обнаруженные в структуре $hNa_v1.4$ (PDB ID: 6AGF), они же обозначены стрелками снизу. Светло-серым обозначены а.о., отличающиеся от rNav1.4, но с похожими свойствами; темно-серым — значительно отличающиеся по свойствам. Остатки цистеина в последовательности $hNa_v1.4$, замененные на серин для исследования ЯМР, подчеркнуты.

Таблица 39. Сравнение аминокислотных последовательностей ПЧД I и II Na^+ каналов.

Название	UniProt ID	Последовательность
		ПЧД I
		132 140 150 160 170 180 190 200 210 220 233
$rNa_v1.1$	P04774	LFSMLIMCTILTNCVFMTMSNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLIKIIARGFCLEDFTFLRDPWNWLDFTVITFAYVTEFVDLGNVSALRTFRVLRALKTISVI
$rNa_v1.2$	P04775	LFNVLIMCTILTNCVFMTMSNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLIKILARGFCLEDFTFLRNPWNWLDFTVITFAYVTEFVNLGNVSALRTFRVLRALKTISVI
$rNa_v1.3$	P08104	LFSMLIMCTILTNCVFMTLSNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLIKILARGFCLEDFTFLRDPWNWLDFSVIVMAYVTEFVDLGNVSALRTFRVLRALKTISVI
$hNa_v1.4$	P35499	LFSMFIMITILTNCVFMTMSDPPPWSKNVEYTFTGIYTFESLIKILARGFCVDDFTFLRDPWNWLDFSVIMMAYLTEFVDLGNISALRTFRVLRALKTITVI
$rNa_v1.4$	P15390	LFSMFIMITILTNCVFMTMSNPPSWSKHVEYTFTGIYTFESLIKMLARGFCIDDFTFLRDPWNWLDFSVITMAYVTEFVDLGNISALRTFRVLRALKTITVI
$hNa_v1.5$	Q14524	LFNMLIMCTILTNCVFMAQHDPPPWTKYVEYTFTAIYTFESLVKILARGFCLHAFTFLRDPWNWLDFSVIIMAYTTEFVDLGNVSALRTFRVLRALKTISVI
$mNa_v1.6$	Q9WTU3	VFSMIIMCTILTNCVFMTFSNPPEWSKNVEYTFTGIYTFESLVKIIARGFCIDGFTFLRDPWNWLDFSVIMMAYVTEFVDLGNVSALRTFRVLRALKTISVI
$hNa_v1.7$	Q15858	LFSMLIMCTILTNCIFMTMNNPPDWTKNVEYTFTGIYTFESLVKILARGFCVGEFTFLRDPWNWLDFVVIVFAYLTEFVNLGNVSALRTFRVLRALKTISVI
$rNa_v1.8$	Q62968	WFSIFITTITILVNCVQMTRTDLP---EKVEYVFTVIYTFEALIKILARGFCLNEFTYLRDPWNWLDFSVITLAYVGAAIDLRGISGLRTFRVLRALKTVSVI
$DmNa_v1$	P35500	LFSLFIITTILVNCILMIMPTTPTV-ESTEVIFTGIYTFESAVKVMARGFILCPFTYLRDAWNWLDFVVIALAYVTMGIDLGNLAALRTFRVLRALKTVAIV
		← S1 → ← S2 → ← S3 → ← S4 →
		ПЧД II
		579 590 600 610 620 630 640 650 660 670 682
$rNa_v1.1$	P04774	FVDLAITICIVLNTLFMAMEHYPMTEHFNHVLTVGNLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYYYFQEGWNIFDGFIVTLSLVELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKS
$rNa_v1.2$	P04775	FVDLAITICIVLNTLFMAMEHYPMTEQFSSVLSVGNLVFTGIFTAEMFLKIIAMDPYYYFQEGWNIFDGFIVSLSLMELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKS
$rNa_v1.3$	P08104	FVDLAITICIVLNTLFMAMEHYPMTQQFSSVLTVGNLVFTGIFTAEMVLKIIAMDPYYYFQEGWNIFDGIIVSLSLMELGLANVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKS
$hNa_v1.4$	P35499	FVDLGITICIVLNTLFMAMEHYPMTEHFDNVLTVGNLVFTGIFTAEMVLKLIAMDPYEYFQQGWNIFDSIIVTLSLVELGLANVQGLSVLRSFRLLRVFKLAKS
$rNa_v1.4$	P15390	FVDLGITICIVLNTLFMAMEHYPMTEHFDNVLSVGNLVFTGIFTAEMVLKLIAMDPYEYFQQGWNIFDSFIVTLSLVELGLANVQGLSVLRSFRLLRVFKLAKS
$hNa_v1.5$	Q14524	FTDLIITMCIVLNTLFMALEHYNMTSEFEEMLQVGNLVFTGIFTAEMTFKIIALDPYYYFQQGWNIFDSIIVILSLMELGLSRMSNLSVLRSFRLLRVFKLAKS
$mNa_v1.6$	Q9WTU3	FVDLAITICIVLNTLFMAMEHHPMTPQFEHVLAVGNLVFTGIFTAEMFLKLIAMDPYYYFQEGWNIFDGFIVSLSLMELGLADVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKS
$hNa_v1.7$	Q15858	FVDLAITICIVLNTLFMAMEHHPMTEEFKNVLAIGNLVFTGIFAAEMVLKLIAMDPYEYFQVGWNIFDSLIVTLSLVELFLADVEGLSVLRSFRLLRVFKLAKS
$rNa_v1.8$	Q62968	FAELIITLCIVVNTVFMAMEHYPMTDAFDAMLQAGNIVFTVFFTMEMAFKIIAFDPYYYFQKKWNIFDCVIVTVSLLELSASKKGSLSVLRTFRLLRVFKLAKS
$DmNa_v1$	P35500	FVELFITLCIVVNTMFMAMDHHDMNKEMERVLKSGNYFFTATFAIEAIMKLMAMSPKYYFQEGWNIFDFIIVALSLLELGLEGVQGLSVLRSFRLLRVFKLAKS
		← S1 → ← S2 → ← S3 → ← S4 →

3.7.2.8. Токсины как основа для разработки лекарств от гипоПП

Предполагается, что основной патомеханизм гипоПП состоит в возникновении ω-токов через воротные поры $Na_v1.4$ или $Ca_v1.1$, которые деполяризуют и парализуют мышцу. Соединения, ингибирующие ω-токи, могут предотвратить деполяризацию и паралич. Мы показали, что токсин Hm-3 ингибирует ω-токи через каналы с заменами R222G/W, найденные у пациентов с гипоПП. Стоит оговориться, что Hm-3 также подавляет α-токи каналов дикого типа и мутантных каналов, ограничивая его клиническую применимость. Токсины-модуляторы воротных механизмов Na_v и Ca_v служат источником для поиска новых ингибиторов ω-токов, и среди них могут найтись соединения с оптимальными свойствами. Исследование комплексов токсинов с каналами поможет выявить функционально важные а.о. и в конечном итоге разработать селективные низкомолекулярные ингибиторы ω-токов.

Результаты исследований токсинов *H. melloteei* опубликованы (1072, 1082-1086).

3.7.3. Токсины из яда паука Agelena orientalis

Если яд *H. melloteei* показал высокую неспецифическую активность в отношении ряда изоформ Na_v млекопитающих, что обусловлено наличием в его составе исследованных нами токсинов Hm-1–3, то яд паука *A. orientalis* (NCBI/UniProt taxon identifier: 293813; семейство Agelenidae) представляет интерес как раз из-за отсутствия таких эффектов. Выше были приведены данные тестирования этого яда в отношении каналов $Na_v1.2$, 1.5 и 1.7 млекопитающих (таблица 36): оказалось, что он практически не проявляет активности на этих мишенях. Яд *A. orientalis* обладает высокой токсичностью на насекомых: например, в отношении личинок мясной мухи *S. carnaria* значение $ЛД_{50}$ составило ≈3 мкг/г. Кроме того, в концентрации 0,1 мг/мл этот яд оказывает выраженное действие на Na^+ канал дрозофилы $DmNa_v1$ (облегчает активацию и ингибирует инактивацию), поэтому мы использовали его для идентификации новых селективных веществ, воздействующих на Na_v насекомых.

3.7.3.1. Выделение и первичная структура токсинов *A. orientalis*, воздействующих на Na_v

Для разделения яда *A. orientalis* мы использовали подход, отличающийся от нашего традиционного и от подхода в случае *H. melloteei*: в качестве первой стадии разделения цельного яда использовали ОФ-ВЭЖХ в основных условиях (рисунок 74). Фракции, активные на канале $DmNa_v1$, затем разделили на той же колонке в кислых условиях. Всего очистили семь новых полипептидов, получивших название β/δ-агатоксинов (аминокислотные последовательности приведены в таблице 40). Высокая степень очистки (≥95%) была подтверждена с помощью аналитической ВЭЖХ и МАЛДИ МС (измеренные Мм не приводим,

отличия от расчетных значений не привосходили 0,1 Да с учетом С-концевого амидирования, см. ниже). Основной компонент яда, соответствующий по меньшей мере 30% от общего содержания полипептидов (фракция 5 на рисунке 74), сохранял большую часть токсичности цельного яда ($ЛД_{50} \approx 7$ мкг/г на личинках мясной мухи) и был назван β/δ-агатоксином 1 (β/δ-Aga-1). Другие β/δ-агатоксины пронумерованы в соответствии со степенью их сходства с этим пептидом.

Попытка алкилирования невосстановленных β/δ-Aga с помощью 4-винилпиридина не выявила свободных тиольных групп. Полные аминокислотные последовательности токсинов мы установили с помощью ступенчатой деградации по Эдману восстановленных и алкилированных пептидов на автоматическом секвенаторе. Оказалось, что β/δ-Aga-5 и 6 содержат 36 а.о., β/δ-Aga-3, 4 и 7 — 37 а.о., а β/δ-Aga-1 и 2 — 38 а.о. (UniProt IDs: Q5Y4V2, Q5Y4V3, Q5Y4V6, Q5Y4V8, Q5Y4U6–8; см. таблицу 40). Каждый пептид содержит восемь остатков цистеина, образующих четыре внутримолекулярные дисульфидные связи. Из-за разницы в 1 Да между измеренными Мм и соответствующими значениями, рассчитанными на основании секвенированных последовательностей, был сделан вывод, что все семь пептидов амидированы на С-конце.

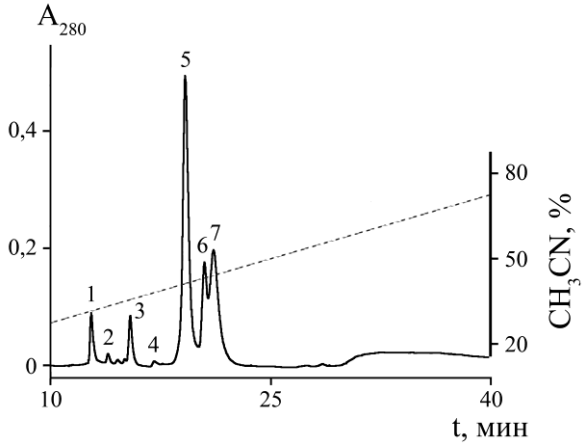


Рисунок 74. Фракционирование яда *A. orientalis* и очистка β/δ-агатоксинов. ОФ-ВЭЖХ цельного яда на колонке Jupiter C_5 (4,6×150 мм). Градиент концентрации ацетонитрила в 0,1% триэтиламине показан пунктиром. Пронумерованные фракции содержат токсины, активные на каналах $DmNa_v1$: 1, β/δ-Aga-5; 2, β/δ-Aga-4; 3, β/δ-Aga-6; 4, β/δ-Aga-7; 5, β/δ-Aga-1; 6, β/δ-Aga-2; 7, β/δ-Aga-3.

Ранее для β/δ-агатоксинов были установлены последовательности мРНК из ядовитых желез (124), и таким образом были выведены структуры их предшественников, имеющих традиционную структуру с N-концевыми сигнальными пептидами, промежуточными профрагментами и С-концевыми зрелыми пептидами (см. раздел «Биосинтез токсинов паукообразных» Обзора литературы). У всех предшественников имеются дополнительные С-концевые а.о.: -G или -GK, служащие сигналом С-концевого амидирования и подтверждающие наши результаты секвенирования.

Таблица 40. Сравнение аминокислотных последовательностей β/δ-агатоксинов с другими тотоксинами из яда воронковых пауков, потенцирующими Na_v.

Название пептида	UniProt ID	Последовательность[1]	Длина, а.о.	Мм, Да[2]
		1 5 10 15 20 25 30 35 38		
β/δ-Aga-1	Q5Y4V3	GD**C**VGESQQ**C**ADWSGPY**CC**KGYY**C**T**C**RYFPK**C**I**C**VNDN	38	4271,8
β/δ-Aga-2	Q5Y4V2	GG**C**VGESQQ**C**ADWSGPY**CC**KGYY**C**T**C**RYFPK**C**I**C**VNDN	38	4213,7
β/δ-Aga-3	Q5Y4V6	-G**C**VGENQQ**C**ADWAGPH**CC**SGYY**C**T**C**RYFPK**C**I**C**RKDS	37	4144,7
β/δ-Aga-4	Q5Y4U8	-G**C**VGENQQ**C**ADWAGLH**CC**SGYY**C**T**C**RYFPK**C**I**C**RKDS	37	4160,7
β/δ-Aga-5	Q5Y4U7	-D**C**VGENGR**C**RDWY-ND**CC**DGFY**C**S**C**RQPPY**C**I**C**RNNN	36	4234,6
β/δ-Aga-6	Q5Y4U6	-E**C**VGENGH**C**RSWY-ND**CC**DGYY**C**S**C**MQPPN**C**I**C**RNNN	36	4143,5
β/δ-Aga-7	Q5Y4V8	-E**C**AAKNKR**C**ADWAGPW**CC**EGLY**C**S**C**RSYPG**C**M**C**RPNS	37	4111,7
μ-Aga I	P11057	-E**C**VPENGH**C**RDWY-DE**CC**EGFY**C**S**C**RQPPK**C**I**C**RNNN	36	
μ-Aga II	P11058	-E**C**ATKNKR**C**ADWAGPW**CC**DGLY**C**S**C**RSYPG**C**M**C**RPSS	37	
μ-Aga III	P60178	AD**C**VGDGQR**C**ADWAGPY**CC**SGYY**C**S**C**RSMPY**C**R**C**RSDS	38	
μ-Aga IV	P11060	-A**C**VGENQQ**C**ADWAGPH**CC**DGYY**C**T**C**RYFPK**C**I**C**RNNN	37	
μ-Aga V	P11061	-A**C**VGENKQ**C**ADWAGPH**CC**DGYY**C**T**C**RYFPK**C**I**C**RNNN	37	
μ-Aga VI	P11062	-D**C**VGESQQ**C**ADWAGPH**CC**DGYY**C**T**C**RYFPK**C**I**C**VNNN	37	
CT-I	P15967	-S**C**VGEYGR**C**RSAY-ED**CC**DGYY**C**N**C**SQPPY**C**L**C**RNNN	36	
CT-II	P60177	AD**C**VGDGQR**C**ADWAGPY**CC**SGYY**C**S**C**RSMPY**C**R**C**RSDS	38	
CT-III	P15968	AD**C**VGDGQK**C**ADWFGPY**CC**SGYY**C**S**C**RSMPY**C**R**C**RSDS	38	
δ-paluIT1	P83256	-G**C**LGEGEK**C**ADWSGPS**CC**DGFY**C**S**C**RSMPY**C**R**C**RNNS	37	
δ-paluIT2	P83257	-A**C**VGDGQ**R**CAS**W**SGPY**CC**D**D**GY**Y**C**S**C**R**S**M**P**Y**C**R**C**R**C**RNNS	37	
δ-paluIT3	P83258	AD**C**LNEGDW**C**ADWSGPS**CC**GEMW**C**S**C**PGFGK**C**R**C**KK	36	
δ-paluIT4	P83259	-A**C**ATKNQR**C**ASWAGPY**CC**DGFY**C**S**C**RSYPG**C**M**C**RPNS	37	

Сверху нумерация для β/δ-Aga-1. [1]Все пептиды имеют С-концевое амидирование, за исключением δ-paluIT3. Разрывы внесены для удобства сравнения последовательностей. μ-Aga III и CT-II имеют одинаковую структуру. Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. Отличающиеся от β/δ-Aga-1 а.о. показаны на сером фоне. Красным обозначены функционально важные а.о. у δ-paluIT2, выявленные аланиновым сканированием (526). [2]Для β/δ-Aga приведены расчетные средние Мм.

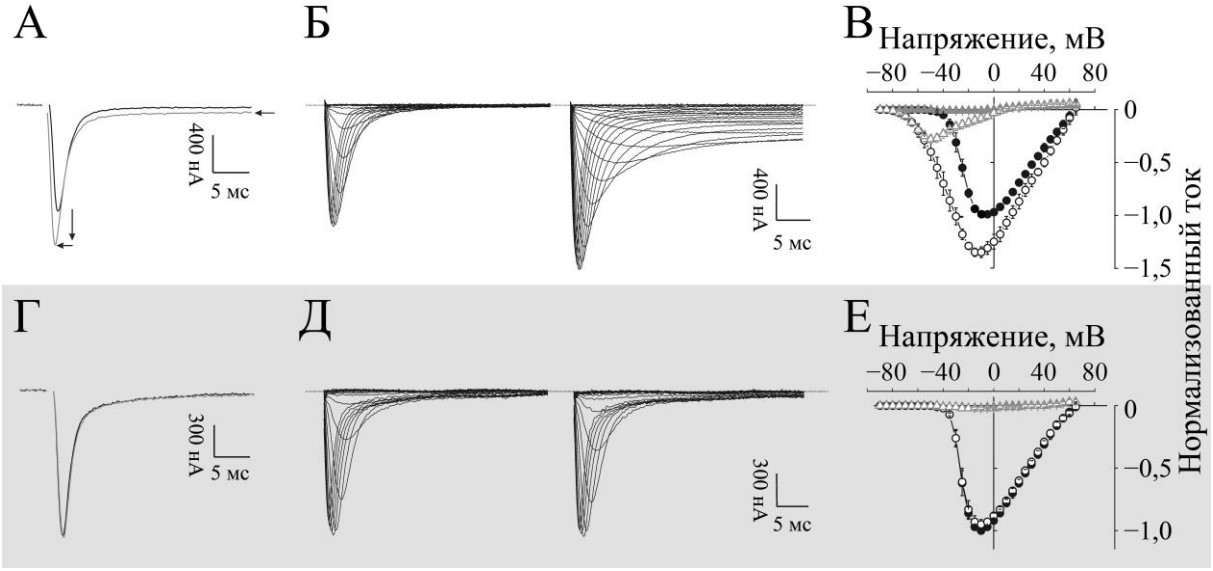
3.7.3.2. Активность токсинов *A. orientalis* на Na_v

Поскольку известно, что паук *A. orientalis* охотится на мелких насекомых, мы сначала исследовали влияние β/δ-Aga-1, мажорного компонента яда, на $DmNa_v1$. Исследование выполняли с помощью техники двухэлектродной фиксации потенциала. Приложение 1 мкМ β/δ-Aga-1 привело к трем значительным эффектам (токи через мембрану ооцитов вызвали деполяризацией до −10 мВ; это значение было определено как V_{max}; рисунок 75А): (а) амплитуда натриевого тока увеличилась на 35,2 ± 4,8%; (б) время до пика I_{Na} уменьшилось с 1,07 ± 0,12 до 0,86 ± 0,11 мс; (в) появился значительный постоянный неинактивирующийся ток (I_{NaP} в уравнении 17) величиной 5,5 ± 2,2% от пика (n = 6).

Эффекты токсина в отношении вольт-амперной характеристики мы также изучили для концентрации токсина 1 мкМ; анализ провели как для пиковых токов (I_{Na}), так и для постоянных токов (I_{NaP}; рисунок 75Б, В). Приложение β/δ-Aga-1 вызвало сильный сдвиг кривой

для I_{Na} в область гиперполяризации. При этом потенциал реверсии не изменился, т.е. ионная селективность каналов $DmNa_v1$ не была затронута. Постоянные токи I_{NaP}, индуцированные приложением токсина, можно было зарегистрировать только в диапазоне от −80 до 0 мВ, при этом наблюдали колоколообразную зависимость от потеницала с максимальной долей 20,7 ± 2,4% от пикового I_{Na} при −45 мВ (n = 6). Важно, что в той же концентрации (1 мкМ) β/δ-Aga-1 не проявил никакой активности на каналах млекопитающих (рисунок 75Г–Е).

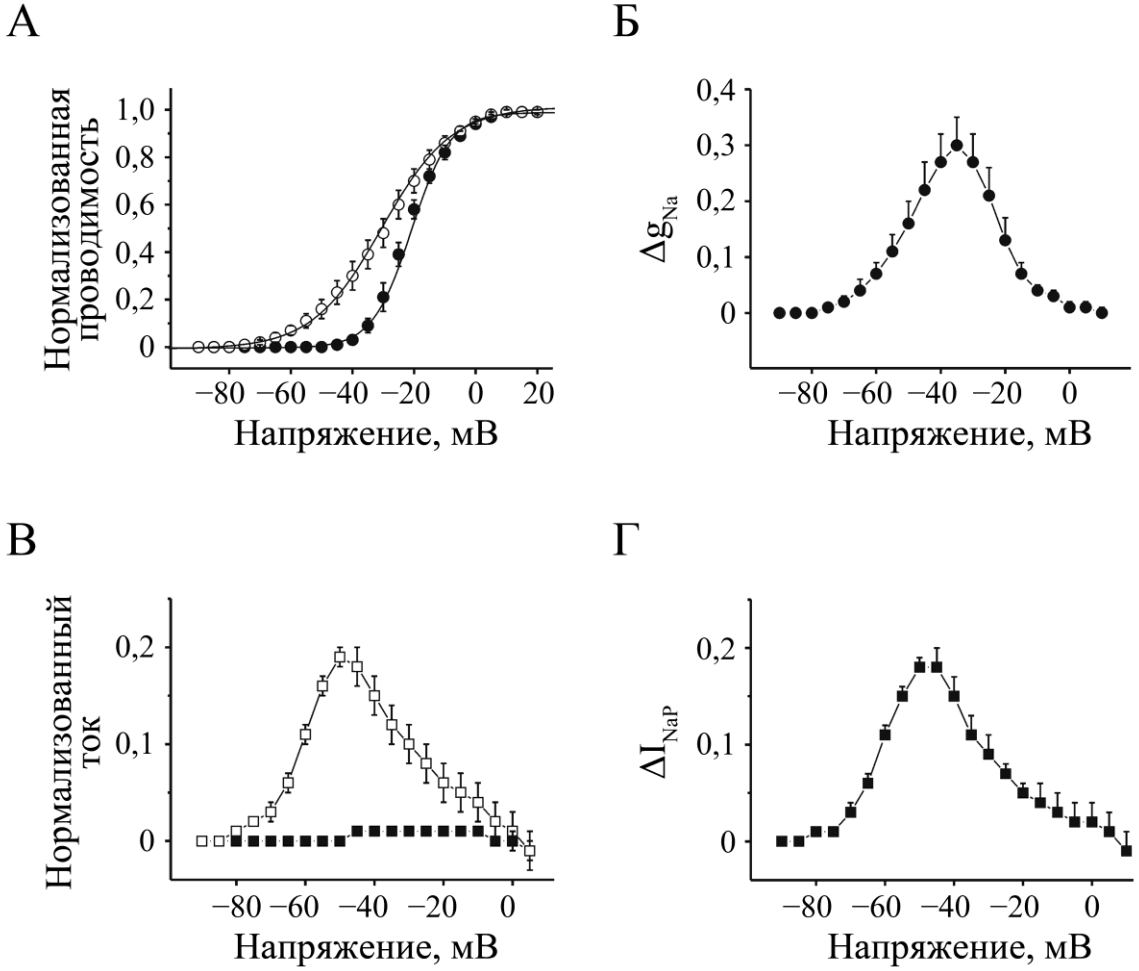
Рисунок 75. Активность β/δ-Aga-1 на Na^+ каналах насекомых и млекопитающих. Показаны типичные эффекты, индуцированные β/δ-Aga-1, в отношении каналов $DmNa_v1$ из *D. melanogaster* (А–В) и отсутствие эффектов на $Na_v1.2$ из *R. norvegicus* (Г–Е), экспрессированных в ооцитах *X. laevis*. (А и Г) Репрезентативные записи токов в контроле (черные кривые) и в присутствии 1 мкМ β/δ-Aga-1 (серые кривые). Стрелки указывают на характерные эффекты токсина в отношении $DmNa_v1$: увеличение амплитуды, уменьшение времени до пика и генерацию постоянного тока. (Б и Д) Наложение репрезентативных записей токов, вызванных деполяризацией с шагом 5 мВ между −90 и 10 мВ в контроле (слева) и в присутствии 1 мкМ β/δ-Aga-1 (справа). Пунктирная линия указывает нулевой уровень тока. (В и Е) Усредненные вольт-амперные характеристики (n = 6 для $DmNa_v1$, n = 3 для $Na_v1.2$) токов с пиковой амплитудой (I_{Na}, кружки) и постоянных токов, измеренных через 50 мс (I_{NaP}, треугольники) в контроле (закрашенные символы) и в присутствии 1 мкМ β/δ-Aga-1 (пустые символы). Данные показаны как средние ± SE.



В концентрации 1 мкМ токсин вызывал сдвиг кривой активации (рисунок 76А) в область гиперполяризации с заметным изменением наклона. Пороговый потенциал активации сдвигался от примерно −50 до −80 мВ, тогда как значение V_{max} оставалось неизменным, а значение $V_{1/2,Na}$ менялось с −20,8 ± 0,5 на −30,4 ± 1,0 мВ (n = 6). Из средних значений g_{Na} в присутствии токсина мы вычли средние значения g_{Na} в контроле, полученные значения Δg_{Na} нанесли на график в зависимости от потенциала (рисунки 76Б и 77А). Таким образом мы обнаружили колоколообразную зависимость величины эффекта в диапазоне от −80 до 0 мВ с

максимумом около −35 мВ. На рисунке 77А показан набор кривых, полученных для различных концентраций β/δ-Aga-1. Для оценки зависимости «доза–ответ» мы представили величины Δg_{Na}, измеренные при −35 мВ, в виде функции концентрации токсина и проанализировали их по уравнению Хилла (уравнение 25), значение EC_{50} составило 288,2 ± 116,4 нМ (h = 1,5 ± 0,7; n = 3–6; рисунок 77Б).

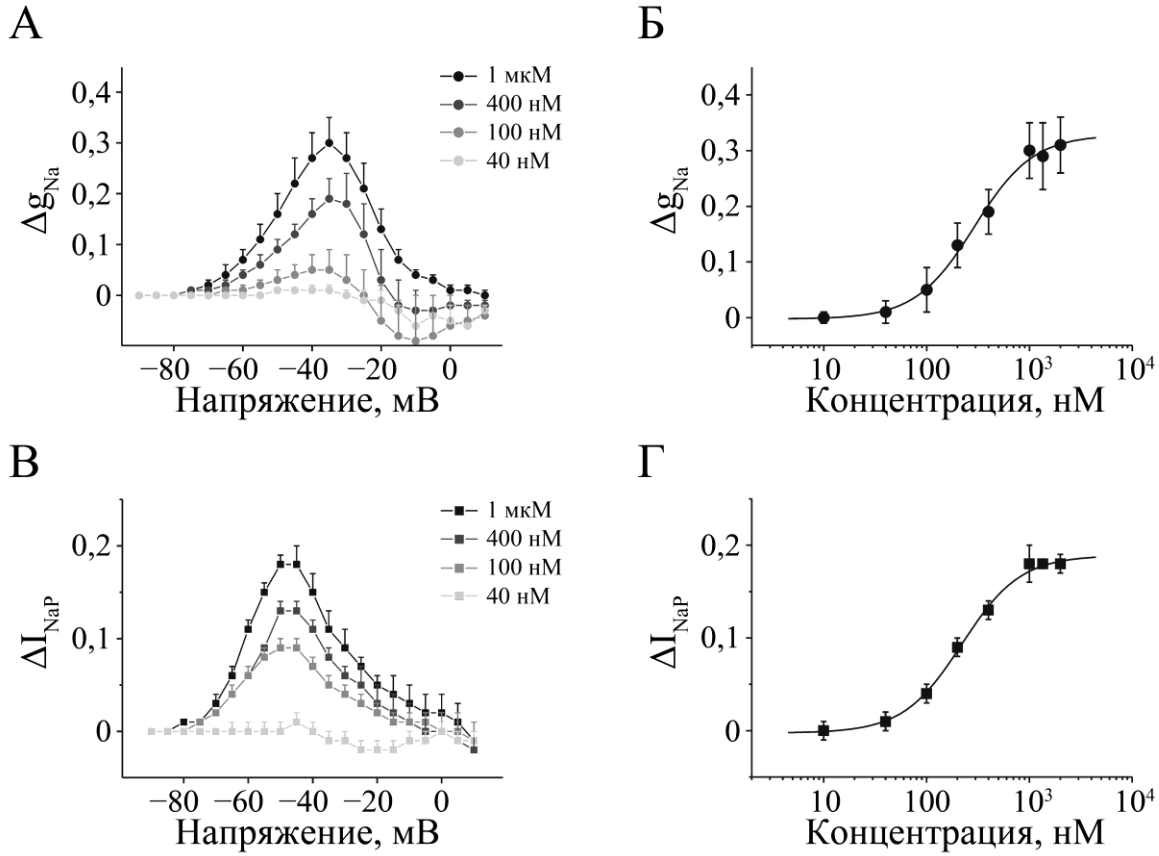
Рисунок 76. Колоколообразная зависимость эффектов β/δ-Aga-1 в отношении $DmNa_v1$ от потенциала. (А) Кривые стационарной активации в контроле (●) и в присутствии 1 мкМ β/δ-Aga-1 (○; n = 3–6). (Б) Разность нормализованных значений проводимости каналов в присутствии токсина и в контроле (Δg_{Na}) в зависимости от потенциала. (В) Нормализованные значения неинактивируемого тока (I_{NaP}) в контроле (■) и в присутствии 1 мкМ β/δ-Aga-1 (□; n = 3–6). (Г) Разность нормализованных значений I_{NaP} в присутствии токсина и в контроле (ΔI_{NaP}) в зависимости от потенциала. Данные показаны как среднее ± SE.



Неинактивирующиеся токи при действии токсина (I_{NaP}) мы анализировали аналогичным образом. За амплитуду I_{NaP} приняли значение тока через 50 мс после деполяризации. Измеренные таким образом значения I_{NaP} нормировали к пиковому току в контроле и представляли в виде зависимости от потенциала (рисунок 76В). Из средних значений I_{NaP} в при-

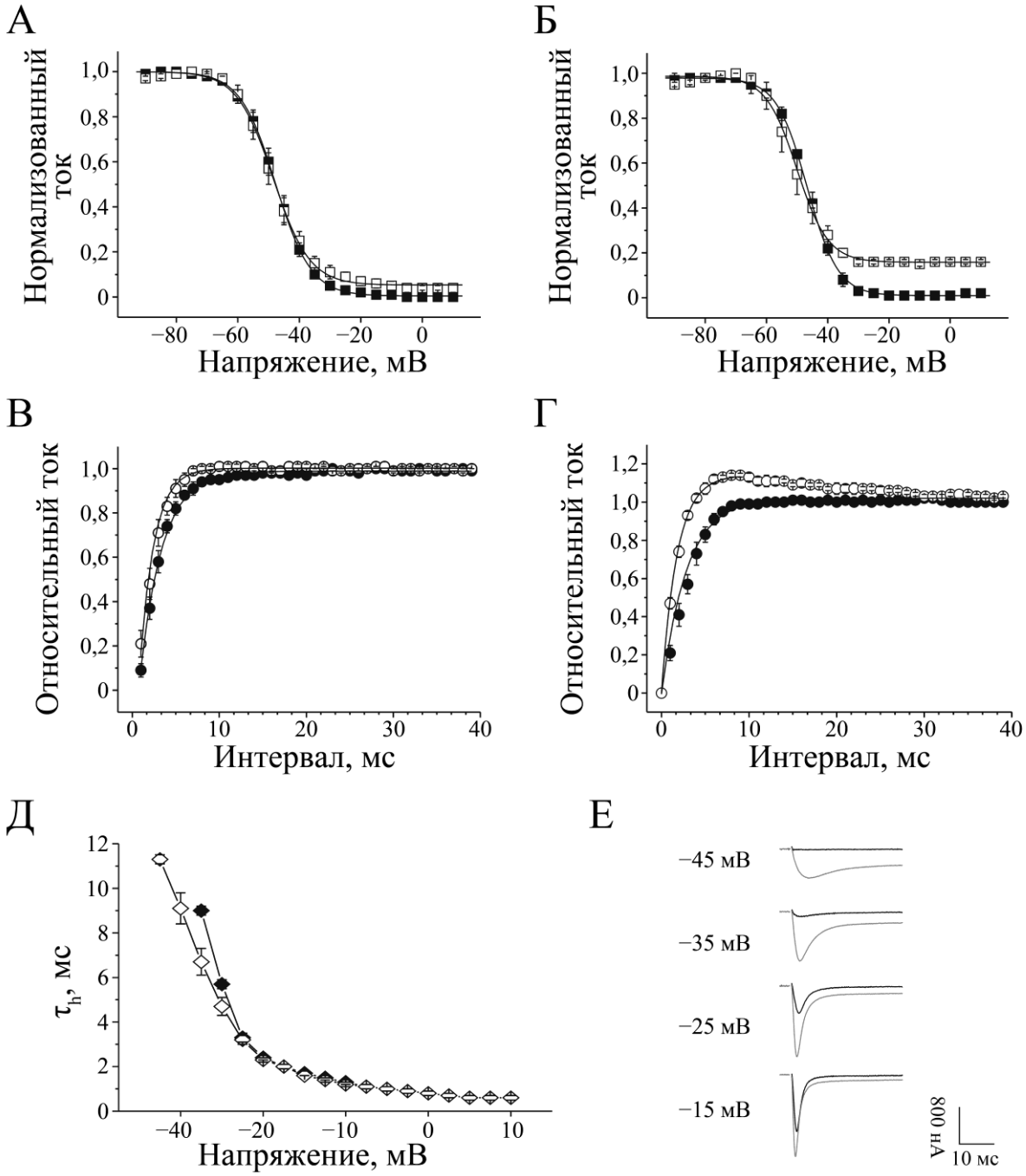
сутствии токсина мы вычли средние значения I_{NaP} в контроле, полученные значения ΔI_{NaP} показали колоколообразную зависимость от потенциала, достигая максимума около −45 мВ (рисунок 76Г). На рисунке 77В показан набор кривых, полученных для различных концентраций β/δ-Aga-1. Для оценки зависимости «доза–ответ» величины ΔI_{NaP}, измеренные при −45 мВ, представляли в виде функции концентрации токсина и анализировали по уравнению Хилла, что дало значение EC_{50} = 220,2 ± 32,9 нМ (h = 1,5 ± 0,4; n = 3–6; рисунок 77Г).

Рисунок 77. Колоколообразная зависимость от потенциала и концентрационная зависимость эффектов β/δ-Aga-1 в отношении $DmNa_v1$. (А) Кривые для Δg_{Na} как на рисунке 76Б при различных концентрациях токсина. (Б) Кривая «доза–ответ» для Δg_{Na} при −35 мВ. (В) Кривые для ΔI_{NaP} как на рисунке 76Г при различных концентрациях токсина. (Г) Кривая «доза–ответ» для ΔI_{NaP} при −45 мВ. Данные показаны как среднее ± SE.



Когда в протоколе для изучения стационарной инактивации потенциал тестового импульса установили на уровне −10 мВ (т.е. V_{max} в контроле), приложение 1 мкМ β/δ-Aga-1 не изменило значения V_h (рисунок 78А). Однако при подаче предварительных импульсов с потенциалом свыше −40 мВ индуцировался I_{NaP} с амплитудой 5,3 ± 0,6% от пикового тока (n = 6). При тестовом потенциале −30 мВ значение V_h изменилось незначительно (с −46,7 ± 0,1 до −50,0 ± 0,3 мВ), но постоянный компонент тока теперь увеличился до 15,8 ± 0,6% от пикового (рисунок 78Б; n = 3).

Рисунок 78. Влияние β/δ-Aga-1 на инактивацию $DmNa_v1$. (А, Б) Кривые стационарной инактивации каналов в контроле (■) и в присутствии 1 мкМ β/δ-Aga-1 (□; n = 3–6). (В, Г) Кривые восстановления после инактивации в контроле (●) и в присутствии 1 мкМ β/δ-Aga-1 (○; n = 4). Потенциал тестового имульса −10 мВ на панелях А и В и −30 мВ на панелях Б и Г. (Д) Зависимость постоянной времени быстрой инактивации τ_h от потенциала в контроле (◆) и в присутствии 1 мкМ β/δ-Aga-1 (◇; n = 4). Данные приведены как среднее ± SE. (Е) Наложение репрезентативных записей тока в контроле (черные кривые) и в присутствии 1 мкМ β/δ-Aga-1 (серые кривые) при различных тестовых потенциалах.



Затем мы изучили эффекты β/δ-Aga-1 на процесс восстановления каналов $DmNa_v1$ после инактивации (см. описание протокола 4 в разделе «Метод двухэлектродной фиксации потенциала» Методов; рисунок 78В, Г). При тестовом потенциале −10 мВ токсин в концен-

трации 1 мкМ уменьшал постоянную времени τ_r (см. уравнение 23) с 2,56 ± 0,11 мс до 1,65 ± 0,13 мс (n = 4). А при тестовом потенциале −30 мВ значение τ_r уменьшилось с 2,86 ± 0,08 мс до 1,77 ± 0,06 мс (n = 4). Интересно, что каналы $DmNa_v1$ не только быстрее восстанавливались после инактивации в присутствии β/δ-Aga-1, но и давали токи с большей амплитудой (до 114,2 ± 1,0%) при тестовом импульсе по сравнению с ответом на предварительный импульс при коротких интервалах между импульсами (4–28 мс). Этот эффект уменьшался с увеличением интервала между импульсами и пропадал, когда интервалы были ≥28 мс.

Чтобы проверить, влияет ли β/δ-Aga-1 на кинетику быстрой инактивации $DmNa_v1$, мы измерили постоянные времени инактивации τ_h по фазе затухания токов, используя моноэкспоненциальную зависимость (уравнение 17). Использование многоэкспоненциальных уравнений не давало преимуществ по сравнению с моноэкспоненциальным уравнением. При значениях потенциала свыше −25 мВ приложение 1 мкМ β/δ-Aga-1 не оказывало влияния на τ_h (рисунок 78Д). Однако при более отрицательных потенциалах τ_h значительно уменьшалась в присутствии токсина (n = 4).

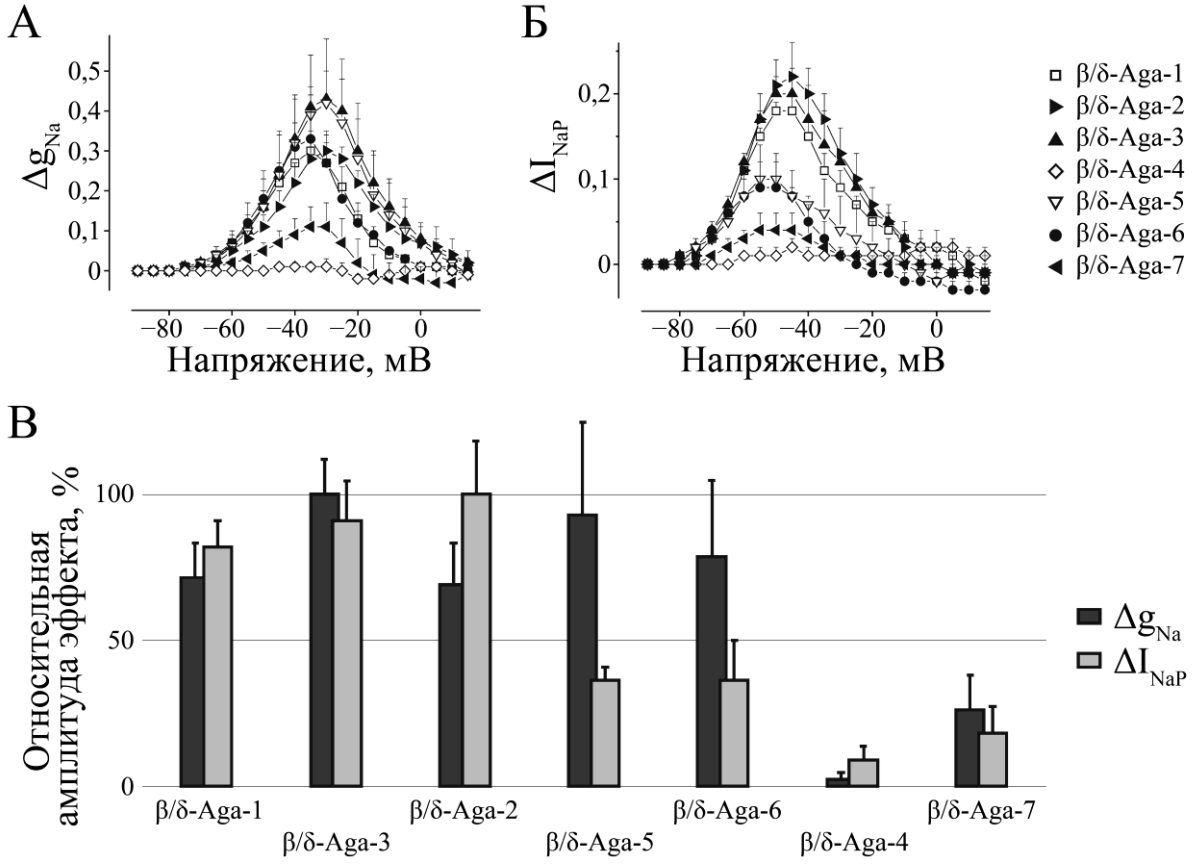
Шесть других пептидов (β/δ-Aga-2–7; см. таблицу 40) проявляют такое же двойное действие на канал $DmNa_v1$, вызывая гиперполяризационный сдвиг активации канала и индуцируя постоянные токи. Значения Δg_{Na} и ΔI_{NaP} представляли в виде функций потенциала для каждого β/δ-Aga аналогично тому, как показано на рисунках 76 и 77, получили похожие колоколообразные зависимости (рисунок 79А, Б). Для количественного сравнения все гомологи (β/δ-Aga-1–7) протестировали в концентрации 1 мкМ (n = 3–6). Значения Δg_{Na} и ΔI_{NaP}, полученные при −35 и −45 мВ, соответственно, нормировали по отношению к токсину с наибольшим эффектом, принятым за 100% (рисунок 79В). Интересно, что β/δ-Aga-4 (2,4 ± 2,4% для Δg_{Na} и 9,1 ± 4,5% для ΔI_{NaP}) и 7 (26,2 ± 11,9% для Δg_{Na} и 18,2 ± 9,1% для ΔI_{NaP}), по-видимому, слабо активны на канале $DmNa_v1$ по сравнению с β/δ-Aga-1 (71,4 ± 11,9% для Δg_{Na} и 81,8 ± 9,1% для ΔI_{NaP}), 2 (66,7 ± 11,9% для Δg_{Na} и 100,0 ± 18,2% для ΔI_{NaP}) и 3 (100,0 ± 11,9% для Δg_{Na} и 90,9 ± 13,6% для ΔI_{NaP}). Два других гомолога, β/δ-Aga-5 и 6, влияли на активацию каналов с эффективностью, аналогичной β/δ-Aga-1 (Δg_{Na}: 92,9 ± 26,2% и 78,6 ± 21,7%, соответственно), но в значительно меньшей степени приводили к появлению неинактивирующихся токов I_{NaP} (ΔI_{NaP}: 36,4 ± 4,5% и 36,4 ± 13,6%, соответственно).

3.7.3.3. Механизм действия β/δ-агатоксинов

Итак, активность β/δ-агатоксинов, с одной стороны, напоминает β-NaTx, которые облегчают активацию Na_v (см. раздел «β-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы» Обзора литературы): происходит отчетливый сдвиг вольт-амперной характеристики (рисунок 75В, ср.: рисунок 13В), а именно зависимости активации Na_v от потенциала в сторону

меньших значений (рисунок 76А); натриевые токи активируются при меньших потенциалах (рисунок 78Е). Вместе с тем наблюдаются и отличия: (а) не происходит типичного для β-NaTx снижения пиковой амплитуды при контрольном V_{max}; (б) существенно меняется наклон активационной кривой, что не характерно для β-NaTx. С другой стороны, β/δ-агатоксины похожи и на α-NaTx, ингибирующие инактивацию Na_v (см. раздел «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы» Обзора литературы): они увеличивают амплитуду пикового тока и индуцируют появление постоянных токов I_{NaP} (рисунок 75А, ср.: рисунок 13Б). Однако и в этом случае действие β/δ-Aga отличается: (а) I_{NaP} имеют место только в диапазоне потенциала от −80 до 0 мВ, следуя колоколообразной зависимости с максимальной амплитудой около −45 мВ (рисунки 76В, Г и 77В); (б) β/δ-Aga-1 не изменяет постоянную времени быстрой инактивации τ_h при потенциалах более −25 мВ и даже вызывает уменьшение τ_h при потенциалах ниже −25 мВ (рисунок 78Д), а не увеличение, как ожидается, если бы токсин препятствовал инактивации канала.

Рисунок 79. Сравнение эффектов β/δ-агатоксинов на канал $DmNa_v1$. (А, Б) Колоколообразные кривые, показывающие величину эффекта 1 мкМ β/δ-Aga на активацию (А) и постоянные токи (Б; n = 3–6). (В) Диаграмма, показывающая относительные амплитуды эффектов токсинов на активацию (использовались значения Δg_{Na}, измеренные при −35 мВ) и постоянные токи (использовались значения ΔI_{NaP}, измеренные при −45 мВ). Величины эффектов нормировали, принимая значения для токсина с наибольшим эффектом за 100%. Данные приведены как среднее ± SE.



Интерпретация этих наблюдений затруднена из-за двойного действия токсинов — как на активацию, так и на инактивацию Na_v. По всей видимости, действие β/δ-Aga на активацию аналогично β-NaTx, и перечисленные отличия не меняют сути: токсины воздействуют на ПЧД, способствуя его переходу в активированное состояние. Зависимость силы эффекта от потенциала (рисунки 76А, Б, 77А и 79А) можно объяснить предпочтительным связыванием токсинов с определенным положением сенсора потенциала (и конформацией ПЧД). При сильной гиперполяризации или деполяризации может происходить диссоциация β/δ-Aga из комплекса с Na_v. Отсутствие снижения пиковой амплитуды объясняется воздействием β/δ-Aga на инактивацию (см. ниже). Что касается изменения наклона кривой активации, то оно может указывать на изменение сопряжения между разными сенсорами потенциала Na_v под воздействием токсинов, молекулярная природа этого явления остается невыясненной.

С инактивацией дело обстоит сложнее. Очевидно, что β/δ-Aga лишь «макроскопически» напоминают α-NaTx, ведь эффекта ингибирования инактивации мы не обнаружили. Эффективность β/δ-Aga в отношении I_{NaP} зависит от потенциала (рисунок 76В, Г, 77В и 79Б), что можно объяснить аналогично действию на активацию, предположив предпочтительное связыванием токсинов с определенным положением сенсора потенциала (и конформацией ПЧД). По-видимому, β/δ-Aga способствуют переходу каналов из инактивированного в открытое состояние, на что указывает неинактивирующийся компонент в исследовании стационарной инактивации (рисунок 78А, Б), а также переходу из инактивированного в закрытое состояние, поскольку увеличивается скорость восстановления после инактивации (уменьшается τ_r; рисунок 78В, Г). Важное наблюдение в эксперименте по восстановлению после инактивации заключается в том, что вызванные тестовым импульсом токи в присутствии β/δ-Aga-1 превышают токи, вызванные предварительным импульсом, если интервал между импульсами короток (<28 мс). Дополнительный ток можно объяснить переходом Na_v из инактивированного в открытое состояние под воздействием токсина, что приводит к увеличению доли каналов, которые оказываются в открытом состоянии во время тестового импульса по сравнению с предварительным импульсом. По мере увеличения интервала реполяризации доля не связанных с токсином каналов увеличивается, и этот эффект уменьшается.

3.7.3.4. β/δ-Агатоксины как представители особого семейства пептидов

Аминокислотные последовательности β/δ-Aga-1–7 демонстрируют значительное сходство с некоторыми другими известными токсинами пауков (описаны в разделе «Инсектотоксины из яда воронковых пауков, потенцирующие Na_v» Обзора литературы), включая μ-Aga I–VI из *A. aperta* (от 46% между β/δ-Aga-1 или 2 и μ-Aga II до 92% между β/δ-Aga-7 и μ-Aga II), CT-I–III из *H. curta* (от 39% между β/δ-Aga-7 и CT-I до 75% между β/δ-Aga-5 или 6 и

CT-I) и δ-paluIT из *P. luctuosus* (от 31% между β/δ-Aga-6 и δ-PaluIT3 до 81% между β/δ-Aga-7 и δ-PaluIT4; см. таблицу 40). Фактически, все эти токсины образуют большое семейство родственных пептидов, воздействующих на Na_v насекомых. Помимо общего сходства последовательностей все они (за исключением δ-PaluIT3) амидированы на С-конце и содержат восемь строго консервативных остатков полуцистина, которые, скорее всего, определяют общую молекулярную укладку. В настоящее время известны пространственные структуры μ-Aga I и δ-paluIT1 и 2, все они демонстрируют высокую степень сходства и мотив ICK (525, 527). Даже при отсутствии у нас экспериментальных данных о расположении дисульфидных мостиков вполне разумно предположить типичный мотив ICK для β/δ-агатоксинов. Кроме того, все эти родственные токсины, по-видимому, обладают высокой таксономической специфичностью, будучи эффективными против насекомых и неактивными по отношению к Na_v млекопитающих.

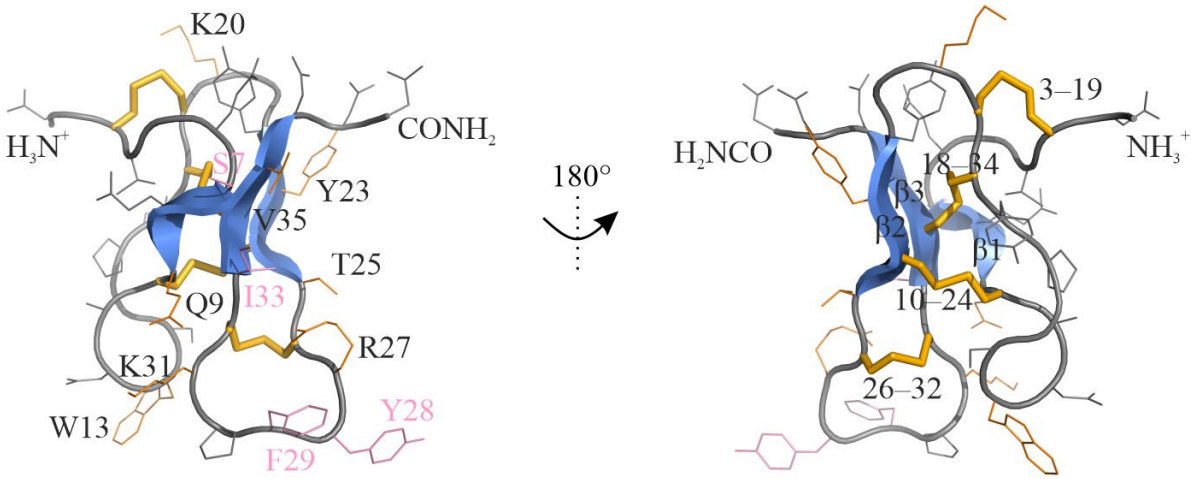
Что касается механизма действия на Na_v, то наиболее исследованные из μ-агатоксинов μ-Aga I и IV очень похожи на β/δ-Aga: они так же облегчают активацию каналов и приводят к появлению неинактивирующихся токов (100, 105, 1087). δ-Палутоксины отличаются: наиболее изученные из них δ-paluIT1 и 2 не оказывают влияния на активацию каналов, однако индуцируют неинактивирующиеся токи (524, 525). Таким образом, мы имеем дело с любопытным семейством токсинов, селективно модулирующих Na_v насекомых и демонстрирующих при этом разнообразие эффектов в отношении активации и/или инактивации каналов.

3.7.3.5. Структурно-функциональные отношения в β/δ-агатоксинах

На рисунке 80 показана модель пространственной структуры β/δ-Aga-1, построенная на основании сходства с δ-Palu-IT2 (62% идентичных а.о.; см. рисунок 20). Как отмечалось в Обзоре литературы, функционально важные а.о. были определены у δ-Palu-IT2 с помощью аланинового сканирования (окрашены в красный цвет в таблице 40 и оранжевый — на рисунке 20) (526). Из них W12 и Y22 (нумерация согласно последовательности δ-Palu-IT2) почти полностью консервативны для всех членов семейства с заменами W12A у CT-1 (соседний Y13 в этом токсине может брать на себя его функции) и Y22W у δ-PaluIT3; остаток гидроксиаминокислоты (S или T) находится в положении, эквивалентном S24, только у CT-1 здесь N; R26 заменен на M у β/δ-Aga-6, S у CT-1 и P у δ-PaluIT3; гидрофобный а.о. присутствует в положении, соответствующем M28; положительно заряженные или объемные гидрофобные а.о. обнаруживаются в положениях R32 и R34; и только R8, D19 и Y30 являются довольно вариабельными с предпочтением R/K, H или Q в положении 8, D/E или S в положении 19 и K или Y в положении 30 (см. таблицу 40). Следовательно, общие характеристики фармакофора δ-PaluIT2 хорошо сохраняются среди всех членов семейства.

Сниженная активность β/δ-Aga-4 и 7 по сравнению с β/δ-Aga-1, 2 и 3 (рисунок 79В) может быть связана с заменами P16L и K31G, соответственно. При этом наименее активный гомолог β/δ-Aga-4 отличается от наиболее активного β/δ-Aga-3 только одной заменой — P16L. Пролин может иметь важное структурное значение, и было показано, что этот а.о. формирует *цис*-пептидную связь у δ-PaluIT2 (525). Замена K31G же затрагивает фармакофор δ-Palu-IT2. Относительное «разобщение» двух эффектов, наблюдаемое у β/δ-Aga-5 и 6 (они существенно эффективнее в отношении активации, нежели неинактивирующихся токов), можно объяснить различием в структуре петли между C^2 и C^3, которая у этих двух пептидов короче других β/δ-Aga.

Рисунок 80. Модель пространственной структуры β/δ-Aga-1, построенная на основании сходства с δ-Palu-IT2 (PDB ID: 1V91). Структура показана аналогично δ-Palu-IT2 на рисунке 20. Боковые заместители раскрашены: соответствующие важным для активности δ-Palu-IT2 а.о. — оранжевым, неважные — серым, отличные у β/δ-Aga и μ-Aga в сравнении с δ-Palu — розовым.



Фактически, β/δ и μ-агатоксины (наиболее изученные μ-Aga I и IV) можно рассматривать как обладающие «дополнительной» β-NaTx-подобной активностью по сравнению с δ-палутоксинами (δ-PaluIT1 и 2). Путем сравнения последовательностей могут быть обнаружены а.о., которые придают эту дополнительную особенность. У β/δ-Aga-1 это S7, Y28, F29 и I33 (розовый цвет на рисунке 80), соответствующие а.о. в δ-PaluIT2 это: G6, S27, M28 и R32. Все другие замены в δ-PaluIT2 по сравнению с β/δ-Aga-1 также могут быть обнаружены в других токсинах, проявляющих активность, подобную β-NaTx, их поэтому стоит отнести к нейтральным. Интересно, что все предполагаемые а.о., обеспечивающие подобную β-NaTx активность, сближены в пространстве (рисунок 80), причем два из четырех попадают в фар-

макофор δ-PaluIT2. Разумеется, для подтверждения этих предположений необходимы дополнительные эксперименты, например сайт-направленный мутагенез.

3.7.3.6. Значение исследования β/δ-агатоксинов

β/δ-Агатоксины, подробно изученные нами, представляют большой интерес в фундаментальном и практическом плане. Во-первых, они сочетают в себе свойства модуляторов двух воротных механизмов Na_v — активации и инактивации. Это мы отразили в их названии (см. комментарий насчет номенкатуры токсинов в Обзоре литературы, раздел «Разнообразие токсинов пауков, воздействующих на Na^+ каналы»): префикс “β” традиционно обозначает модуляторы активации, а “δ” — инактивации. Мы впервые ввели подобное обозначение для указания на двойной эффект; теперь оно используется широко и принято в номенклатуре UniProt и VenomZone. К примеру, ProTx II рекомендовано называть “β/ω-theraphotoxin-Tp2a” ввиду активности в отношении Na_v (их активации) и Ca_v. Очевидно также, что префикс “μ” в названии μ-агатоксинов должен быть заменен, поскольку в настоящее время им принято обозначать поровые блокаторы Na_v.

Во-вторых, важен вопрос: каким образом достигается такое сочетание свойств? Поскольку существуют родственные β/δ-агатоксинам соединения, проявляющие лишь один из эффектов (δ-палутоксины), а также β/δ-Aga-5 и 6, у которых один из эффектов меньше выражен по сравнению с другими β/δ-Aga, очевидным кажется, что эти эффекты не являются необходимо связанными и могут реализоваться независимо. С точки зрения молекулярного механизма усматриваются две возможности. (а) β/δ-Aga могут взаимодействовать с двумя различными сайтами Na_v — аналогично, например, ProTx II, который взаимодействует с ПЧД II и IV, и это находит отражение в его воздействии на процессы активации и инактивации Na_v соответственно (см. комментарии в Обзоре литературы) (507). (б) Рецепторный сайт может быть один, однако способ взаимодействия с ним такой, что реализуются два эффекта. В пользу одного сайта свидетельствуют очень близкие значения EC_{50} для обоих эффектов у β/δ-Aga-1: 288,2 ± 116,4 нМ и 220,2 ± 32,9 нМ с практически идентичными коэффициентами Хилла (1,5; рисунок 77Б, Г). Если сайт действительно один, он вряд ли отличается от δ-paluIT1 и 2, т.е. это рецепторный сайт 4 (526). В таком случае существует многообразие вариантов взаимодействия токсинов с ПЧД II, приводящих к различным эффектам. Уже хорошо известно, что с этим сайтом связываются как β-NaTx, облегчающие активацию (458, 468, 470, 471), так и токсины пауков, угнетающие активацию Na_v (507-510, 516). Здесь же связываются δ-paluIT, приводящие к появлению стационарного неинактивирующегося тока (526) (см. соответствующие разделы Обзора литературы). По всей видимости, в этом сайте связываются и описанные нами β/δ-Aga, вызывающие одновременно облегчение активации и по-

явление неинактивирующегося тока. Дальнейшие исследования позволят определить взаимосвязь между эффектами; это будет важно для понимания как механизма действия токсинов, так и деталей функционирования каналов. В настоящее время, однако, мы не можем с уверенностью выбрать один из вариантов, потребуются дополнительные эксперименты: мутагенез каналов и/или конкуренция с другими токсинами.

В-третьих, как уже говорилось, β/δ-агатоксины вместе с μ-агатоксинами, куртотоксинами и δ-палутоксинами образуют семейство близкородственных пептидов с разнообразными свойствами. На этом примере нам удалось, по-видимому, показать, что природные комбинаторные библиотеки токсинов из яда паукообразных могут использоваться в структурно-функциональных исследованиях: детальное сравнение активности природных вариантов β/δ-Aga позволило предположить функциональную значимость отдельных а.о.

Наконец в-четвертых, β/δ-Aga не воздействуют на Na_v млекопитающих, а выступают селективными лигандами каналов насекомых. Поэтому они представляются перспективной основой для разработки новых пестицидов. Тема создания биоинсектицидов на основе природных пептидных нейротоксинов была популярна в 2000-х гг. и практически сошла на нет в 2010-х ввиду отсутствия значимого прогресса: если в лабораторных и пилотных экспериментах отмечалась инсектицидная активность, то ни один из токсинов в результате так и не дошел до коммерциализации. Однако, как отмечалось в Обзоре литературы (раздел «Возможности практического использования токсинов паукообразных»), в 2018 г. Агентство по охране окружающей среды США одобрило к применению биоинсектицид Spear-T, содержащий в качестве активного ингредиента пептидный токсин паука (567, 866). Это событие возродило интерес к теме, и мы отмечаем появление новых стартапов, развивающих сходные продукты.

Результаты изучения β/δ-агатоксинов опубликованы (1088).

3.7.4. α-Токсины скорпионов, ингибирующие инактивацию Na^+ каналов

Как мы увидели в Обзоре литературы (разделы «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы» и «Изучение Na^+ каналов»), значение этой группы токсинов для прогресса нейробиологии сложно переоценить. В нашей работе мы рассмотрели разнообразие α-NaTx, изучили структуру трех хорошо известных токсинов и попытались использовать накопленные знания о структурно-функциональных отношениях у этих полипептидов для получения селективных лигандов Na_v млекопитающих и насекомых.

3.7.4.1. Разнообразие α-NaTx

В Обзоре литературы мы постарались рассмотреть известное разнообразие α-NaTx. Представленные данные мы дополнили функциональными — что известно о биологической активности α-NaTx: токсичности в отношении различных животных (таблица 41), а также эффективности действия на Na^+ каналы млекопитающих и насекомых. В результате мы собрали близкую к исчерпывающей базу данных α-NaTx в виде таблиц. Размещение ее в интернете в удобной для пользователей форме (как это сделано в случае Kalium для лигандов K^+ каналов, см. соответствующий раздел выше) — дело будущего.

Получив всеобъемлющую базу данных, мы приступили к ее анализу. Схема нашего исследования была следующая. (1) Собранную базу данных мы дополнили моделями пространственной структуры нескольких хорошо охарактеризованных α-NaTx, построенными по гомологии. (2) Для токсинов с известной структурой, а также для построенных моделей мы провели МД и анализ конформационной подвижности. (3) Мы выполнили оценку гидрофильных / гидрофобных свойств молекулярной поверхности α-NaTx с использованием МГП, усредненного по траекториям МД. (4) Затем мы построили двумерные карты, отображающие свойства поверхности токсинов. Форму молекул α-NaTx без сильных искажений можно представлять сферической, а потому для создания карт можно использовать сферическую проекцию. (5) Мы использовали полученные карты и обобщения, сделанные при анализе конформационной подвижности и гидрофильных / гидрофобных свойств молекулярной поверхности α-NaTx, для предсказания селективности токсинов и их производных, после чего осуществили экспериментальную проверку наших предположений.

3.7.4.2. Молекулярная динамика предсказывает модульное строение α-NaTx

Сравнение статических структур может быть необъективным, особенно в случае моделей по гомологии. Чтобы учесть подвижность и изучить динамическую организацию α-NaTx, мы провели анализ основных движений в ходе симуляций МД длительностью 60 нс в ячейке с явно заданной водой.

Таблица 41. Свойства α-токсинов скорпионов, воздействующих на Na^+ каналы.

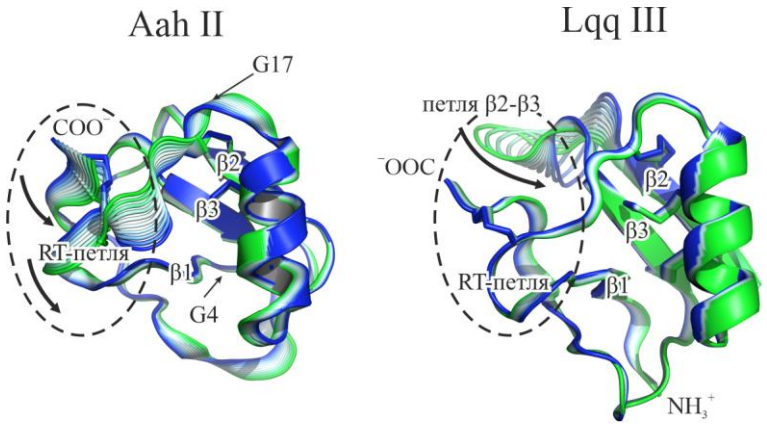
Токсин	PDB ID или *(Uniprot ID / Шаблон)*[1]	Вычисленные параметры[2]				$ЛД_{50}$[5], мкг/кг		Ссылки
		$<МГП_{МС}>_{МД}$[3]	$<МГП_{Кор}>_{МД}$[3]	$RMSF_{RT}$[4], нм	$RMSF_{Кор}$[4], нм	Насекомые	Млекопитающие	
Млекотоксины								
Aah I	*(P01479 / 1PTX)*	−0,027 ± 0,283	−0,029 ± 0,017	0,17 ± 0,09	0,07 ± 0,06	1 900	0,5 (i.c.v.) 17,5 (s.c.)	(421, 484)
Aah II	1PTX	−0,109 ± 0,315	0,010 ± 0,013	0,18 ± 0,11	0,08 ± 0,06	6 500	0,025 (i.c.v.) 12 (s.c.)	(421, 422, 484)
Aah III	*(P01480 / 1PTX)*	−0,017 ± 0,266	0,044 ± 0,015	0,26 ± 0,13	0,08 ± 0,04	10 200	0,35 (i.c.v.) 25 (s.c.)	(421, 484)
BmK M8	1SNB	−0,239 ± 0,273	−0,015 ± 0,015	0,18 ± 0,09	0,12 ± 0,09		10 000 (i.v.)	(1089)
BmK αTx11	2KBH	−0,190 ± 0,311	−0,023 ± 0,020	0,22 ± 0,10	0,12 ± 0,07			
Bot III	*(P01485 / 1PTX)*	−0,138 ± 0,279	0,036 ± 0,017	0,16 ± 0,11	0,06 ± 0,04		1,25 (i.c.v.)	(1090)
Lqh II	*(P59355 / 1PTX)*	−0,138 ± 0,294	0,013 ± 0,017	0,20 ± 0,12	0,09 ± 0,06	2 040	0,1 (i.c.v.) 64 (s.c.)	(422)
Lqq V	*(P01481 / 1PTX)*	−0,148 ± 0,185	−0,012 ± 0,015	0,24 ± 0,12	0,20 ± 0,12	16 900	0,125 (i.c.v.) 25 (s.c.)	(421, 422, 484)
Инсектотоксины								
Aah II химера	1SEG	0,096 ± 0,020	0,022 ± 0,013	0,13 ± 0,08	0,07 ± 0,05		≈60 (s.c.)	(438)
Bj αIT	*(Q56TT9 / 1SN1)*	0,087 ± 0,025	−0,021 ± 0,017	0,19 ± 0,10	0,10 ± 0,05	50	> 6 000 (s.c.)	(1091)
BmK αIT1	1OMY	0,068 ± 0,016	−0,058 ± 0,017	0,16 ± 0,10	0,07 ± 0,06	5,2[6]	4 500 (s.c.)	(1092)
Bot IT1	*(P55902 / 1LQQ)*	0,030 ± 0,024	0,001 ± 0,021	0,17 ± 0,12	0,06 ± 0,03	600	50 (i.c.v.)	(1093)
Lqh αIT	1LQH	−0,003 ± 0,025	0,043 ± 0,018	0,23 ± 0,12	0,12 ± 0,08	18,8	55 (i.c.v.) 60 (s.c.)	(421, 422, 484)
Lqq III	1LQQ	0,049 ± 0,019	−0,008 ± 0,016	0,11 ± 0,09	0,05 ± 0,04	60	55 (i.c.v.) 55 (s.c.)	(421, 422, 484)

Токсин	PDB ID или *(UniProt ID / Шаблон)*[1]	Вычисленные параметры[2]				$ЛД_{50}$[5], мкг/кг		Ссылки
		$<МГП_{МС}>_{МД}$[3]	$<МГП_{Кор}>_{МД}$[3]	$RMSF_{RT}$[4], нм	$RMSF_{Кор}$[4], нм	Насекомые	Млекопитающие	
α-Подобные токсины								
BmK M1	1SN1	0,071 ± 0,021	−0,042 ± 0,017	0,20 ± 0,09	0,14 ± 0,08		530 (i.v.)	(436)
BmK M2	1CHZ	0,020 ± 0,018	−0,034 ± 0,014	0,16 ± 0,08	0,07 ± 0,07			
BmK M4	1SN4	−0,033 ± 0,018	−0,034 ± 0,017	0,13 ± 0,06	0,09 ± 0,06		4 000 (i.v.)	(1094)
BmK M7	1KV0	0,071 ± 0,022	0,032 ± 0,013	0,21 ± 0,11	0,07 ± 0,05			
BmK M10	2KBK	0,022 ± 0,016	−0,043 ± 0,014	0,10 ± 0,08	0,05 ± 0,04		>50 000 (i.v.)	(1095)
Bom III	*(P13488 / 1FH3)*	0,013 ± 0,020	−0,052 ± 0,018	0,24 ± 0,12	0,11 ± 0,09	360	1,15 (i.c.v.) 150 (s.c.)	(421, 422, 484)
Bom IV	*(P59354 / 1SN1)*	0,033 ± 0,039	−0,082 ± 0,018	0,17 ± 0,12	0,04 ± 0,03	140	1,15 (i.c.v.) 275 (s.c.)	(421, 422, 484)
Bot I	*(P01488 / 1SN1)*	0,112 ± 0,016	−0,063 ± 0,011	0,20 ± 0,10	0,10 ± 0,07		97 (i.v.)	(1096)
Bot II	*(P01483 / 1SN1)*	0,033 ± 0,019	−0,037 ± 0,012	0,10 ± 0,05	0,05 ± 0,04		160 (i.v.)	(1096)
Lqh III	1BMR	−0,071 ± 0,021	0,015 ± 0,015	0,27 ± 0,12	0,12 ± 0,08	200	2,5 (i.c.v.) 160 (s.c.)	(421)
Lqh IV	*(P83644 / 1LQQ)*	0,053 ± 0,024	−0,015 ± 0,014	0,22 ± 0,10	0,15 ± 0,08			
Lqh VI	*(P59356 / 1FH3)*	0,022 ± 0,024	0,010 ± 0,019	0,27 ± 0,11	0,12 ± 0,04	230	34 (i.c.v.) 96,5 (s.c.)	(422)

[1]α-NaTx с неизвестной пространственной структурой были смоделированы по гомологии. Указанные номера UniProt и идентификаторы PDB использовались в качестве источника аминокислотной последовательности токсина и его структурного шаблона соответственно. [2]Эти параметры были рассчитаны для временного интервала 20–60 нс МД. Приведены средние значения ± SD. [3]Среднее значение МГП поверхности модуля специфичности (МС) и сердцевинного модуля (Кор). [4]Рассчитано по траектории МД с фильтрацией по первому собственному вектору (RMSF-NM) для а.о. RT-петли и сердцевинного модуля. [5]Данные получены из литературы. Токсичность по отношению к насекомым определяли на тараканах *B. germanica*, а для млекопитающих — на мышах при интрацеребровентрикулярной, внутривенной или подкожной инъекции. [6]$ПД_{50}$.

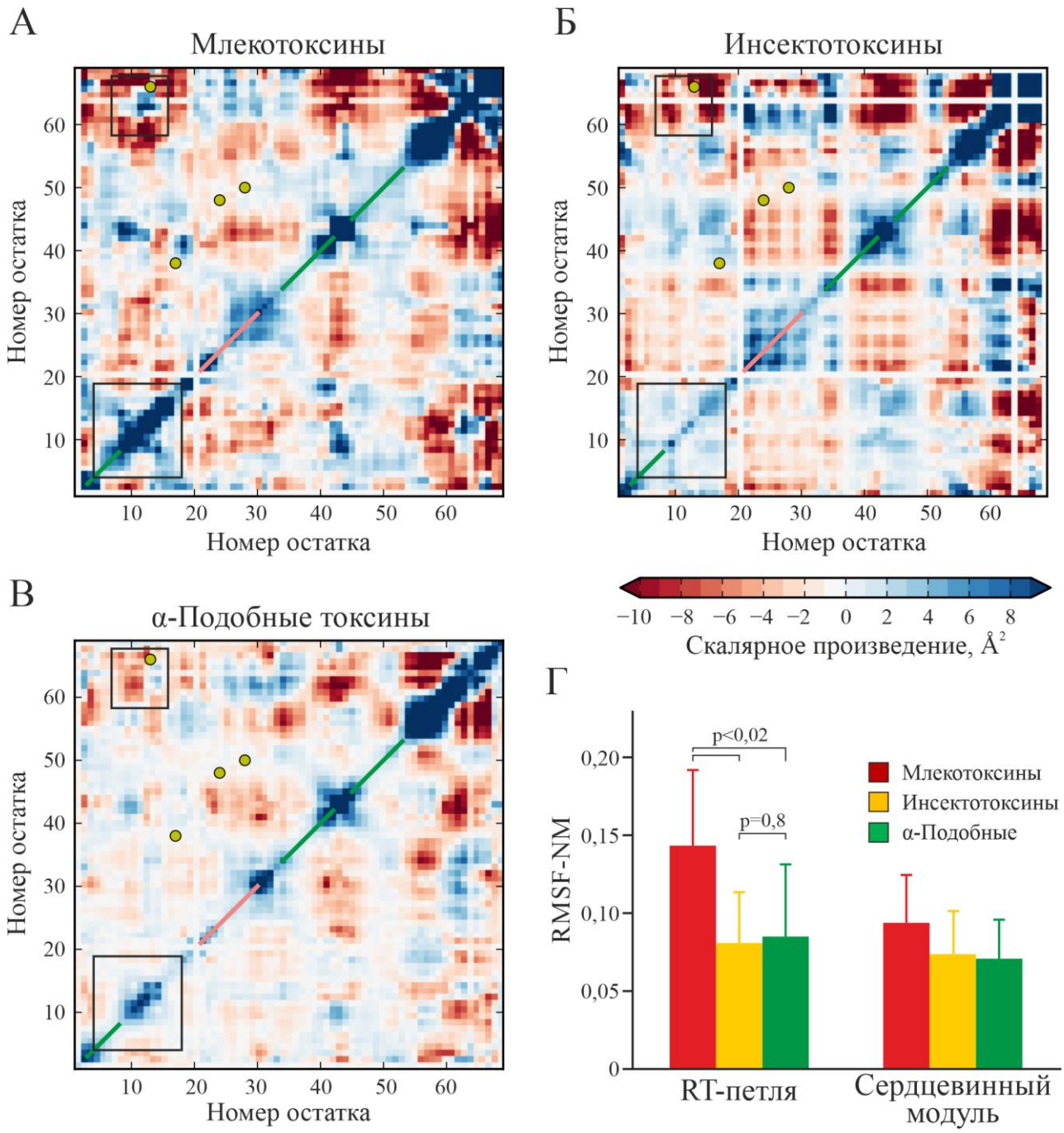
Анализ нескольких «медленных» (низкочастотных) мод (собственные векторы 1–5) выявляет в структуре α-NaTx три участка, которые демонстрируют относительно независимые движения: (1) RT-петля (а.о. 8–12; нумерация по последовательности Aah II), соединенная с С-концевой областью (а.о. 56–64), вместе составляющие NC/RC-домен (см. о нем в Обзоре литературы); (2) петля β2-β3 (а.о. 39–43); и (3) остальная часть молекулы (ее «ядро» / «кор» / «сердцевина»). Общим признаком всех α-NaTx является согласованное движение петли β2-β3 и С-концевой области. Основываясь на динамических свойствах, мы делаем вывод, что структура α-NaTx состоит из двух частей или модулей: «сердцевинного» / «корового» модуля и модуля специфичности (рисунок 81). Последний включает в себя NC/RC-домен и петлю β2-β3. Интересно, что классические млекотоксины обладают наиболее конформационно гибкими модулями специфичности. RT-петля этих токсинов демонстрирует наибольшую амплитуду движений по самой медленной моде (пример млекотоксина и инсектотоксина показаны на рисунке 81). Ее высокая подвижность у млекотоксинов выявлена при анализе RMSF вдоль первого собственного вектора (RMSF-NM; таблица 41; рисунок 82Г).

Рисунок 81. Различия динамической организации млекотоксинов и инсектотоксинов. Показаны движения вдоль первого собственного вектора для типичных млекотоксина (Aah II) и инсектотоксина (Lqq III); на схемах представлены две «экстремальные» структуры, окрашенные в синий и зеленый цвета, с несколькими «промежуточными» структурами, полученными путем морфинга. Дисульфидные мостики показаны стержнями. Модули специфичности обведены пунктирными эллипсами. Для Aah II указано положение G4 и G17.



На рисунке 82А–В представлен анализ корреляции движений различных частей молекул трех групп α-NaTx. Недиагональные элементы иллюстрируют коррелированный (синие области), антикоррелированный (красные области) или некоррелированный (белые области) характер движений между различными частями токсинов. У млекотоксинов RT-петля движется согласованно с С-концевой областью, тогда как у инсектотоксинов это не так — у них NC/RC-домен относительно жесткий, а наиболее подвижна петля β2-β3 (рисунок 81).

Рисунок 82. Анализ динамики α-NaTx. (A–B) Наиболее сходные моды движений молекул. На каждой из трех карт показаны коррелированные движения высокой амплитуды, характерные для соответствующей группы токсинов. Положения дисульфидных мостиков показаны желтыми кружками; α-спирали и β-тяжи отмечены зелеными и розовыми диагональными линиями соответственно. Черными прямоугольниками выделены области наиболее выраженных различий между группами. Шкала представляет собой скалярное произведение двух векторов, описывающих движение каждого а.о. в динамике, связанной с первым собственным вектором. Белые полосы на картах соответствуют разрывам в выравнивании аминокислотных последовательностей, представленном в таблице 10. (Г) Анализ подвижности RT-петель и сердцевинных модулей. Показаны средние значения (± SD) RMSF-NM для а.о. в RT-петле и сердцевинном модуле.



По крайней мере, частично гибкость RT-петли млекотоксинов объясняется наличием консервативных остатков глицина в положениях 4 и 17 (см. таблицу 10), которые могут выступать как своеобразные «шарниры». У инсектотоксинов в тех же положениях чаще всего присутствуют остатки аланина или фенилаланина. Чтобы проверить предполагаемую роль G4 и G17, мы ввели соответствующие замены *in silico* в типичный млекотоксин Bot III (G17A и G17F) и типичные инсектотоксины Lqq III (F17G) и BmK αIT1 (A17G) и провели МД по стандартному протоколу. В результате мы обнаружили, что подвижность увеличивается у BmK αIT1 (A17G) (RMSF-NM: 0,11 ± 0,03 нм у мутантного, 0,04 ± 0,01 нм у дикого типа) и снижается у Bot III (G17F) (RMSF-NM: 0,09 ± 0,02 нм у мутантного, 0,13 ± 0,03 нм у дикого типа). Для двух других мутантов мы не обнаружили явного влияния на подвижность. А вот у двойного мутанта Lqq III (A4G, F17G) подвижность RT-петли увеличилась (RMSF-NM: 0,10 ± 0,03 нм у мутантного, 0,05 ± 0,03 нм у дикого типа).

3.7.4.3. Оценка гидрофильности модуля специфичности α-NaTx

Мы использовали метод белковой топографии (985). Были построены карты МГП для млекотоксинов, инсектотоксинов и α-подобных токсинов; на рисунке 83 показаны карты, усредненные по группам и траекториям МД, — они помогают определить общие и отличительные черты между этими группами токсинов. У всех α-NaTx наблюдается чередование гидрофобных «островков» и гидрофильных «озер». В то же время большое и «глубокое» гидрофильное «озеро» присутствует только у млекотоксинов. Удивительно, но это «озеро» находится внутри модуля специфичности (отмечен красной рамкой). Количественный анализ усредненного динамического МГП выявляет консервативность свойств сердцевинного модуля и вариабельность модуля специфичности (рисунок 83Г). Значения $<МГП_{МС}>_{МД}$ для млекотоксинов и инсектотоксинов или α-подобных токсинов статистически достоверно различаются ($p < 10^{-4}$). В то же время значения МГП модуля специфичности существенно разнятся внутри групп млекотоксинов и особенно α-подобных токсинов (таблица 41), что свидетельствует о том, что сайты связывания этих α-NaTx в Na_v млекопитающих могут так же существенно различаться.

3.7.4.4. Предсказание активности α-NaTx

Мы решили использовать разработанную стратегию для прогнозирования активности α-NaTx. Хотя полипептиды BeM9, 10 и 14 из яда скорпиона *M. eupeus* были одними из первых описанных α-NaTx (1097, 1098), их селективность в отношении Na_v насекомых или млекопитающих не была изучена. Ш. Джу (Институт зоологии Китайской академии наук) с соавторами описали активность четырех других α-NaTx из этого яда, названных MeuNaTxα-1,

2, 4 и 5 (428). Поскольку эти результаты были опубликованы, когда мы уже провели работу, они не попали в нашу выборку, и мы могли выполнить независимую проверку на них. На основании анализа динамических свойств и МГП (рисунок 84) мы относим токсины BeM9 и MeuNaTxα-1 и 2 к группе инсектотоксинов или α-подобных токсинов (значение $\langle МГП_{МС} \rangle_{МД}$ составило 0,051 ± 0,018, −0,069 ± 0,022 и −0,033 ± 0,039 соответственно; ср.: таблица 41, типичные значения для млекотоксинов < −0,1). Кроме того, BeM9 обладает характерными для инсектотоксинов динамическими особенностями: относительно жесткой RT-петлей и достаточно гибкой петлей β2-β3. Важно, что результат нашего анализа расходится с положением указанных токсинов на филогенетическом дереве (рисунок 84Д): на основании сходства последовательностей предполагается, что MeuNaTxα-1 принадлежит к группе млекотоксинов.

Рисунок 83. Модуль специфичности у млекотоксинов более гидрофилен, чем у инсектотоксинов. (А–В) Карты МГП показывают «ландшафт» гидрофобных и гидрофильных областей. Модуль специфичности обведен красной пунктирной линией (это проекция статической структуры Aah II). Для наглядности показаны проекции C_α-атомов для токсинов Aah II, Lqq III и BmK M1 на усредненных картах млекотоксинов, инсектотоксинов и α-подобных токсинов соответственно. (Г) Сравнение $\langle МГП \rangle_{МД}$ для трех групп токсинов. Представлены средние значения ± SD для модулей специфичности и сердцевинных модулей.

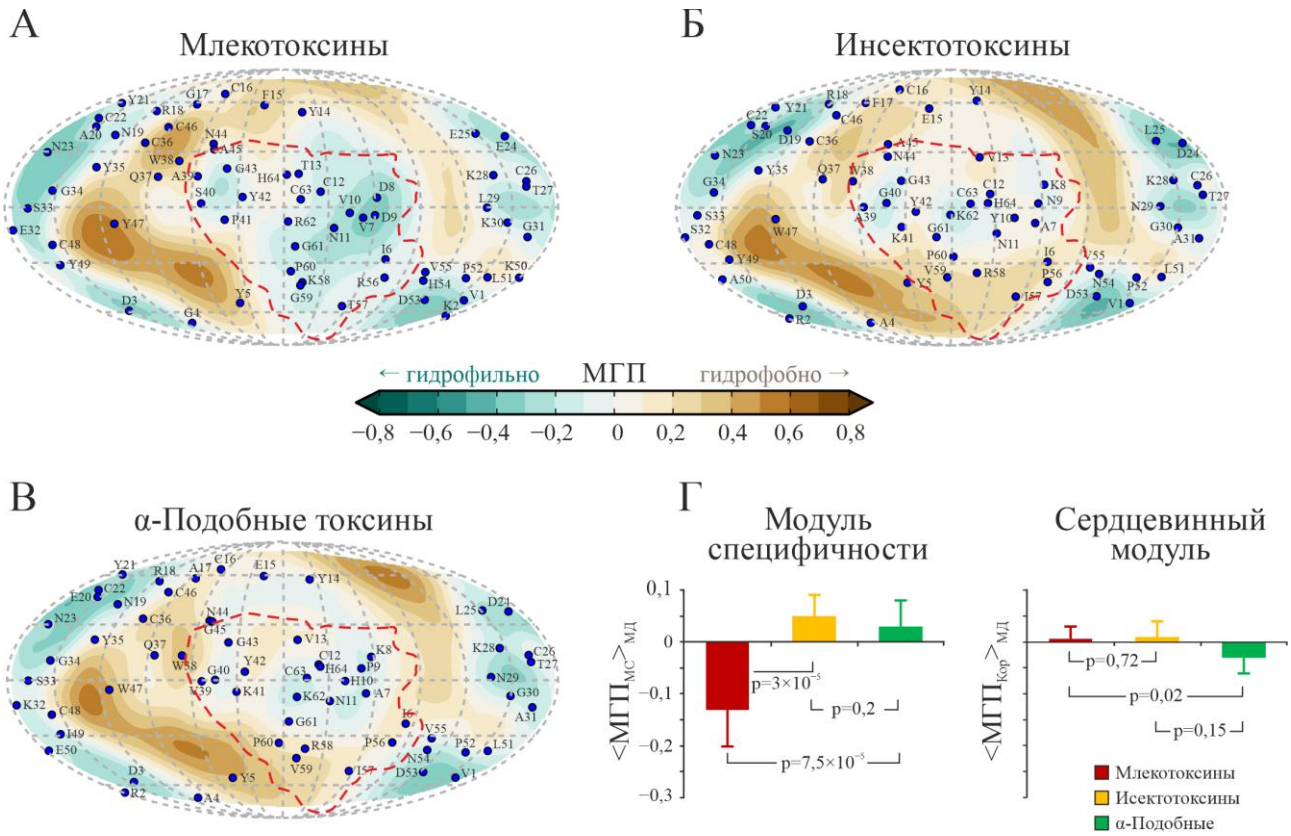
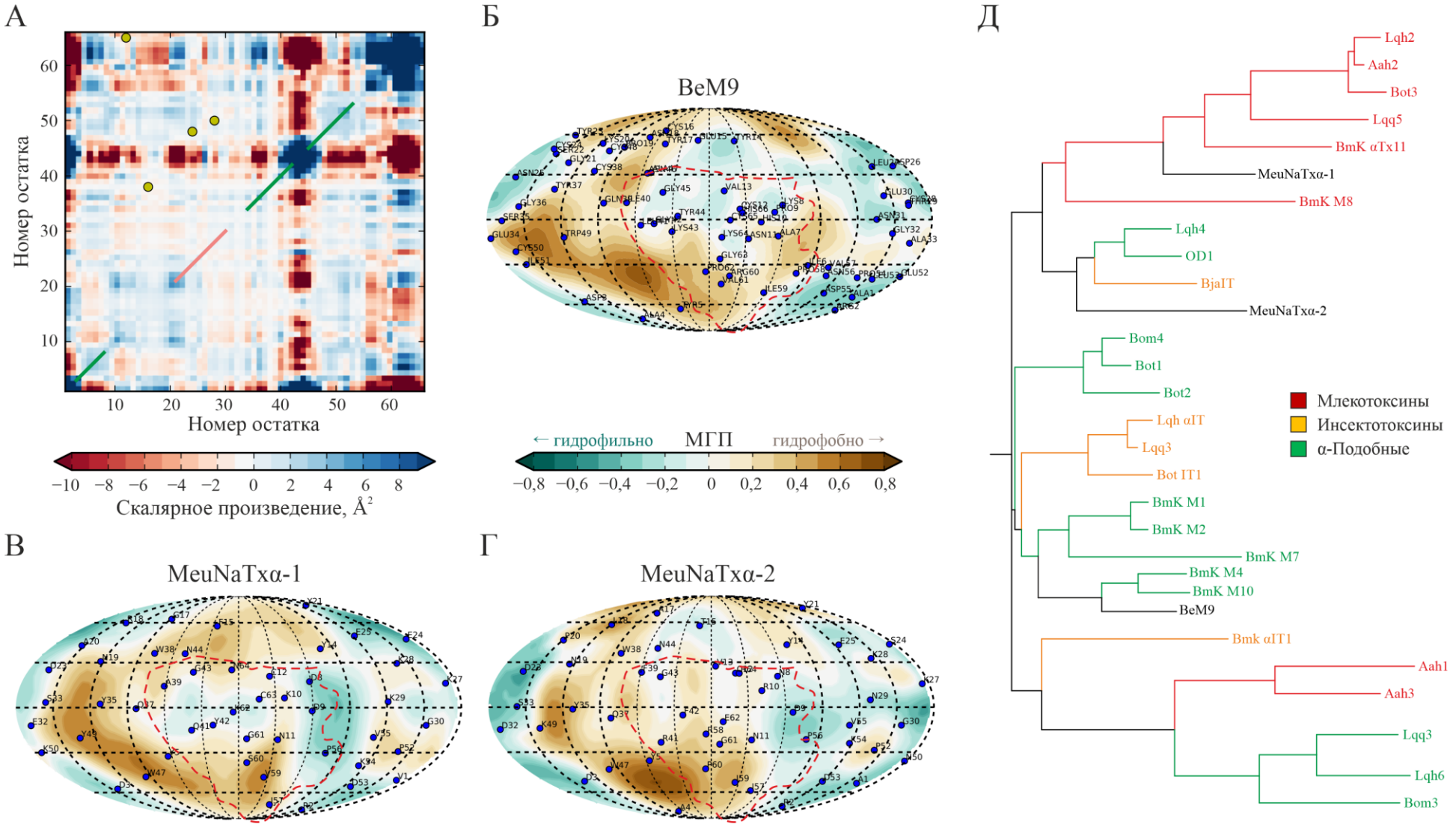


Рисунок 84. Предсказание активности BeM9, MeuNaTxα-1 и 2. (А) Анализ динамики BeM9 (аналогично рисунку 83А–В). (Б–Г) Карты МГП для BeM9 (Б), MeuNaTxα-1 и 2 (В и Г). (Д) Филогенетическое дерево α-NaTx, построенное с помощью Clustal. Красным обозначены млекотоксины, желтым — инсектотоксины, зеленым — α-подобные токсины, черным — BeM9, MeuNaTxα-1 и 2.



3.7.4.5. Получение рекомбинантных α-NaTx и их производных

Мы получили рекомбинантный BeM9 с помощью нашего традиционного подхода в *E. coli* BL21(DE3) с Trx в качестве партнера, бромциан использовался для расщепления гибридного белка — аналогично Hm-3 (как описано выше в разделе «Получение рекомбинантного Hm-3»). Токсин очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ; выход составил 2 мг/л среды. Мы также получили целый ряд производных BeM9 и некоторые другие α-NaTx (см. таблицу 42) по аналогичной процедуре. Важно помнить, что некоторые природные токсины имеют С-концевое амидирование, полученные нами рекомбинантные аналоги такой модификации не содержат. Во всех случаях мы измеряли Мм очищенных полипептидов с помощью МАЛДИ МС, и она совпадала с расчетной (в данном случае речь о средней Мм): 7335,1 (измеренная) и 7335,3 Да (расчетная) для BeM9, 7178,1 и 7178,1 Да для MeuNaTxα-1, 7195,2 и 7195,1 Да для Lqq IV; аналогичная точность была достигнута для производных BeM9.

3.7.4.6. Изучение активности BeM9

Мы протестировали BeM9 против ряда Na_v млекопитающих и $DmNa_v1$ дрозофилы, экспрессированных в ооцитах *X. laevis,* с использованием техники двухэлектродной фиксации потенциала (рисунок 85). В результате обнаружили, что BeM9 влияет на Na_v как насекомых, так и млекопитающих; устойчивой оказалась изоформа $Na_v1.2$, характерная для ЦНС. Таким образом, BeM9 — типичный α-подобный токсин. MeuNaTxα-1 и 2 были тоже охарактеризованы как α-подобные токсины (428), что подтверждает наши предположения (см. также рисунок 85).

3.7.4.7. Модульное строение α-NaTx

Пространственная структура α-NaTx может быть описана в терминах топологии βααβ (см. рисунок 15). Вместе с дефензинами растений, представляющими тот же тип укладки, токсины скорпионов классифицируются в отдельное суперсемейство ноттинов по SCOP и в гомологичное суперсемейство 3.30.30.10 (смешанный α-β класс) по CATH. Несмотря на относительно небольшой размер, наш анализ выявляет модульную организацию α-NaTx. Заметим, что в общепринятых словосочетаниях «коровый домен» и «NC/RC-домен» (часть модуля специфичности) термин «домен» используется некорректно, они сохраняются в литературе в силу исторических причин. Рекомендуется использовать более корректные термины «часть», «субдомен» или «модуль».

Таблица 42. α-NaTx и их производные, использованные в работе.

Источник	Название	UniProt ID	Последовательность
			1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 66
A. australis	Aah II	P01484	VKDGYIVDDVNCTYFCG--RNAYCNEECTKLKGESGYCQWASPYGNACYCYKLPDHVRTKGPGRCH-NH_2
M. eupeus	MeuNaTxα-1	P86408	VRDGYIADDKNCAYFCG--RNAYCDEECKKKGAESGYCQWAGQYGNACWCYKLPDKVPIKVSGKCN-NH_2
	BeM9	P09981	ARDAYIAKPHNCVYECYNPKGSYCNDLCTENGAESGYCQILGKYGNACWCIQLPDNVPIRIPGKCH
Искусственные производные BeM9	BeM9-1		ARD**G**YIAKPHNCVYECG**N**PKGSYCNDLCTENGAESGYCQILGKYGNACWCIQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-2		ARDAYIAKPHNCVYECYNPKGSYCNDLCTENGAESGYCQI**Q**GKYGNACWCIQLPDNVP**Q**R**Q**PGKCH
	BeM9-3		ARD**G**YIAKPHNCVYECG**N**PKGSYCNDLCTENGAESGYCQI**Q**GKYGNACWCIQLPDNVP**Q**R**Q**PGKCH
	BeM9-4		ARDAYIAKPHNCVYECYNPKGSYCNDLCTENGAESGYCQILGKYGNACWCIQLPDNVPI**K**IPGKCH
	BeM9-5		A**K**DAYIAKPHNCVYECYNPKGSYCNDLCTENGAESGYCQILGKYGNACWCIQLPDNVPI**K**IPG**R**CH
	BeM9-6		ARDAYIAK**NY**NCVYECYNPKGSYCNDLCTENGAESGYCQILGKYGNACWCIQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-7		ARDAYIAK**DD**NCVYECYNPKGSYCNDLCTENGAESGYCQILGKYGNACWCIQLPDNV**R**IRIPGKCH
	BeM9-8		ARDAYIAKPHNCVY**F**CYNPKGSYCNDLCTENGAESGYCQILGKYGNACWCIQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-9		ARDAYIAKPHNCVY**D**CYNPKGSYCNDLCTENGAESGYCQILGKYGNACWCIQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-10		ARD**G**YIAK**DDV**CVYECG**N**PKGSYCNDLCTENGAESGYCQI**ASP**YGNACWCIQLPDNV**RTKG**PG**R**CH
	BeM9-11		ARD**G**YIAK**DDV**C**T**Y**F**CG--**RNA**YCNDLCTENGAESGYCQ**WASP**YGNACWCIQLPD**H**V**RTKG**PG**R**CH
	BeM9-12		ARDAYIA**E**PHNCVYECYNPKGSYCNDLCTENGAESGYCQILGKYGNACWCIQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-13		ARDAYIA**E**PHNCVYECG**N**PKGSYCNDLCTENGAESGYCQILGKYGNACWCIQLPDNVPIRIPGKCH
L. q. quinquestriatus	Lqq IV	P01489	GVRDAYIADDKNCVYTCG--SNSYCNTECTKNGAESGYCQWLGKYGNACWCIKLPDKVPIRIPGKCR-NH_2
O. doriae	OD1	P84646	GVRDAYIADDKNCVYTCA--SNGYCNTECTKNGAESGYCQWIGRYGNACWCIKLPDEVPIRIPGKCR-NH_2

Сверху нумерация для BeM9. Условные обозначения как в таблице 10. В данном случае серым фоном выделен весь модуль специфичности, а не только NC/RC-домен. Замены в структуре производных BeM9 выделены полужирным шрифтом.

Выделение модулей мы аргументируем следующими наблюдениями. (1) МД показывает, что два модуля α-NaTx демонстрируют подвижность независимо друг от друга и поэтому могут рассматриваться как «динамические домены» (рисунки 81 и 82). Более того, высокая подвижность модуля специфичности служит отличительной особенностью млекотоксинов. Отметим, что анализ известных пространственных структур α-NaTx показывает более высокую подвижность NC/RC-домена по сравнению с коровым доменом в каждой конкретной структуре (1099-1101), однако именно МД в одинаковых условиях позволяет сравнивать динамические характеристики разных молекул. (2) В то время как между сердцевинными модулями токсинов из разных групп мы практически не нашли различий в суммарных физико-химических свойствах, модули специфичности млекотоксинов значительно более гидрофильны, что мы элегантно визуализировали на картах сферической проекции (рисунок 83). Хотя предыдущие исследования предлагали деление молекул α-NaTx на две части (432, 433, 438, 439), никогда прежде это не было четко проиллюстрировано с помощью расчетов МД и МГП. (3) Функционально именно модуль специфичности определяет селективность α-NaTx и отнесение их к одной из трех групп. Этот вывод сделан на основе многочисленных экспериментов по мутагенезу (429-437) (см. Обзор литературы, раздел «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы») и проиллюстрирован нашими результатами. По-видимому, наиболее прямое доказательство было предоставлено лабораторией М. Гуревича (Тель-Авивский университет) путем «пересадки» NC/RC-домена из инсектотоксина Lqh αIT в млекотоксин Aah II; полученная химера характеризовалась активностью донора (438). (4) С эволюционной точки зрения можно рассматривать модуль специфичности как быстро меняющийся сегмент, тогда как сердцевинный модуль более консервативен. Модуль специфичности, по-видимому, эволюционирует быстрее, чтобы приспособить селективность α-NaTx к различным Na_v. Многие а.о., для которых предполагают положительный отбор (1102, 1103), расположены именно в модуле специфичности. Два из них (39 и 41) находятся в петле β2-β3, что служит дополнительным доводом в пользу включения ее в состав этого модуля. В литературе также упоминается, что С-концевая область токсинов скорпионов претерпела структурные перестройки в ходе эволюции — вероятно, для адаптации к новым мишеням (1104).

Хотя три группы α-NaTx можно разделять на основе функциональных и структурных свойств, следует отметить, что они скорее образуют континуум, а не дискретный паттерн, при этом некоторые токсины обладают «промежуточными» свойствами, и их трудно отнести к конкретной группе. Это наблюдение иллюстрируется малой корреляцией между токсичностью α-NaTx для млекопитающих или насекомых и гидрофильными / гидрофобными свойствами их поверхности (таблица 41).

Следует также отметить, что текущая классификация α-NaTx (представлена в Обзоре литературы), основанная на данных о токсичности или конкурентном связывании, расплывчата. Например, «инсектотоксины» не полностью специфичны для насекомых; часто сообщается, что они активны и на каналах млекопитающих (см. также таблицу 41). Необходима более биохимически точная классификация, основанная на тестировании отдельных изоформ Na_v. Мы полагаем, что будь доступен достаточно полный массив таких данных, вычислительный анализ привел бы к более однозначным структурно-функциональным отношениям.

Наконец, принципиальное значение имеет тот факт, что в изученных структурах комплексов Na_v с α-NaTx (см. обсуждение в Обзоре литературы, раздел «α-Токсины скорпионов, воздействующие на Na^+ каналы», рисунок 16) именно определенный нами модуль специфичности контактирует с каналами (418, 451); эти работы были выполнены после нашей. В частности, оказалось, что петля β2-β3 формирует множественные контакты с ПЧД IV. Таким образом, наши предположения о составе и функциональной значимости модуля специфичности получили прямое экспериментальное подтверждение.

3.7.4.8. Активность производных BeM9

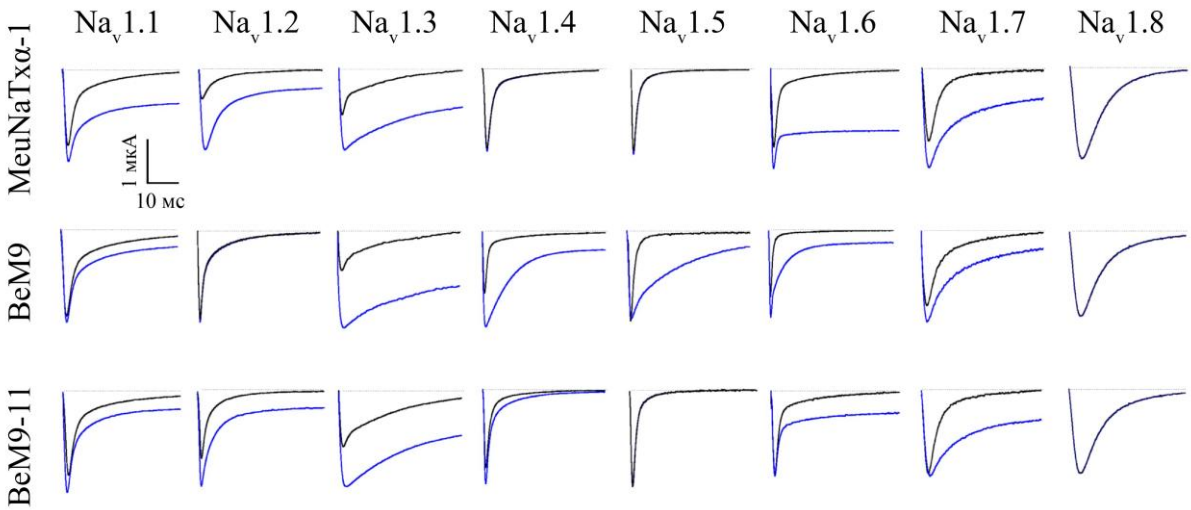
Мы решили использовать токсин BeM9 как основу для получения производных с измененной селективностью действия. Для этого мы использовали результаты нашего анализа структуры α-NaTx, приведшего к выделению модуля специфичности и выявлению его свойств, характерных для токсинов с разной селективностью. Поскольку мы обнаружили сравнительно высокую подвижность модуля специфичности у млекотоксинов, которая отчасти объясняется «шарнирными» остатками глицина G4 и G17 (по нумерации Aah II), мы произвели соответствующие замены в BeM9 (производное BeM9-1, см. таблицу 42). Ввиду того, что модуль специфичности млекотоксинов более гидрофильный, мы заменили ряд гидрофобных а.о. в составе BeM9 (производное BeM9-2). Наконец, в структуру BeM9-3 введены оба типа замен.

В последовательность BeM9-6 мы ввели два а.о., характерные для модуля специфичности инсектотоксинов, а в BeM9-7 — напротив, три а.о., встречающиеся у млекотоксинов. Интересно, что группы α-NaTx различаются еще и тем, какой именно положительно заряженный а.о. присутствует в консервативной позиции (K58 у Aah II). Мы поменяли R60 в BeM9, характерный для инсектотоксинов и α-подобных токсинов, на лизин, встречающийся у млекотоксинов (производное BeM9-4). А в BeM9-5 мы внесли еще две похожие замены. Позицию 15 у BeM9-8 и 9 мы варьировали потому, что ранее была продемонстрирована ее роль в связывании с $Na_v1.2$ (439).

Производные BeM9-10 и 11 получены путем пересадки модуля специфичности из Aah II, добавлены шарнирные глицины, а в BeM9-11 дополнительно заменены все а.о., подверженные положительному отбору согласно (1102, 1103), а также существенно различающиеся между тремя группами α-NaTx (см. таблицу 10), и вдобавок укорочена петля между C^2 и C^3. Наконец, BeM9-12 и 13 — результат случайных мутаций при клонировании.

Активность BeM9 и его производных мы тестировали с помощью метода двухэлектродной фиксации потенциала на четырех изоформах Na_v млекопитающих ($rNa_v1.2$, $rNa_v1.4$, $hNa_v1.5$, $mNa_v1.6$) и на канале таракана $BgNa_v1$, экспрессированных в ооцитах *X. laevis* (рисунок 85). Для сравнения активности разных соединений использовали количественную характеристику «эффективность ингибирования инактивации» (см. пояснение в Методах; таблица 43). Замены в положении 15 (у BeM9-8 и 9) или ограниченные замены в модуле специфичности на а.о., характерные для инсектотоксинов или млекотоксинов (BeM9-6 и 7), практически не повлияли на активность BeM9. Введение шарнирных глицинов (BeM9-1) привело к снижению активности, без существенного изменения селективности. Простые замены на гидрофильные а.о. в модуле специфичности (BeM9-2 и 3) вообще привели к неактивным соединениям, что будет учтено при проектировании других производных.

Рисунок 85. Селективность α-NaTx в отношении изоформ Na_v. Приведены репрезентативные записи токов, зарегистрированных в ооцитах *X. laevis* с экспрессией изоформ $Na_v1.1$–1.8, в контроле или в присутствии токсина. Пунктирная линия указывает на нулевой уровень тока. Синие кривые соответствуют записям после приложения 1 мкМ MeuNaTxα-1 (верхний ряд), BeM9 (средний ряд) или BeM9-11 (нижний ряд).



Интересно, что если одиночная замена R60K в С-концевой области (у BeM9-4) привела к существенному снижению эффективности на Na_v млекопитающих, то замена трех консервативных положительно заряженных а.о. (у BeM9-5) вернула широкий профиль активно-

сти. Пересадка модуля специфичности (BeM9-10) тоже не увенчалась успехом, а вот дополнительное введение нескольких других замен и укорочение петли между C^2 и C^3 привело к селективному в отношении Na_v млекопитающих производному (BeM9-11), которое приобрело активность на $Na_v1.2$ (рисунок 85). Одиночная замена в RT-петле (у BeM9-12) привела к увеличению селективности в отношении канала насекомого, а дополнительное введение одного из шарнирных глицинов создало инсектоселективный токсин (BeM9-13).

Таблица 43. Активность BeM9 и его производных на Na_v.

Название	Эффективность ингибирования инактивации				
	$Na_v1.2$	$Na_v1.4$	$Na_v1.5$	$Na_v1.6$	$BgNa_v1$
BeM9	–	0,23	0,46	0,6	1,93
BeM9-1	–	0,04	–	0,17	0,62
BeM9-2	–	–	–	–	–
BeM9-3	–	–	–	–	–
BeM9-4	–	0,09	0,13	0,03	1,48
BeM9-5	–	0,23	0,36	0,16	1,29
BeM9-6	–	0,25	0,48	0,46	2,04
BeM9-7	–	0,36	0,16	0,33	1,02
BeM9-8	–	0,13	0,52	0,36	2,01
BeM9-9	–	0,24	0,33	0,41	1,73
BeM9-10	–	–	–	–	–
BeM9-11	0,27	0,07	–	0,21	–
BeM9-12	–	–	0,05	0,16	1,16
BeM9-13	–	–	–	0,01	0,56

Приведены значения, полученные при концентрации полипептидов 1 мкМ. –, нет активности при 1 мкМ. Показаны усредненные данные трех измерений; SE < 15%.

3.7.4.9. Изучение пространственной структуры α-NaTx

Мы изучили пространственную структуру трех α-NaTx в водном растворе. Нашими объектами стали токсины BeM9 и MeuNaTxα-1 из яда *M. eupeus*, а также Lqq IV из *L. q. quinquestriatus* (см. таблицу 42). BeM9 стал первым α-NaTx с изученной пространственной структурой (см. комментарий в Обзоре литературы) (444, 445), однако как мы увидим далее, теперешний уровень развития спектроскопии ЯМР позволяет обнаружить детали, которые не были доступны исследователям ранее. Структура MeuNaTxα-1 представляет интерес, поскольку это мажорный компонент яда *M. eupeus*; кроме того, для него обнаружена любопытная активность в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов (см. ниже). Наконец, мы выбрали Lqq IV, поскольку отличается уникальным набором белковых мотивов. Структуру MeuNaTxα-1 изучили с использованием рекомбинантного токсина с природным содержанием изотопов, в случае BeM9 получили ^{15}N-меченый образец, а Lqq IV вообще исследовали с использованием двойного мечения изотопами ^{13}C и ^{15}N.

Укладка всех трех токсинов (рисунок 86А) типична для α-NaTx (ср.: рисунок 15) и представлена топологией βαββ: α-спиралью (Y23–T29 у BeM9, N19–K28 у MeuNaTxα-1 и N20–K29 у Lqq IV) и β-листом из трех β-тяжей (R2–Y5, S35–Q39 и A47–L53 у BeM9, R2–Y5, S33–W38 и N44–K50 у MeuNaTxα-1, V2–A8, E33–C37 и C47–P53 у Lqq IV). Кроме того, во всех случаях идентифицированы различные изгибы, стабилизированные водородными связями; у BeM9 имеется миниатюрный духтяжевой β-лист (A7–K8 и C12–V13). Наблюдаются также солевые мостики (между R2 и D55, K8 и E15 у BeM9, между K10 и D9, K27 и D23, E32, а также K28 и E24, E25 у MeuNaTxα-1, между R3 и D54, K11 и D10, K29 и E26, K51 и E33 у Lqq IV), π-катионные взаимодействия (Y5-K43, Y14-K8, Y44-K43 и Y44-R60 у BeM9, Y14-K29 и Y42-K58 у MeuNaTxα-1, Y43-K42 и Y43-R59 у Lqq IV); и выявляется консервативный кластер ароматических а.о. (Y5, Y37, Y44 и W49 у BeM9, Y5, Y35, Y42, W47 и Y49 у MeuNaTxα-1, Y6, Y36, Y43 и W48 у Lqq IV; см. таблицу 44).

В отличие от ранее опубликованной структуры, мы можем определенно приписать *цис*-конфигурацию пептидной связи P9–H10 у BeM9 (рисунок 86Б), что подтверждается сильным ЯЭО между протонами $C^{\alpha}H$ этих а.о. Такая *цис*-пептидная связь служит общей чертой ряда α-подобных токсинов (таблица 44) (434).

3.7.4.10. Анализ структурных особенностей α-NaTx

R60 — особый а.о. в BeM9, представляющий «связующее звено» модуля специфичности (рисунок 86В). Его положение фиксируется π-катионным взаимодействием с Y44, который, в свою очередь, строго позиционируется благодаря π-катионному взаимодействию с K43. Гуанидиновая группа R60, вероятно, слабо гидратирована над и под ее плоскостью (1105), что позволяет гидрофобным боковым цепям V13, Y44 и I61 определять ее положение. В этой конформации R60 связывает карбонилы основной цепи N11, I61 и G63 водородными связями. R60 выступает контроллером скручивания и гибкости С-концевой части основной цепи токсина. Аналогичные соображения были высказаны относительно структуры некоторых других α-NaTx (438, 1106). Замена R60K приводит к существенному изменению активности токсина (производное BeM9-4, см. таблицу 43), поскольку лизин не может сформировать ту же сетку водородных связей, что аргинин, в результате чего происходит перестройка модуля специфичности.

Мы предложили называть структурный мотив, включающий водородные связи остатка аргинина с карбонилами основной цепи (когда число карбонилов более двух), «аргининовой рукой» ввиду его сходства с человеческой рукой: боковая цепь аргинина представляет собой «плечо», гуанидиновая группа — это «ладонь», а водородные связи с карбонилами основной цепи — «пальцы».

Рисунок 86. Пространственная структура и мотивы α-NaTx, исследованных нами. (А) BeM9 (PDB ID: 5MOU), MeuNaTxα-1 (6THI) и Lqq IV (8BO0) показаны в ленточном представлении, обозначения аналогичны рисунку 15. Участки основной цепи модуля специфичности выделены оранжевым. (Б) Для BeM9 показан участок последовательности K8–N11 в скелетном представлении; P9 и H10 показаны стержнями, с атомом водорода пептидной связи. (В) Крупный план модуля специфичности BeM9. Участок последовательности P58–H66 в скелетном представлении. N11 и R60 показаны стержнями. (Г) Крупный план NC/RC-домена Lqq IV. Участок последовательности D9–C13 в скелетном представлении. D9 показан стержнями.

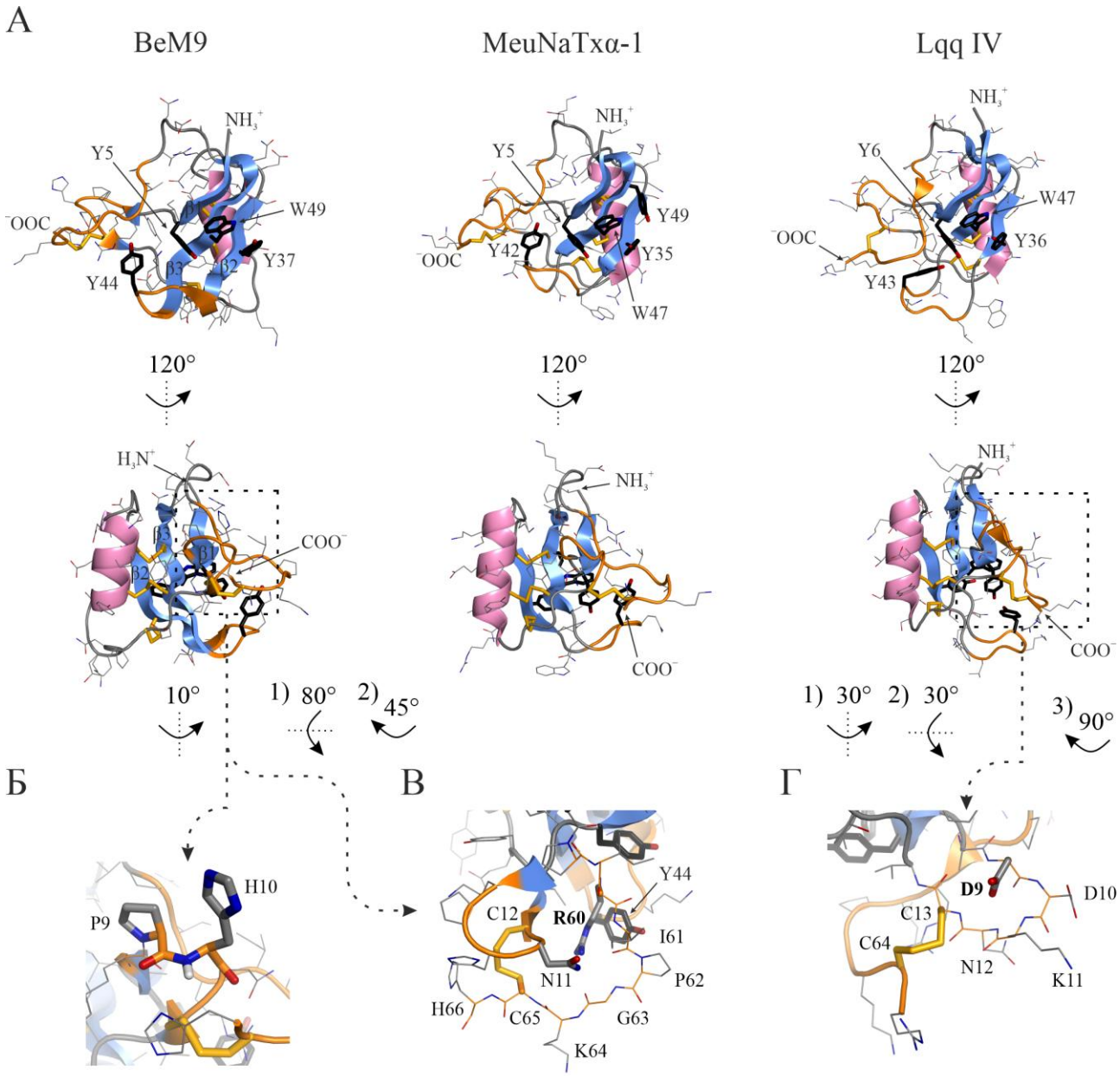


Таблица 44. α-NaTx с изученной пространственной структурой.

Название	UniProt ID	PDB ID	Последовательность 1 10 20 30 40 50 60 65
BeM9	P09981	5MOU	-ARDA**Y**IAK<u>PH</u>NCVYECYNPKGSYCNDLCTENGAESG**Y**CQILGK**Y**GNAC**W**CIQLPDNVPIRIPG--KCH----
MeuNaTxα-5	P86405	2LKB	-ARDA**Y**IAKPHNCVYECFDAFSSYCNGVCTKNGAKSG**Y**CQILGT**Y**GNGC**W**CIALPDNVPIRIPG--KCHR---
BmK M1	P45697	1SN1	-VRDA**Y**IAK<u>PH</u>NCVYECAR--NEYCNDLCTKNGAKSG**Y**CQWVGK**Y**GNGC**W**CIELPDNVPIRVPG--KCHR---
BmK M2	P58488	1CHZ	-VRDA**Y**IAK<u>PH</u>NCVYECAR--NEYCNNLCTKNGAKSG**Y**CQWSGK**Y**GNGC**W**CIELPDNVPIRVPG--KCH----
BmK M7	P59854	1KV0	-VRDG**Y**IAL<u>PH</u>NCAYGCLN--NEYCNNLCTKDGAKIG**Y**CNIVGK**Y**GNAC**W**CIQLPDNVPIRVPG--RCHPA--
Lqq III	P01487	1LQQ	-VRDA**Y**IAKNYNCVYECFR--DSYCNDLCTKNGASSG**Y**CQWAGK**Y**GNAC**W**C**Y**ALPDNVPIRVPG--KCH----
Lqh αIT	P17728	1LQH	-VRDA**Y**IAKNYNCVYECFR--DAYCNELCTKNGASSG**Y**CQWAGK**Y**GNAC**W**C**Y**ALPDNVPIRVPG--KCHRK--
BmK αIT1	Q9GQW3	2E0H	-VRDA**Y**IAQ<u>NY</u>NCVYHCAR--DAYCNELCTKNGAKSGSCPYLGE**H**KFAC**Y**CKDLPDNVPIRVPG--KCHRR--
Lqh III	P56678	1BMR	-VRDG**Y**IAQPENCVYHCFP-GSSGCDTLCKEKGGTSG**H**CGFKVG**H**GLAC**W**CNALPDNVGIIVEG-EKCHS---
BmK M4	P58328	1SN4	-VRDA**Y**IAK<u>PE</u>NCVYHCAG--NEGCNKLCTDNGAESG**Y**CQWGGR**Y**GNAC**W**CIKLPDDVPIRVPG--KCH----
BmK M10	O61705	2KBK	-VRDA**Y**IAK<u>PE</u>NCVYECGI--TQDCNKLCTENGAESG**Y**CQWGGK**Y**GNAC**W**CIKLPDSVPIRVPG--KCQR---
Lqq IV	P01489	8BO0	GVRDA**Y**IADDKNCVYTCGS--NSYCNTECTKNGAESG**Y**CQWLGK**Y**GNAC**W**CIKLPDKVPIRIPG--KCR----
OD1	P84646	4HHF	GVRDA**Y**IADDKNCVYTCAS--NGYCNTECTKNGAESG**Y**CQWIGR**Y**GNAC**W**CIKLPDEVPIRIPG--KCR----
BmK M8	P54135	1SNB	-GRDA**Y**IADSENCTYFCGS--NPYCNDVCTENGAKSG**Y**CQWAGR**Y**GNAC**Y**CIDLPASERIKEPG--KCG----
MeuNaTxα-1	P86408	6THI	-VRDG**Y**IADDKNCAYFCGR--NAYCDEECKKKGAESG**Y**CQWAGQ**Y**GNAC**W**C**Y**KLPDKVPIKVSG--KCNGR--
BmKαTx11	Q9NJC7	2KBH	-VKDG**Y**IADDRNCPYFCGR--NAYCDGECKKNRAESG**Y**CQWASK**Y**GNAC**W**C**Y**KLPDDARIMKPG--RCNGG--
Aah II	P01484	1PTX	-VKDG**Y**IVDDVNCTYFCGR--NAYCNEECTKLKGESG**Y**CQWASP**Y**GNAC**Y**C**Y**KLPDHVRTKGPG--RCHGR--
BTN	P60277	1DQ7	-GEDG**Y**IADGDNCTYICTF--NNYCHALCTDKKGDSGACDWWVP**Y**GVVC**W**CEDLPTPVPIRGSG--KCR----
Ts III	P01496	5CY0	-KKDG**Y**PVE<u>YD</u>NCAYICWNYDNAYCDKLCKDKKADSG**Y**CYWVH---ILC**Y**C**Y**GLPDSEPTKTNG--KCKSGKK
CsE-V	P46066	1NRA	-KKDG**Y**PVDSGNCKYECLK--DDYCNDLCLERKADKG**Y**CYWGK---VSC**Y**C**Y**GLPDNSPTKTSG--KCNPA--
Куртоксин	P58910	1T1T	-KIDG**Y**PVDYWNCKRICW-YNNKYCNDLCKGLKADSG**Y**CWGWT---LSC**Y**CQGLPDNARIKRSG--RCRA---
CsE-v5	P58779	1I6F	--KDG**Y**PVDSKGCKLSCVA--NNYCDNQCKMKKASGG**H**CYA-----MSC**Y**CEGLPENAKVSDSATNIC-----

Нумерация сверху относится к BeM9. Желтым фоном выделены остатки цистеина, серым — модуль специфичности. А.о., участвующие в структурных мотивах, обозначены: D8 и K/R60, образующие гнездо и нишу, затенены красным и голубым цветом соответственно; а.о., формирующие ароматический кластер, выделены полужирным шрифтом; а.о. 9 и 10, образующие *цис*-пептидную связь, отмечены двойным подчеркиванием.

Такие мотивы часто встречаются в белках; a.o., которые образуют водородные связи с аргинином, могут располагаться в различных частях первичной структуры, но они сближаются вместе с помощью гуанидиновой группы. Аргининовую руку можно рассматривать как своеобразную подгруппу т.н. мотива «ниши» (1107). В случае BeM9 это ниша класса A (т.е. участвующие карбонилы принадлежат i и i + 2 a.o., I61 и G63) ββ-мотива (φ и ψ-углы i + 1 и i + 2 остатков P62 и G63 попадают в область β-структуры). α-NaTx содержат аргининовые руки, включающие консервативный остаток (R60 у BeM9; см. таблицу 44) с разным количеством «пальцев»: от трех у BeM9 до пяти у BmK αIT1 (PDB ID: 2E0H; в данном случае пространственное расположение аргинина не ограничено ароматическим остатком). В структуре MeuNaTxα-1 аргининовая рука отсутствует, а ниша вместо этого содержит остаток лизина (K58). Из-за более короткой цепи и меньшего количества атомов водорода, присоединенных к электроотрицательным атомам, лизин не может полностью заменить аргинин в нише; эта часть токсина у MeuNaTxα-1 организована иначе, чем у BeM9.

В модуле специфичности MeuNaTxα-1 мы обнаружили другой мотив. Боковая цепь D8 служит акцептором водородных связей от амидных групп основной цепи K10 и C12. Такой тип взаимодействия называется мотивом «гнезда», в котором амидные группы основной цепи из близко расположенных a.o. образуют своеобразное гнездо со сравнительно большим частичным положительным зарядом из-за параллельной ориентации диполей.

В гнезде могут размещаться различные анионы, в нашем случае — карбоксильная группа боковой цепи D8. Точнее, это классическое гнездо типа i, i + 2 (т.е. участвующие амиды принадлежат i и i + 2 a.o., K10 и C12) RL (φ-углы i и i + 1 остатков K10 и N11 отрицательный и положительный соответственно) в сочетании с β-изгибом первого типа (1108). Аналогичный мотив гнезда обнаружен у нескольких других α-NaTx (см. таблицу 44), и в каждом случае он образован остатком аспартата в эквивалентном положении и соответствующими атомами основной цепи. D8 высококонсервативен среди млекотоксинов, но его также можно обнаружить в α-подобных токсинах (помимо MeuNaTxα-1, это OD1 и CsE-V) и инсектотоксинах (CsE-v5; см. таблицу 44). По-видимому, мотив гнезда сам по себе не определяет селективность токсина. Важно отметить, что D8 входит в мотив гнезда во всех α-NaTx, где он присутствует, за исключением куртоксина, который вообще имеет по-другому структурированный модуль специфичности.

Аналогичным образом, если в последовательности присутствует D8, в структуре токсина никогда не обнаруживается *цис*-пептидная связь. «Непролиновая» (т.е. не образованная аминогруппой пролина) *цис*-пептидная связь была обнаружена в нескольких α-подобных токсинах, а также в инсектотоксинах и млекотоксинах. Как и в случае с белковыми мотивами, не наблюдается простого соответствия между *цис*/*транс*-конфигурацией пептидной свя-

зи 9–10 и селективностью токсина. Однако взаимное исключение D8 и *цис*-конфигурации пептидной связи 9–10 легко объяснить. Это связано с необходимой специфической ориентацией диполей пептидных связей для формирования мотива гнезда, что исключает *цис*-конфигурацию. Интересно, что D8 заменен на K8 у некоторых инсектотоксинов и α-подобных токсинов, например у BeM9. Эта замена приводит к заметной реорганизации модуля специфичности из-за потери мотива гнезда и установления π-катионного контакта между K8 и Y14. С другой стороны, в MeuNaTxα-1 Y14 образует другой π-катионный контакт — с K29. У модуля специфичности MeuNaTxα-1 уникальны конформация и состав мотивов по сравнению с другими α-NaTx с известной пространственной структурой. Помимо мотива ниши с остатком лизина в С-концевой части токсина и мотива гнезда в RT-петле, в организацию модуля специфичности вносят вклад и другие внутримолекулярные контакты. Это: (а) π-катионный контакт между центральным а.о. ниши и кончиком петли β2-β3 (Y42-K58); (б) этот контакт усиливается за счет водородной связи между боковыми цепями S60 и Q41. Фактически, все три части модуля специфичности, какими бы далекими они ни были по аминокислотной последовательности, объединяются в трехмерной структуре токсина благодаря его компактной укладке и специфическим белковым мотивам.

Аминокислотная последовательность модуля специфичности Lqq IV уникальна (таблица 44). С одной стороны, он имеет характерный дублет остатков аспарагиновой кислоты в RT-петле и соответственно мотив гнезда (боковая цепь D9 формирует водородные связи с амидами K11 и C13; рисунок 86Г). С другой стороны, он имеет мотив аргининовой руки в С-концевой области (R59). Среди α-NaTx с известной пространственной структурой такое сочетание встречается только у OD1. Аминокислотные последовательности Lqq IV и OD1 очень похожи (только пять замен; см. таблицу 44). Пространственная структура OD1 изучена (473); однако это было сделано с помощью PCA, а наш опыт свидетельствует против использования этого метода для небольших белков. В частности, кончик шпильки β2-β3 отогнут от остальной части модуля специфичности в структуре OD1, чего не наблюдается у других α-NaTx. Поэтому вместо того, чтобы строить модель Lqq IV по гомологии с OD1, мы решили изучить его структуру в растворе с помощью спектроскопии ЯМР.

У Lqq IV мы идентифицировали еще один мотив аргининовой руки, образованный боковой цепью R3, который может образовывать водородные связи с карбонилами основной цепи L52, P53 и V56, а также солевой мостик с D54. Наличие водородных связей подтверждается тем, что боковая цепь R3 фиксирована, а ее гуанидиновая группа дает узкий пик в спектре HSQC, в отличие от всех других остатков аргинина. Кроме того, мы обнаружили водородную связь между боковой цепью D4 и индольным NH W48 (эта группа не подвержена водородно-дейтериевому обмену в течение нескольких часов). Важно отметить, что все час-

ти молекулы, составляющие модуль специфичности, т.е. RT-петля, С-конец и петля β2-β3, расположены близко друг к другу и взаимодействуют. В частности, Y43 на кончике петли β2-β3 формирует π-катионное взаимодействие с R59 на С-конце (аналогичный контакт Y44–R60 обнаружен у BeM9, см. рисунок 86B). Это резко контрастирует с упомянутой выше рентгеновской структурой OD1; мы полагаем, что различие обусловлено артефактом кристаллизации.

Внимательное рассмотрение структуры α-NaTx позволяет выделить значительно больше характерных структурных мотивов, нежели представлено в литературе. В частности, консервативный остаток аспарагина / аспарагиновой кислоты (N23 у Aah II), расположенный в α-спирали, представляется «кэпирующим» для β-листа, поскольку образует водородные связи с основной цепью соседнего β-тяжа (β2). Аналогично ведет себя N19 (у тех токсинов, где он есть).

Консервативный N11 (по нумерации Aah II) формирует водородные связи с основной цепью (амидные водороды связаны с карбонилами G59, P60, G61 у Aah II; I61, G63, K64 у BeM9; V60 и K63 у Lqh αIT). В данном случае мы наблюдаем варианты ниши, место катиона оказывается занято амидными водородами боковой цепи N11. Конформации ниш различаются у млекотоксина Aah II, α-подобного BeM9 и инсектотоксина Lqh αIT: P60 у Aah II принимает типичную β-структурную конформацию (двугранные углы: $\varphi \approx -65°$ и $\psi \approx 150°$), P62 у BeM9 и P61 у Lqh αIT находятся в конформации, промежуточной между α-спиралью и β-структурой ($\varphi \approx -70°$, $\psi \approx 65°$ и $\varphi \approx -70°$, $\psi \approx 100°$, соответственно); G61 у Aah II и принимает необычную конформацию ($\varphi \approx 110°$ и $\psi \approx 130°$), в то время как G63 у BeM9 находится в β-структурной конформации ($\varphi \approx -140°$ и $\psi \approx 180°$), а G64 у Lqh αIT, согласно опубликованным данным, принимает, по крайней мере, две возможные конформации ($\varphi \approx 170°$, $\psi \approx -100°$ и $\varphi \approx -170°$, $\psi \approx -100°$). В результате в формировании ниши у токсинов с разной селективностью принимают участие карбонилы различных а.о. Кроме того, карбонилы в нише BeM9 оказываются ориентированы так, что реализуется более выгодное взаимодействие с другим донором водородных связей, R60.

В β3 имеется консервативный «β-выступ» (англ. β-bulge), образуемый остатком K50 у Aah II, Q52 у BeM9 или A51 у Lqh αIT. По номенклатуре Дж. Ричардсон (1109) это вариант G1 β-выступа, указанные а.о. (обозначаются $G1_1$) находятся в конформации левой α-спирали (двугранные углы: $\varphi \approx 55°$ и $\psi \approx 45°$ у K50 в Aah II; $\varphi \approx 65°$ и $\psi \approx 45°$ у Q52 в BeM9; $\varphi \approx 40°$ и $\psi \approx 50°$ у A51 в Lqh αIT). Следующие а.о. того же β3-тяжа ($G1_2$) находятся в несколько искаженной β-структурной конформации ($\varphi \approx -75°$ и $\psi \approx 155°$ у L51 в Aah II; $\varphi \approx -85°$ и $\psi \approx 135°$ у L53 в BeM9; $\varphi \approx -80°$ и $\psi \approx 140°$ у L52 в Lqh αIT). Остаток R/K2, расположенный в соседнем β1-тяже, формирует водородные связи с β3 в области β-выступа (обозначается X). При

этом X образует одну водородную связь с $G1_1$ и две — с $G1_2$. Как правило, в позиции $G1_1$ в белках находится глицин, поскольку для него конформация левой α-спирали является легко реализуемой, однако в α-NaTx это не так. По-видимому, конформация β-выступа контролируется присутствием в позиции X+1 инвариантного остатка D3, образующего водородную связь с амидом $G1_1$: близость отрицательного заряда препятствует обычной для β-структуры ориентации карбонила $G1_1$. В случае остатка лизина (K50 у Aah II) β-выступ объяснить еще проще: если бы этот а.о. сохранял конформацию регулярного β-листа, он был бы расположен внутри гидрофобного ядра молекулы и не смог образовать солевой мостик с E32. Такой же мотив обнаружен в структуре куртоксина из яда *P. transvaalicus*, модулятора Ca_v каналов T-типа (535, 1110). Интересно, что в этом случае в позиции $G1_1$ находится классический глицин, а остатком X+1 так же выступает аспартат.

3.7.4.11. Значение исследования α-NaTx

α-NaTx — чуть ли не важнейшие лиганды Na_v, о чем подробно говорилось в соответствующих разделах Обзора литературы. Несмотря на богатую литературу и наличие двух структур комплексов α-NaTx с Na_v, наше понмание структурно-функциональных отношений в этих объектах ограничено. В настоящее время точно предсказать селективность α-NaTx по аминокислотной последовательности невозможно. Проведенные исследования приближают нас к решению этой проблемы. Кажется очевидным, что главный вклад в селективность α-NaTx делает их модуль специфичности. Мы выделили этот участок молекулы, основываясь на пристальном рассмотрении структурных особенностей α-NaTx (1111). Теперь же известно, что именно модуль специфичности формирует контакты с Na_v (418, 451). Наши работы убедительно показывают, что манипуляции с модулем специфичности позволяют изменять селективность α-NaTx, иногда направленно (см. таблицы 42 и 43). Достаточно обоснованным представляется в связи с этим подход, использованный нами в случае блокаторов K^+ каналов (см. соответствующий раздел выше), а именно — компьютерное моделирование комплексов токсинов с различными каналами по гомологии и внесение аминокислотных замен в модуль специфичности для увелечения селективности в отношении выбранных изоформ Na_v.

Неожиданно оказалось, что α-NaTx черезвычайно любопытны в структурном отношении — они буквально насыщены разнообразными белковыми мотивами. Пристальное рассмотрение структуры нескольких α-NaTx, выполненное нами, обнаружило ведущую роль мотивов типа ниши и гнезда в придании определенной конформации модулю специфичности (рисунок 86). Это усложняет задачу рационального дизайна селективных α-NaTx, поскольку теперь приходится учитывать возможность достатчно серьезных структурных перестроек при внесении аминокислотных замен, если они затрагивают белковые мотивы. Ввиду суще-

ственно меньшего объема данных об активности α-NaTx в сравнении с KTx, а также в силу сложности предсказания структуры петлевых участков, я позволю себе скептический взгляд на применимость AlphaFold и похожих подходов к рациональному дизайну селективных α-NaTx.

Отдельно отметим также биотехнологический потенциал инсектотоксинов, которые могут послужить разработке новых пестицидов (420). Здесь уместны рассуждения, уже приведенные выше для β/δ-агатоксинов.

Наконец, действие α-NaTx напоминает эффект некоторых мутаций Na_v, обнаруженных у людей с наследственными заболеваниями. К примеру, признаком ряда эпилептических расстройств служит повышенная активность $Na_v1.2$ (мутации с приобретением функции), характеризующаяся замедлением быстрой инактивации, ускорением восстановления из инактивированного состояния или постоянными неинактивирующимися токами (1112, 1113). Аналогичным эффектом обладают мутации генов $Na_v1.4$ и 1.7, приводящие к миотонии или параличу (1114, 1115) и болевому синдрому (1116) соответственно. Будущие исследования покажут, насколько эти сходства поверностны или же отражают общность молекулярных механизмов, насколько α-NaTx хороши как инструменты для моделирования таких состояний.

Результаты нашего исследования α-NaTx опубликованы (1111, 1117-1121).

Неожиданно оказалось, что указанными областями круг применимости α-NaTx в исследованиях не ограничивается, о новой области речь пойдет в следующем разделе.

3.7.5. Воздействие α-NaTx на внутриклеточные сигнальные каскады

В ряде случаев боль связана с повышением чувствительности (сенситизацией) афферентов. Это явление опосредовано индукцией сигнальных каскадов в нейронах, в результате либо изменяется уровень экспрессии генов рецепторов или ионных каналов, либо происходит модификация самих белков, и изменяется их активность (1122, 1123). Мы решили изучить воздействие яда паукообразных на внутриклеточные сигнальные каскады чувствительных нейронов. Эту работу мы выполнили в сотрудничестве с лабораторией Т. Хухо в Университетской больнице Кёльна. Дело в том, что наши немецкие коллеги разработали уникальную методику анализа сигнальных путей в чувствительных нейронах, основанную на HCS-микроскопии (1124).

Выделенные нейроны спинальных ганглиев подвергают воздействию исследуемых веществ, после чего проводят иммуноцитологический анализ: конкретнее, в данном случае оценивают изменение степени фосфорилирования классических MAP-киназ ERK1/2 (pERK1/2) и/или регуляторной субъединицы протеинкиназы А типа II-α (pRII). Окрашенные

культуры переносят в микроскоп, который автоматически собирает большое количество цифровых изображений (96 лунок × 4 цветовых канала × 48 полей на лунку = 18432 изображений с одного 96-луночного планшета за порядка 4–5 ч). Полученные данные анализируют с помощью специального программного обеспечения и разработанных алгоритмов для выделения нужных сигналов (1125, 1126). В результате любое измерение отличается высокой степенью достоверности и проводится для тысяч и миллионов клеток. Столь большие наборы данных позволяют выполнять очень чувствительный и количественный анализ этой весьма разнородной клеточной культуры.

3.7.5.1. Скрининг коллекции ядов с помощью HCS

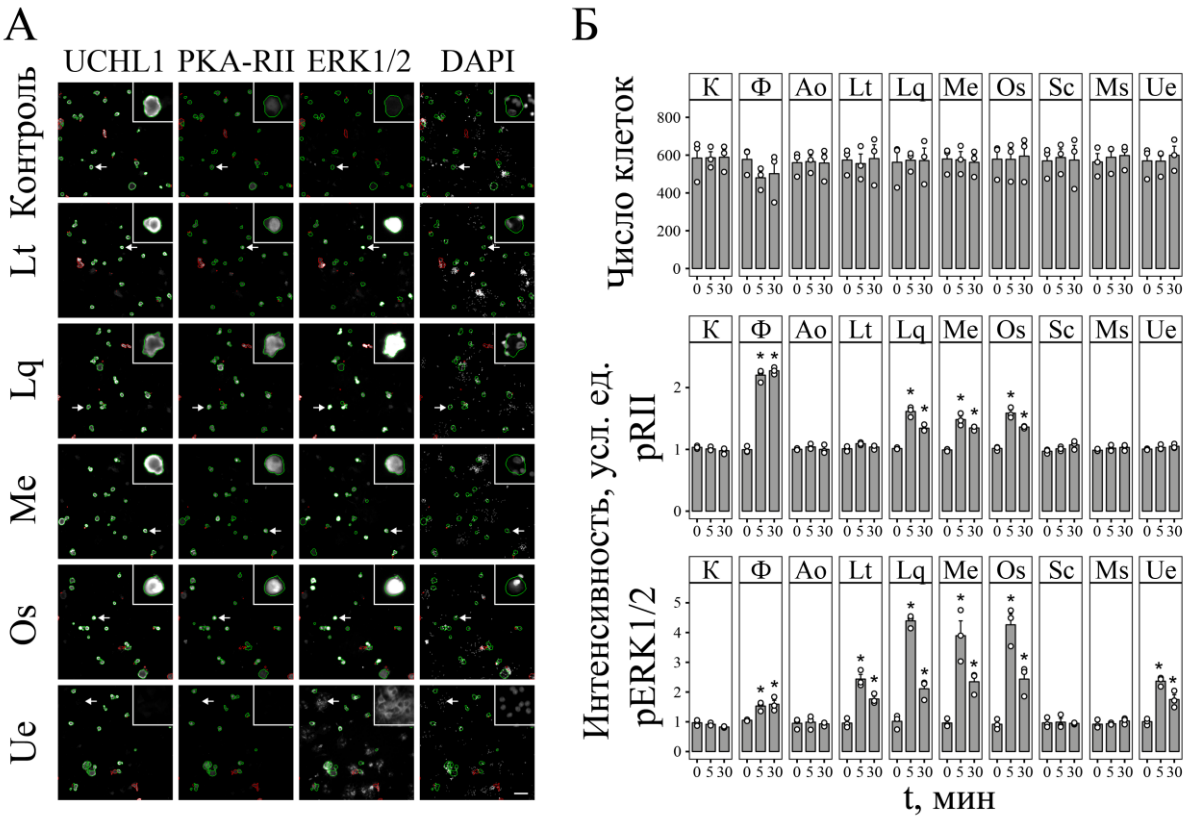
Вначале мы провели скрининг нашей коллекции ядов. Мы выбрали продолжительность стимуляции культуры нейронов ядами 5 и 30 мин, что совпадает с максимумами кинетики передачи сигналов PKA и ERK1/2 соответственно в ответ на хорошо известные сенситизирующие соединения, такие как серотонин и форсколин (1127). Клетки фиксировали и окрашивали DAPI (метит клеточные ядра), иммунофлуоресцентно окрашивали на маркер UCHL1 для идентификации нейронов, а также на фосфорилированные pRII и pERK1/2. Затем мы применяли HCS-микроскопию для получения десятков тысяч изображений и идентифицировали нейроны, используя автоматический анализ. Мы измеряли интенсивность флуоресценции, соответствующей активированным (фосфорилированным) pRII и pERK1/2 (рисунок 87). Активатор аденилатциклазы форсколин (10 мкМ) использовался в качестве положительного контроля. Он активирует PKA-II в анализе на pRII (EC_{50} = 1,7 мкМ), что приводит к последующей активности ERK1/2 в нейронах спинальных ганглиев (1127). Из протестированных ядов лишь немногие вызывали активацию PKA-II и/или ERK1/2. Яд каракурта *L. tredecimguttatus* индуцировал активность ERK1/2. Все протестированные яды скорпионов вызывали сильное увеличение активности как ERK1/2, так и PKA-II со схожей кинетикой и амплитудой. Для дальнейшего исследования мы выбрали яд *M. eupeus*.

3.7.5.2. Очистка активатора PKA-II и ERK1/2 из яда *M. eupeus*

Яд *M. eupeus* разделили, как подробно описывалось выше («Разделение яда и очистка индивидуальных KTx», рисунки 42A и 55A). Тестирование фракций, полученных с использованием гель-фильтрации, показало, что пептидная фракция II приводила к наиболее сильной активации PKA-II и ERK1/2. При дальнейшем разделении фракции II с помощью ОФ-ВЭЖХ три субфракции активировали сигналинг. Эти субфракции подвергли третьему этапу разделения с помощью ОФ-ВЭЖХ (использовали элюент с изопропанолом), что привело к идентификации трех активных индивидуальных токсинов. Секвенирование по Эдману и МС

анализ показали, что токсин из одной субфракции соответствует MeuNaTxα-1 (см. аминокислотную последовательность в таблице 42, описание пространственной структуры в разделе «Изучение пространственной структуры α-NaTx» выше). Рекомбинантный MeuNaTxα-1 (описание см. в разделе «Получение рекомбинантных α-NaTx и их производных») обладал активностью, идентичной природному токсину.

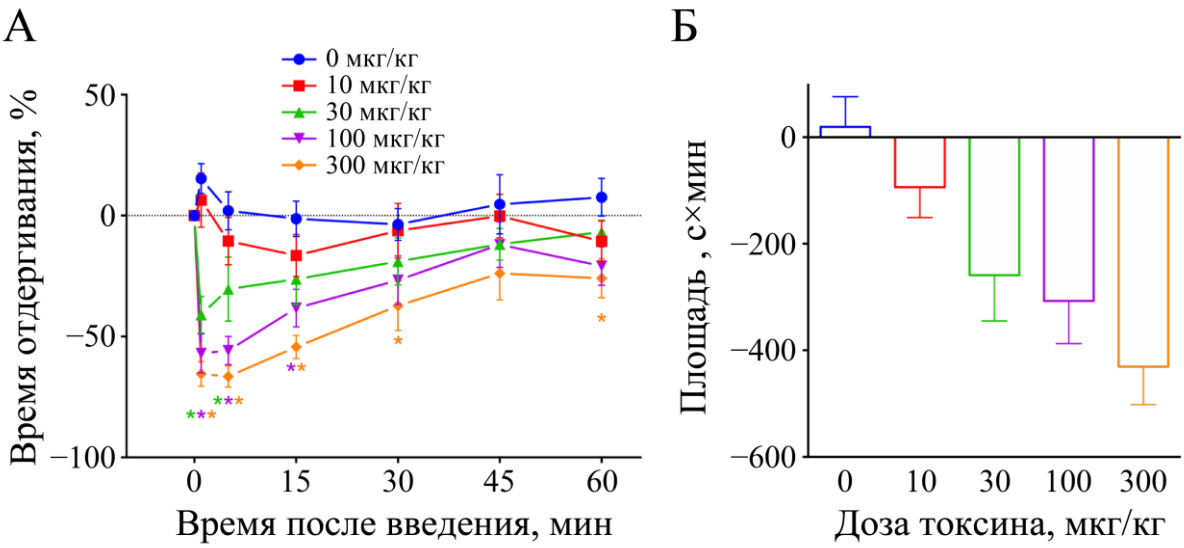
Рисунок 87. Яд паукообразных активирует внутриклеточные сигнальные системы в чувствительных нейронах. (А) Изображения выделенных нейронов спинальных ганглиев крыс, стимулированных в течение 5 мин различными ядами. Нейроны, обведенные зеленым или красным, обозначают автоматически выбранные или отклоненные объекты соответственно. Белыми стрелками указаны области, представленные в увеличении. Масштабная линейка, 100 мкм. (Б) Средняя интенсивность флуоресценции для нестимулированных и стимулированных ядом (100 мкг/мл) нейронов, нормализованная по отношению к значению на начало эксперимента. К, отрицательный контроль, т.е. без добавления яда; Ф, форсколин (10 мкМ); Ao, яд *A. orientalis*; Lt, *L. tredecimguttatus*; Lq, *L. quinquestriatus*; Me, *M. eupeus*; Os, *O. scrobiculosus*; Sc, *Scolopendra cingulata* (кольчатая сколопендра); Ms, *Metridium senile*; Ue, *Urticina eques* (две актинии). Результаты представлены как среднее ± SE; n = 3; более 1000 нейронов на измерение; двухфакторный дисперсионный анализ с тестом Бонферрони; **p* < 0,001.



3.7.5.3. MeuNaTxα-1 вызывает тепловую гипералгезию

Вначале мы оценили токсичность рекомбинантного MeuNaTxα-1 на мышах. При подкожном введении значение $ЛД_{50}$ составило ≈6 мг/кг. Затем сублетальные дозы MeuNaTxα-1 (10–300 мкг/кг) вводили мышам внутрикожно в хвост и оценивали динамику болевой чувствительности в тесте отдергивания хвоста в горячей бане. MeuNaTxα-1 вызывал дозозависимую тепловую гипералгезию продолжительностью 30–45 мин (рисунок 88).

Рисунок 88. MeuNaTxα-1 вызывает тепловую гипералгезию у мышей. (А) При внутрикожном введении 10–300 мкг/кг MeuNaTxα-1 уменьшается время отдергивания хвоста в тесте с горячей водой, *p < 0,05. (Б) Площадь под кривой как интегральная характеристика гипералгезии в зависимости от дозы MeuNaTxα-1. Результаты представлены как среднее ± SE, n = 10.



3.7.5.4. MeuNaTxα-1 активирует сигнальные каскады, воздействуя на Na_v

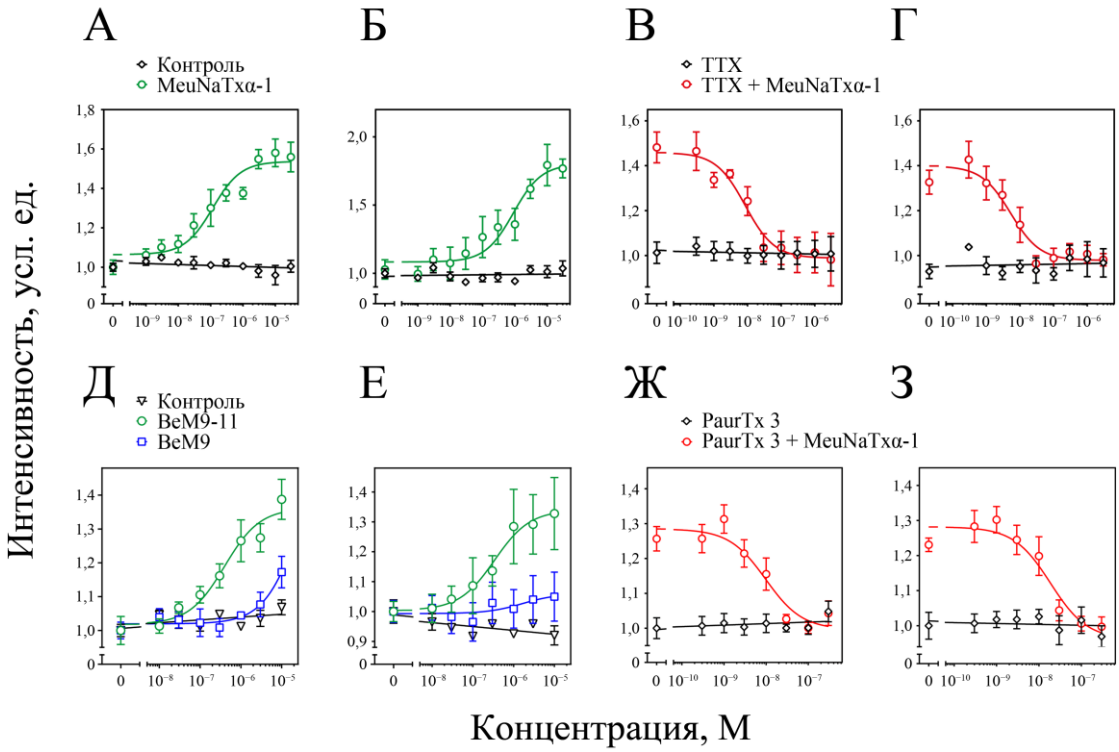
Индукция активности PKA-II и ERK1/2 под действием MeuNaTxα-1 оказалась существенно выше в нейронах новорожденных крыс (P2–P4). Наблюдали ярко выраженную зависимость от дозы, значения EC_{50} составляли ≈120 нМ для PKA-II и ≈900 нМ для ERK1/2 (рисунок 89А, Б). Предварительное приложение к нейронам TTX в течение 5 мин дозозависимо снижало эффективность MeuNaTxα-1 (рисунок 89В, Г). Значения EC_{50} составили 5–10 нМ; эти концентрации достаточны для блокирования TTX-чувствительных изоформ Na_v1.1–1.4, 1.6 и 1.7, но не TTX-устойчивых изоформ Na_v1.5, 1.8 или 1.9 (1056).

Чтобы сузить список потенциальных мишеней MeuNaTxα-1 в нейронах, опосредующих активацию внутриклеточной передачи сигналов, мы использовали другие α-NaTx с известным профилем селективности: BeM9 и BeM9-11 (см. рисунок 85 и таблицу 43). BeM9 не был активен, а BeM9-11 эффективно стимулировал сигналинг (рисунок 89Д, Е). Сравнение

селективности трех токсинов (рисунок 85) показывает, что способность индуцировать внутриклеточную передачу сигналов коррелирует только с их активностью в отношении $Na_v1.2$.

Вдобавок мы использовали токсин PaurTx 3 из яда паука *P. scrofa*, селективно ингибирующий $Na_v1.2$ (381) (см. Обзор литературы, раздел «Ингибиторы активации Na_v из яда пауков»; аминокислотная последовательность приведена в таблице 8). Предварительное приложение к нейронам PaurTx 3 в течение 10 мин дозозависимо снижало эффективность MeuNaTxα-1, значения IC_{50} составили 10–20 нМ (рисунок 89Ж, З), что указывает именно на $Na_v1.2$ как потенциальную мишень, поскольку другие изоформы требуют более высокие концентрации PaurTx 3.

Рисунок 89. MeuNaTxα-1 активирует внутриклеточные сигнальные каскады посредством Na_v. (А, Б) Зависимость интенсивности сигналов pRII (А) и pERK1/2 (Б) в нейронах новорожденных крыс от концентрации MeuNaTxα-1. (В, Г) Зависимость интенсивности сигналов pRII (В) и pERK1/2 (Г) при стимуляции MeuNaTxα-1 (3 мкМ) от концентрации предварительно приложенного TTX. Результаты представлены как среднее ± SE; n = 3; более 1000 нейронов на измерение; двухфакторный дисперсионный анализ с тестом Бонферрони; $*p < 0{,}05$. (Д, Е) Зависимость интенсивности сигналов pRII (Д) и pERK1/2 (Е) от концентрации BeM9 и BeM9-11. (Ж, З) Зависимость интенсивности сигналов pRII (Ж) и pERK1/2 (З) при стимуляции MeuNaTxα-1 (3 мкМ) от концентрации предварительно приложенного PaurTx 3.



3.7.5.5. Активация PKA-II под действием MeuNaTxα-1 требует входа Ca^{2+}

Хелатирование внеклеточного Ca^{2+} с помощью ЭГТА полностью устраняло активность MeuNaTxα-1 в отношении PKA-II. Мы также использовали хелатор ацетоксиметиловый эфир BAPTA (BAPTA-AM), проникающий внутрь клеток. В присутствии него MeuNaTxα-1 по-прежнему активировал PKA-II, что указывает на зависимость этого процесса от локального притока Ca^{2+} через ионные каналы плазматической мембраны и отсутствие роли внутриклеточных депо.

3.7.5.6. α-NaTx могут вызывать острую боль или повышать чувствительность ноцицепторов

Известно, что некоторые токсины скорпионов вызывают острую боль, в частности такие α-NaTx как OD1 (1128), BmK M1 (588) и CvIV4 (589), которые воздействуют на $Na_v1.7$ (см. про роль этой изоформы в болевых ощущениях в Обзоре литературы, раздел «Болевые синдромы и анальгетики»). Насколько нам известно, MeuNaTxα-1 из *M. eupeus* является первым токсином, полученным из яда скорпиона, который проявляет активность в виде индукции внутриклеточных сигналов в периферических чувствительных нейронах и тем самым сенситизирует их и вызывает тепловую гипералгезию, а не острую боль. α-NaTx из яда *M. martensii*, близкого родственника *M. eupeus*, названный BmK NT2, индуцировал приток Ca^{2+} и фосфорилирование ERK1/2 в нейронах неокортекса. Подобно MeuNaTxα-1, активность BmK NT2 ингибировалась TTX, что подчеркивает зависимость от Na_v (1129).

Таким образом, мы предполагаем, что посредством активирующего действия на Na_v MeuNaTxα-1 деполяризует чувствительные нейроны, что приводит к притоку Ca^{2+} через Ca_v с последующей активацией киназных каскадов. Потребуются дальнейшие эксперименты, чтобы изучить детали молекулярного механизма того, как именно деполяризация приводит к активации киназ. Но уже сейчас — в результате использования токсинов паукообразных как молекулярных инструментов исследования — мы с уверенностью можем предполагать ведущую роль изоформы $Na_v1.2$ в наблюдаемых эффектах. Наши данные, представленные здесь, опубликованы (1130).

3.8. ω-Lsp-IA — уникальный модулятор Ca^{2+} каналов

Ca_v — универсальные «сопрягатели» электрических явлений на клеточных мембранах и внутриклеточных сигнальных систем. Их принципиальное значение в процессах мышечного сокращения и нейропередачи, а также в развитии ряда заболеваний обусловило немалый интерес к этим объектам, в том числе со стороны токсинологов. Приоритет в открытии и изучении токсинов паукообразных, воздействующих на Ca^{2+} каналы, почти безраздельно у М. Адамса (США; см. Обзор литературы, раздел «ω-Агатоксины»). В сотрудничестве с лабораторией О.А. Крышталя (Институт физиологии НАНУ) мы озарактеризовали новый модулятор Ca^{2+} каналов млекопитающих, очищенный из яда паука *A. marikovskyi* (Lycosidae). Отметим здесь, что вид *A. marikovskyi* описан только в 2013 г. (1131), до этого в литературе мы обозначали его по-разному: *Geolycosa* sp., *Geolycosa* sp. A267TDLS2-KZARNA, Lycosidae sp. AAV-2007, *Lycosa kazakhstanicus*. В настоящее время для унификации все записи в публичных базах данных содержат упоминание *A. marikovskyi* (NCBI/UniProt taxon identifier: 2066572), предыдущие названия могут указываться как синонимичные.

Три стадии разделения яда *A. marikovskyi* (1132) позволили очистить компонент, который ингибировал Ca^{2+} каналы P-типа в клетках Пуркинье мозжечка крыс. Этим компонентом оказался полипептид, названный нами ω-Lsp-IA. Схема установления полной аминокислотной последовательности ω-Lsp-IA (UniProt ID: P85079; таблица 45) изображена на рисунке 43 и включала секвенирование по Эдману и селективный гидролиз эндопротеиназой Asp-N. Последний С-концевой а.о. идентифицировали по разнице измеренной Мм С-концевого фрагмента (4571,7 Да) и рассчитанной по установленной с помощью деградации по Эдману последовательности (4385,2 Да). Разность (186,5 Да) соответствует остатку триптофана со свободной карбоксильной группой, т.е. без С-концевого амидирования. Последовательность ω-Lsp-IA подтверждается транскриптомными данными (GenBank ID: EF187331).

Шесть из восьми остатков цистеина ω-Lsp-IA расположены в соответствии с мотивом цистинового узла, а два других — так, что формируется мотив ESM. Таким образом, с точки зрения укладки перед нами типичный представитель токсинов пауков с восемью остатками цистеина. Однако при этом аминокислотная последовательность ω-Lsp-IA уникальна и не обнаруживает близкого сходства с другими полипептидами, некоторое сходство имеется с PnTx3-5 из яда *Ph. nigriventer* (P81791; таблица 45), молекулярная мишень которого неизвестна [бразильские коллеги предполагают, что это Ca^{2+} каналы L-типа; см. также комментарий в Обзоре литературы, раздел «Токсины, воздействующие на терморецепторы (каналы TRPV1)»].

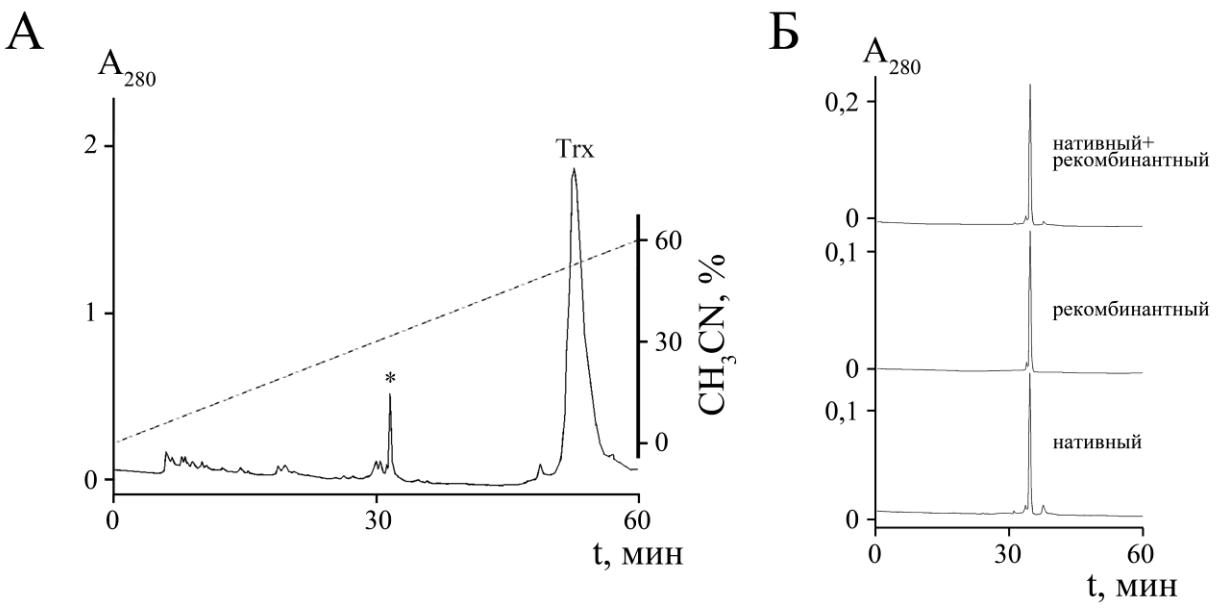
Таблица 45. Аминокислотные последовательности ω-Lsp-IA и PnTx3-5.

Источник	Название пептида	UniProt ID	Последовательность
			1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 47
A. marikovskyi	ω-Lsp-IA	P85079	EKSCITWRNSCMHNDKGCCFPWSCVCWSQTVSRNSSRKEKKCQCRLW
Ph. nigriventer	PnTx3-5	P81791	--GCIGRNESCKFDRHGCCWPWSCSCWNKEGQPES---DVWCECSLKIGK

Сверху нумерация для ω-Lsp-IA. А.о. раскрашены в соответсвии со свойствами (как в таблице 8). С-Концевой дипептид -GK у PnTx3-5 скорей всего преобразуется в С-концевую амидную группу (пояснения в Обзоре литературы, раздел «Биосинтез токсинов паукообразных»).

Мы получили рекомбинантный ω-Lsp-IA в *E. coli* Origami B(DE3) с Trx в качестве партнера, для расщепления гибридного белка использовали энтеропептидазу. Токсин очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ (рисунок 90); выход был низким и составил 0,2 мг/л среды, однако этого хватило, чтобы провести исследование функциональных особенностей ω-Lsp-IA.

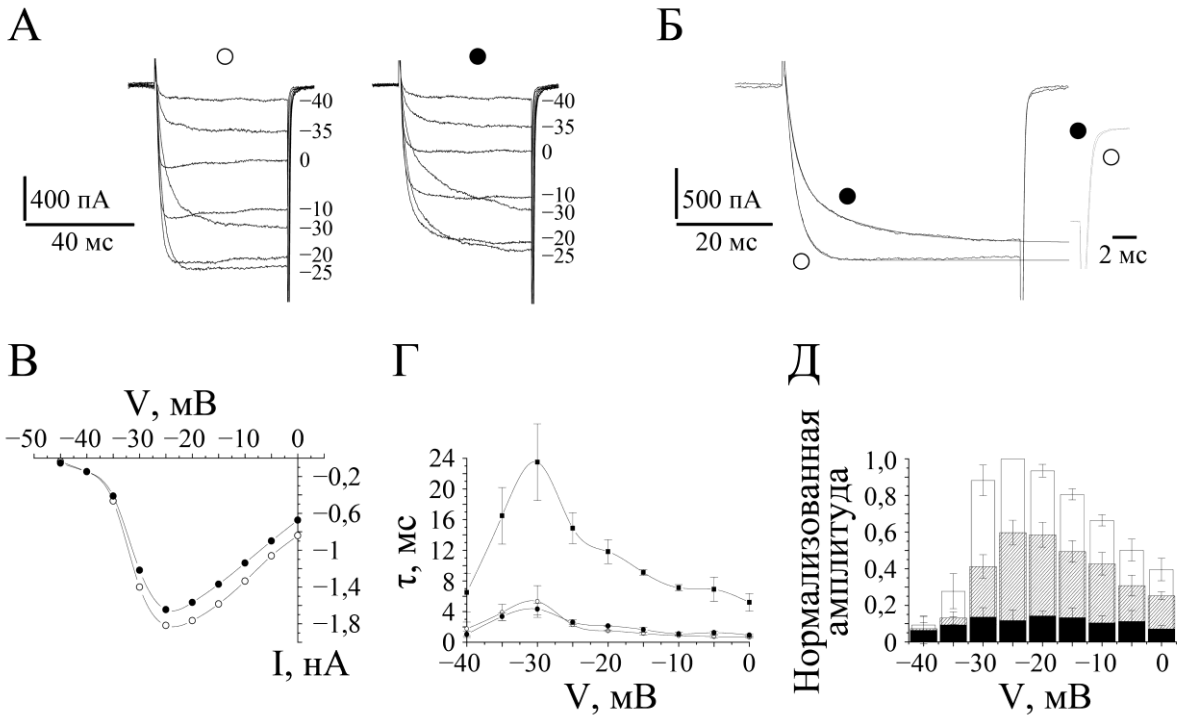
Рисунок 90. Очистка рекомбинантного ω-Lsp-IA. (А) ОФ-ВЭЖХ гидролизата гибридного белка Trx-ω-Lsp-IA, расщепленного энтеропептидазой, на колонке Jupiter C_5 (4,6×150 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Звездочкой отмечен пик, соответствующий искомому ω-Lsp-IA. Trx — фракция тиоредоксина. (Б) Сравнение времени удерживания нативного токсина (0,5 нмоль; нижний график), рекомбинантного ω-Lsp-IA (0,5 нмоль; средний график) и смеси нативного и рекомбинантного пептидов (1 : 1, 0,5 нмоль каждого; верхний график) в условиях ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C_5 (2×150 мм), элюцию проводили линейным градиентом концентрации ацетонитрила (20–60% за 60 мин) в 0,1% ТФУ при скорости потока 0,3 мл/мин.



Действие рекомбинантного токсина изучили на Ca^{2+} каналах P-типа в клетках Пуркинье мозжечка крыс. Приложение 10 нМ ω-Lsp-IA заметно замедляло активацию и несколько уменьшало амплитуду P-тока, не влияя на кинетику деактивации во всем диапазоне потен-

циалов (рисунок 91А, Б). Увеличение концентрации токсина до 100 нМ не приводило к возрастанию эффекта. При насыщающих концентрациях (≥10 нМ) развитие действия ω-Lsp-IA на Р-ток было быстрым (<10 с), тогда как при более низких концентрациях (<1 нМ) — медленным (>5 мин). Эти эффекты не зависели от способа приложения токсина и не устранялись сильными деполяризующими (50 мВ) предварительными импульсами. Отмывка приводила к частичному восстановлению как кинетики активации, так и амплитуды Р-тока в течение нескольких минут. Полученные данные подтвердили, что рекомбинантный ω-Lsp-IA оказывает такое же действие на Р-ток, как и нативный токсин (1132).

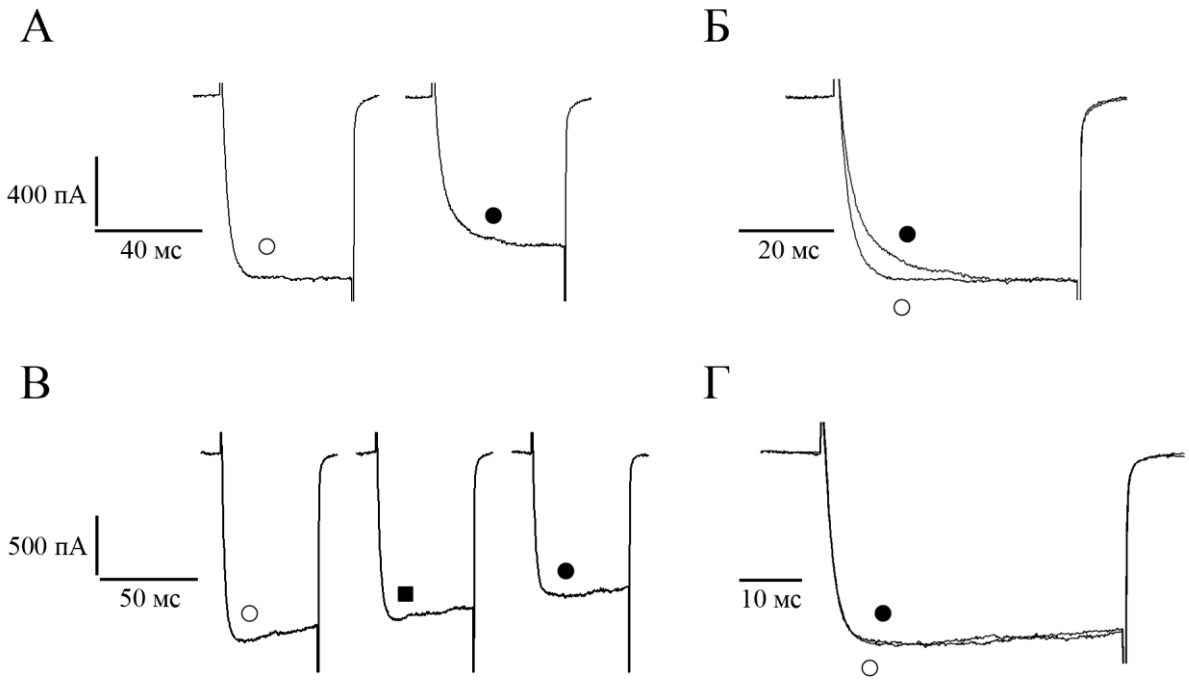
Рисунок 91. Влияние ω-Lsp-IA на Ca^{2+} каналы Р-типа в клетках Пуркинье мозжечка крыс. (А) Типичные записи токов через Ca^{2+} каналы Р-типа, зарегистрированные в контроле (○, слева) и после приложения ω-Lsp-IA в насыщающей концентрации (10 нМ; ●, справа). Потенциал тестовых импульсов указан возле соответствующих записей. (Б) Кинетика активации токов при тестовом импульсе −25 мВ была аппроксимирована одноэкспоненциальной кривой с постоянной времени τ_{con} = 2,33 ± 0,01 мс в контроле (○) и биэкспоненциальной кривой с постоянными времени τ_{fast} = 2,34 ± 0,04 мс и τ_{slow} = 14,10 ± 0,04 мс при приложении 10 нМ ω-Lsp-IA (●). Справа для сравнения показаны нормированные хвостовые токи. (В) Вольт-амперная характеристика для записей, показанных на (А). (Г) Зависимость постоянной времени активации от потенциала в контроле (○) и после воздействия 10 нМ ω-Lsp-IA для быстрой (●) и медленной (■) компонент Р-тока. (Д) Те же данные, что на панели (Г), проанализированные для средней нормализованной амплитуды тока в контроле (пустые столбики) и после инкубации с токсином для быстрой (черные столбики) и медленной (заштрихованные столбики) компонент; расчет по формуле 27. Приведены средние значения ± SD (n = 4).



Замедление активации проявлялось в появлении второй, более медленной компоненты тока. Аппроксимация кривой модифицированных токсином токов двухэкспоненциальной функцией (уравнение 27) привела к получению зависимости постоянной времени быстрой компоненты (τ_{fast}) от напряжения, аналогичной постоянной времени в контрольных условиях (τ_{con}), а также выявила медленную компоненту с постоянной времени (τ_{slow}) в пять раз больше, чем в контроле ($\tau_{slow} / \tau_{fast} \approx 5$; рисунок 91Г). Зависимость амплитуды этой медленной компоненты от потенциала была аналогична контрольной вольт-амперной характеристике, тогда как амплитуда быстрой компоненты была практически постоянной во всем диапазоне потенциалов активации (рисунок 91В, Д). Соответственно, для токов, модифицированных токсином, максимальное значение отношения амплитуд медленной (I_{slow}) и быстрой компоненты (I_{fast}) наблюдалось вблизи экстремума вольт-амперной характеристики ($I_{slow} / I_{fast} \approx 5$).

Для проверки селективности действия ω-Lsp-IA мы использовали нейроны гиппокампа крыс, экспрессирующие основные типы Ca^{2+} каналов (957, 958). Приложение 10 нМ ω-Lsp-IA приводило к быстрому (развивающемуся менее чем за 10 с) изменению кинетики активации и амплитуды кальциевого тока (n = 5; рисунок 92А, Б). Эти изменения согласуются с замедлением компонента тока, опосредованного Ca^{2+} каналами Р-типа.

Рисунок 92. Влияние ω-Lsp-IA на кальциевый ток в нейронах гиппокампа. (А) Типичные записи токов в контроле (○, слева) и после приложения 10 нМ ω-Lsp-IA (●, справа). (Б) Нормированные записи, показанные на (А). (В) ω-Aga IVA предотвращал изменения в кинетике активации токов, вызываемые ω-Lsp-IA. Типичные записи токов в контроле (○, слева), после инкубации со 100 нМ ω-Aga IVA в течение 3 мин (■, в центре) и после приложения 10 нМ ω-Lsp-IA (●, справа). (Г) Нормированные записи, показанные на (В).



Кроме того, мы использовали ω-Aga IVA, селективный ингибитор Ca^{2+} каналов P-типа (см. подробно о нем в Обзоре литературы, раздел «ω-Агатоксины», аминокислотная последовательность приведена в таблице 16) (539, 543). После инкубации со 100 нМ ω-Aga IVA в течение 3 мин приложение токсина ω-Lsp-IA в насыщающей концентрации не приводило к изменению остаточного кальциевого тока (n = 8; рисунок 92В, Г). Таким образом, эффект ω-Lsp-IA, по всей видимости, ограничивается действием на Ca^{2+} каналы P-типа ($Ca_v2.1$).

Активность ω-Lsp-IA выделяет его среди других токсинов, воздействующих на Ca_v. Очевидно, что в данном случае мы имеем дело не с поровым блокатором, как ω-Aga IIIA (см. подробно о нем в Обзоре литературы, раздел «ω-Агатоксины») (549, 550), а модулятором воротных механизмов — на это указывают неполный блок тока и замедление активации каналов. Но и среди известного разнообразия модуляторов ω-Lsp-IA выделяется своим «мягким» действием: в насыщающих концентрациях он лишь частично снижает амплитуду токов, и полного ингибирования не наблюдается, в отличие от упомянутого ω-Aga IVA и других токсинов. Поэтому ω-Lsp-IA может найти применение для контроля синаптической передачи, когда нужно снизить частоту сигналов, а не ингибировать их полностью. Результаты нашего исследования опубликованы (1133).

3.9. Пуротоксины — компоненты яда пауков, воздействующие на P2X рецепторы

К середине 2000-х гг. в литературе накопилось достаточно убедительных сведений о ведущей роли специализированных ионных каналов в восприятии болевых ощущений (ноцицепции). К таким «болевым рецепторам» относятся, в частности, терморецепторы из (супер)семейства TRP, рецепторы кислоты из семейства ASIC и рецепторы внеклеточного АТФ из семейства P2X. Оказалось, что эти же ионные каналы вовлечены в развитие патологических болевых состояний и являются, таким образом, перспективной молекулярной мишенью для разработки анальгетиков нового поколения. Отличительной чертой таких анальгетиков, селективно модифицирующих активность болевых рецепторов, стала бы высокая специфичность по сравнению с традиционными препаратами с другим механизмом действия. Учитывая эти соображения, Е.В. Гришиным было принято решение переориентировать работу его лаборатории на поиск селективных лигандов болевых рецепторов. Сегодня, спустя 20 лет, мы можем утверждать, что несмотря на рискованность такого шага, проект получился успешным: для всех трех указанных групп болевых рецепторов удалось найти селективные лиганды в составе животных ядов, а в случае P2X рецепторов (работы по этому направлению проводились автором диссертации) наши исследования стали пионерскими и до сих пор не имеют аналогов.

Ионотропные пуриновые (в англоязычной литературе чаще используется общепринятый теперь термин «пуринергические», purinergic) рецепторы P2X — катионные каналы, которые активируются внеклеточным АТФ (1134). Полагают, что АТФ, оказавшийся во внеклеточном пространстве при механическом воздействии на ткань, повреждении клеток или вследствие воспалительного процесса, служит сигналом чувствительным нейронам, интерпретируемым как боль. P2X рецепторы состоят из трех субъединиц, кодируемых у человека семью генами, возможно формирование как гомомерных, так и гетеромерных каналов. Средний размер каждой субъединицы ≈ 45 кДа (за исключением сильно отличающейся P2X7), в ее состав входят два трансмембранных сегмента и большой внеклеточный лиганд-связывающий домен. В настоящее время известна пространственная структура нескольких P2X рецепторов, изученная с помощью методов РСА и крио-ЭМ. Например, структура рецептора P2X3 человека была получена в трех состояниях: закрытом (апоформа в отсутствие агониста, а также в комплексе с блокаторами), открытом (в комплексе с АТФ, при этом во избежание десенситизации в структуру рецептора были введены замены, соответствующие P2X2) и десенситизированном (в комплексе с АТФ) (1135).

P2X2 и P2X3, а также гетеромеры P2X2/3 характерны для периферических и центральных окончаний сенсорных афферентных нейронов, а P2X3 рецепторы почти исключительно экспрессируются в чувствительных нейронах (1136), где они играют главную роль в

реализации сенсорных эффектов АТФ и возникновении болевого сигнала. Важнейшая роль этих рецепторов в восприятии боли была продемонстрирована на *P2rx3*-нокаутных мышах (1137, 1138). P2X3 рецепторы выступают мишенью для разработки анальгетических препаратов в болевом синдроме при остеоартрите (1139) и раке кости (1140), продемонстрировано их участие в мигрени (1141) и хроническом кашле (1142). Недавняя работа выявила важную роль P2X3 рецепторов в артериальной гипертензии: обнаружена их повышенная экспрессия в сенсорных нейронах каменистого узла у крыс с гипертонией, а применение их ингибиторов снижало артериальное давление (1143). Кроме того, показана экспрессия P2X3 рецепторов в каротидных тельцах у человека, где они могут служить мишенью антигипертензивных препаратов.

Очевидно, для изучения структуры и функции P2X3 рецепторов, а также для создания новых потенциальных анальгетиков необходимы селективные лиганды этих белков. В настоящее время усилия многочисленных исследовательских групп и фармацевтических компаний направлены на получение таких лигандов. Наибольшего успеха добились компании Afferent Pharmaceuticals (лицензиат Roche, приобретена Merck) (1142) и BELLUS Health (лицензиат NEOMED Institute, приобретена GSK) (1144), разработавшие селективные низкомолекулярные ингибиторы P2X3 рецепторов джефапиксант и камлипиксант, которые показали многообещающие результаты в доклинических и клинических испытаниях для лечения хронического кашля. В конкуренции с этими компаниями мы обнаружили в яде пауков первые селективные полипептидные лиганды P2X3 рецепторов, названные нами пуротоксинами.

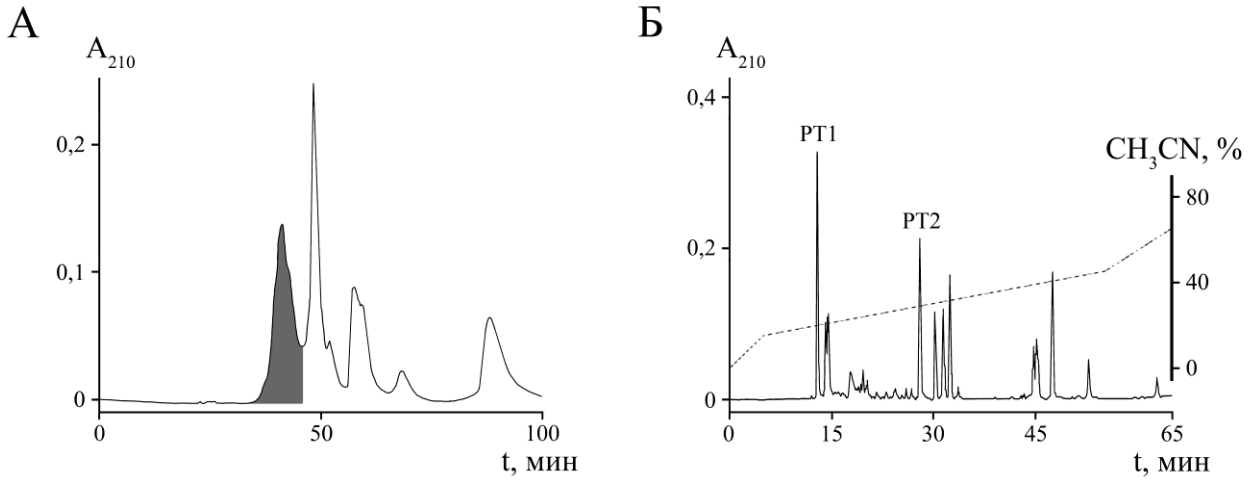
3.9.1. Выделение и характеристика структуры пуротоксинов

Вначале мы провели скрининг коллекции ядов пауков на болевых рецепторах; оказалось, что некоторые яды, в частности яд паука-волка *A. marikovskyi*, оказывают ингибирующее действие на рецепторы чувствительных нейронов крыс.

3.9.1.1. Выделение пуротоксина-1 из яда паука *Alopecosa marikovskyi*

Используя нашу традиционную стратегию, описанную в разделе «Молекулярный состав яда паукообразных и методы разделения», мы провели разделение яда *A. marikovskyi* (рисунок 93) и обнаружили фракции, содержащие модуляторы P2X3. Фракция, элюирующаяся с обращенно-фазовой колонки сравнительно рано (<20% по ацетонитрилу), содержала активный пептидный компонент, который мы назвали пуротоксином-1 (PT1).

Рисунок 93. Выделение пуротоксинов 1 и 2 из яда паука *A. marikovskyi*. (А) Эксклюзионная хроматография цельного яда на колонке TSK 2000SW (7,5×600 мм). Фракция, содержащая пуротоксины, закрашена. (Б) ОФ-ВЭЖХ отобранной фракции из (А) на колонке Vydac C_{18} (4,6×250 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктирной линией. Пики, соответствующие содержащим пуротоксины фракциям, отмечены.



Первичную структуру PT1 (UniProt ID: P86269) мы определили с помощью N-концевого секвенирования по Эдману и МС. PT1 (Мм 3836,5 Да) содержит 35 а.о. (таблица 46), включая восемь остатков цистеина, формирующих четыре внутримолекулярных дисульфидных мостика. На время открытия PT1 было известно только два других пептида с неисследованной функцией со значительным сходством последовательности, в настоящее время число таких пептидов увеличилось, кроме того, некоторые из них оказались активными в отношении пуринергических рецепторов; можно говорить о семействе пуротоксинов, гомологичных PT1.

3.9.1.2. Семейство пуротоксина-1

В общедоступных базах данных, таких как UniProt и GenBank, с помощью алгоритма BLAST мы обнаружили последовательности, походжие на PT1. Чтобы расширить репертуар, мы секвенировали и проанализировали транскриптомы ядовитых желез семи видов, принадлежащих к разным семействам пауков. В каждом транскриптоме мы идентифицировали последовательности, кодирующие пептиды с высоким сходством с PT1 (таблица 46).

3.9.1.3. Получение рекомбинантных пуротоксинов

Мы получили рекомбинантные пуротоксины по нашей стандартной процедуре в бактериальной системе экспрессии. Для отделения пептидов от Trx мы использовали два подхода: (а) поскольку PT1 и его гомологи не содержит остатков метионина, было возможным использовать бромциан, (б) как альтернативу мы использовали ферментативный гидролиз эн-

теропептидазой. В результате мы получили рекомбинантные пептиды с выходом ≈ 3 мг с 1 л питательной среды. Рекомбинантный PT1 оказался эквивалентным нативному пептиду по физико-химическим свойствам (Мм, время удерживания при ОФ-ВЭЖХ) и биологической активности. Помимо PT1, мы получили гомологичные ему пептиды из *A. orientalis* (семейство Agelenidae; GenBank ID: Q5Y4U5; см. таблицу 46), *Ch. punctorium* (Cheiracanthiidae; OP828741), *L. tarabaevi* (Zodariidae; OP828751), *O. takobius* (Oxyopidae; OP828747), *Thomisus onustus* (Thomisidae; UniProt ID: A0A4P1LYD9), *Tibellus oblongus* (Philodromidae; GenBank ID: OP828749), *Viridasius fasciatus* (Ctenidae; ARB50104).

Пептид из *Th. onustus* получил название пуротоксина-6 (PT6), его активность на чувствительных нейронах крыс в отношении токов, опосредуемых пуриновыми рецепторами, была практически неотличима от PT1. Интересно, что с точки зрения аминокислотной последовательности PT6 представляется упрощенной версией PT1 с укорочением одной петли (см. таблицу 46).

3.9.1.4. Пространственная структура PT1 и PT6

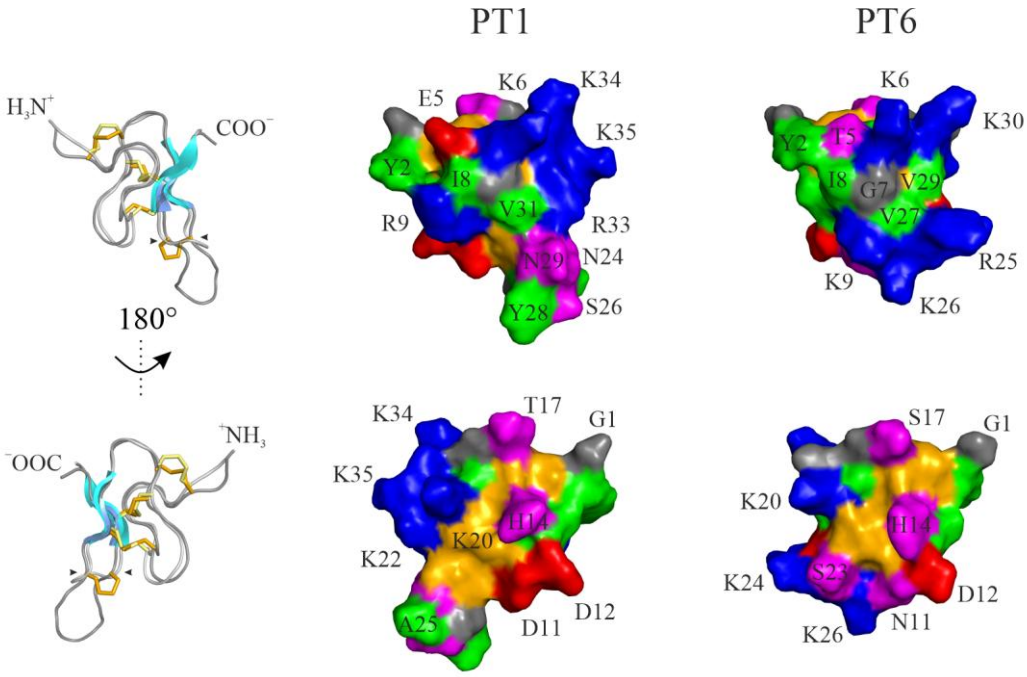
Пространственную структуру PT1 (PDB ID: 2KGU) и PT6 (6F61) в растворе мы исследовали с помощью методов спектроскопии ЯМР (рисунок 94). Пептиды образуют достаточно жесткую укладку, включающую два коротких антипараллельных β-тяжа (K20–K22 и V31–R33 у PT1; L19–D22 и V27–K30 у PT6) и несколько β-изгибов. Три дисульфидных мостика (C3–C16, C10–C21 и C15–C32 у PT1; C3–C16, C10–C21 и C15–C28 у PT6) образуют структурный мотив цистинового узла, характерный для большинства известных токсинов пауков (см. Обзор литературы, раздел «Пространственная структура дисульфид-содержащих пептидов»; рисунок 5). Интересно, что заряженные а.о. расположены асимметрично на поверхности молекул. Кроме того, у PT1 петля, ограниченная дополнительным дисульфидным мостиком C23–C30, выступает из компактной миниглобулы пептида. Можно сказать, что PT6 — уменьшенная, «оптимизированная» версия PT1, в которой эта петля и дополнительный S-S-мостик удалены.

Таблица 46. Семейство пептидов-гомологов PT1.

Источник	GenBank ID	Последовательность	Длина, а.о.
Cheiracanthium punctorium	OP328303	GYCAENGIKCNDLHCCTGLKCKCTDRGLFDRDCVCRKG	38
	OP778257	GYCAENGIECNDLHCCTGLKCKCTDHGLFNRYCVCRKG	
	OP793793	GYCAENGIKCNDLHCCTGLKCKCTDHGLFNRYCVCRKG	
	OP828740	GYCAENGIKCNDLHCCTGLKCKCTDHGLFNWDCVCRKG	
	OP828741	GYCAENGIKCNDLHCCTGLKCKCTDHGLFNRDCVCRKG	
	OP828742	GYCAEKGIKCNDLHCCTGLKCKCTDHGLFNRDCVCRKG	
	OQ067356	GYCAKNGIKCNDLHCCTGLKCKCTDHGLFNRDCVCKKG	
Viridasius fasciatus	ARB50104	GYCAEKGVKCHNIHCCENLRCKCNDDR---SSCVCRKNKVS	
Oxyopes takobius	OP828743	GYCAENGILCNDIHCCENLKCRCNPGR---TTCVCRKK	35
	OP828744	GYCAENGIKCNDIQCCGNLKCRCNPGR---TNCVCTKK	
	OP828745	GYCAENGIKCNDIQCCGNLKCRCNPGR---TNCVCKKK	
	OP828746	GYCAENGIKCNDIQCCGNLKCRCNEGR---TNCVCRKK	
	OP828747	GYCAENGIKCNDIQCCGNLKCRCNPGR---TNCVCRKK	
Alopecosa marikovskyi	P86269[1]	GYCAEKGIRCDDIHCCTGLKCKCNASG---YNCVCRKK	
Lycosa tarantula	QNF22881	GYCAEKGIRCDDIHCCTGLKCKCNDSG---YNCVCRKK	
Lycosa singoriensis	OP828748	GYCAEKGIRCDDIHCCTGLKCKCNNSG---YNCVCRKK	
Cupiennius salei	QDC23144	GYCAEKNIKCNDIHCCTGLKCKCNSSR---TNCVCRKE	
Dolomedes mizhoanus	AGR53500	GYCAEKGIKCNDIHCCSNLVCKCDSSR---SNCVCRKK	
Dolomedes sulfureus	ALJ10846	GYCAENGIKCNDLHCCTGLVCKCNSSR---SNCVCRKK	
	ALJ10864	GYCAENGIKCNDFHCCTGFVCKCNSSR---SNCVCRKK	
Dolomedes fimbriatus	AKT08992	GYCAENGIKCNDLHCCSGLVCKCNSSR---SNCVCRKK	
	AKT08993	GYCAENGIKCNNLHCCSGLVCKCNSSR---SNCVCRKK	
Tibellus oblongus	OP828749	GYCAQKGIKCHDIHCCSGLKCVCNSSR---SSCVCKK	34
	OP828750	GYCAQKGIKCHDIRCCSGLKCVCNSSR---SSCVCKK	
Phoneutria nigriventer	P84015[1]	GFCAQKGIKCHDIHCCTNLKCVREG-----SNRVCRKA	33
Heteropoda venatoria	AHF45737	GFCAEKGIKCHDLHCCTGLICKTEG-----SSKVCRKK	
Agelena orientalis	Q5Y4U5	GYCAEKGIKCHNIHCCSGLTCKCKG-----SSCVCRK	32
Thomisus onustus	A0A4P1LYD9[1]	GYCATKGIKCNDIHCCSGLKCDSKR-------KVCVKG	31
Lachesana tarabaevi	OP828751	GYCAEKNIKCDNIHCCTGLKCIKG---------VCRKR	29

В последовательность пептидов внесены разрывы для удобства сравнения. А.о. раскрашены в соответсвии со свойствами как в таблице 8. Строки с последовательностями PT1 (из *A. marikovskyi*) и PT6 (из *Th. onustus*) выделены рыжим. [1]Указаны UniProt ID.

Рисунок 94. Сравнение структуры PT1 (PDB ID: 2KGU) и PT6 (6F61). Слева пептиды показаны в ленточном представлении, проведено 3D-выравнивание; отмечены N- и C-концы. У PT1 окраска элементов вторичной структуры как на рисунке 7; у PT6: дисульфидные мостики показаны светло-желтым, β-тяжи — бирюзовым, петлевые участки — светло-серым. Дополнительный дисульфидный мостик у PT1, ограничивающий удлиненную петлю β-шпильки, указан треугольниками. Справа показаны молекулярные поверхности пептидов, раскрашенные в соответствии со свойствами а.о. как в таблице 46.



3.9.1.5. Выделение и секвенирование пуротоксина-2

Другая фракция яда *A. marikovskyi*, модулирующая активность P2X3 рецепторов, характеризуется гораздо бóльшим временем удерживания на обращенной фазе (≈28% по ацетонитрилу) в сравнении с PT1 (рисунок 93). Активный компонент в этой фракции содержался с чистотой > 95% по данным аналитической ВЭЖХ. Это полипептид с Мм ≈ 7255,5 Да, определенной с помощью МАЛДИ МС, он получил название пуротоксин-2 (PT2).

Мы установили аминокислотную последовательность PT2 (UniProt ID: B3EWH0) комбинацией N-концевого секвенирования по Эдману и селективного протеолиза. В этом случае мы использовали расщепление полипептидной цепи бромцианом и эндопротеиназой Asp-N. Обработка бромцианом восстановленного и алкилированного 4-винилпиридином PT2 привела к образованию двух фрагментов. Один содержал 23 а.о. и соответствовал уже установленной N-концевой последовательности. Второй секвенировали по Эдману, он содержал 41 а.о.; в результате реконструировали полную аминокислотную последовательность PT2. Фрагменты, полученные с помощью Asp-N, секвенировали с помощью МС/МС, их последовательности соответствовали полученной по Эдману. PT2 состоит из 64 а.о. и имеет C-концевое амидирование. Эта модификация была установлена на основании разницы в 1 Да

между рассчитанными и измеренными Мм полноразмерного токсина (7256,2 Да и 7255,5 Да соответственно) и его С-концевых фрагментов. Восемь остатков цистеина образуют четыре дисульфидные связи, поскольку невосстановленный PT2 устойчив к действию 4-винилпиридина, что указывает на отсутствие свободных тиольных групп. В структуре PT2 можно выделить два модуля: N-концевой дисульфид-богатый ICK-домен и С-концевую линейную (лишенную дисульфидных мостиков) последовательность, которая по свойствам напоминает АМП. PT2 относится к модульным или двудоменным токсинам, его структурные особенности рассмотрены ниже (см. раздел «Модульные токсины из яда паукообразных»).

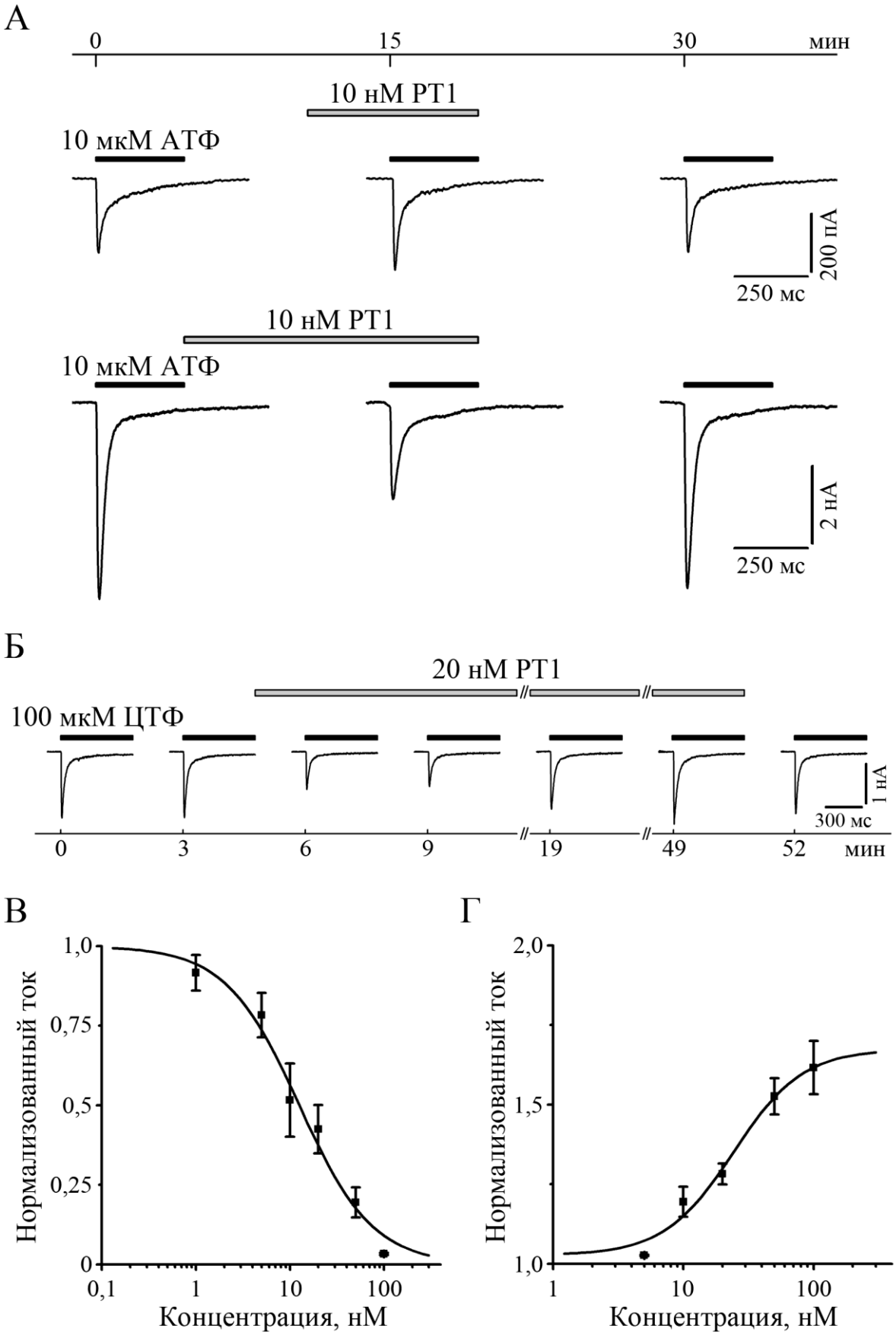
3.9.2. Молекулярный механизм действия пуротоксинов

Эксперименты выполняли в сотрудничестве с лабораториями О.А. Крышталя и С.С. Колесникова. Важные особенности P2X3 рецепторов — быстрая десенситизации, наступающая в течение мс, и медленное, длящееся минуты, восстановление из десенситизированного состояния (1145). В качестве агониста, помимо АТФ, мы использовали ЦТФ, потому что он обеспечивал сравнительно быстрый выход рецепторов из десенситизации.

3.9.2.1. Активность PT1 на чувствительных нейронах крысы

Вначале мы изучили механизм действия PT1 на P2X3 рецепторы нейронов спинальных ганглиев крысы, для этого использовали метод локальной фиксации потенциала. При воздействии PT1 на закрытое состояние P2X3 наблюдалось небольшое потенцирование токов, опосредованных рецепторами, при приложении агониста. Однако при воздействии на десенситизированное состояние рецепторов PT1 значительно снижал последующие ответы P2X3 на АТФ (рисунок 95А, Б). Оба эффекта были полностью обратимы. По всей видимости, PT1 оказывает свое ингибирующее действие путем значительного замедления процесса выхода P2X3 рецепторов из десенситизации. Мы построили кривые «доза–ответ» для обоих эффектов PT1; оказалось, что концентрации, соответствующие полумаксимальному эффекту, близки: IC_{50} = 12 ± 2 нМ (h = 1,1 ± 0,2), EC_{50} = 24 ± 7 нМ (h = 1,6 ± 0,5; рисунок 95В, Г). PT2 и 6 обладали в этой системе сходными эффектами и проявляли сравнимую эффективность.

Рисунок 95. Влияние PT1 на токи, опосредованные P2X3 рецепторами, в чувствительных нейронах крысы. (А) При приложении к закрытому состоянию рецепторов PT1 потенцирует ток (верхний ряд), но подавляет его при приложении к десенситизированному состоянию (нижний ряд). (Б) При активации P2X3 рецепторов с трехминутными интервалами ток остается угнетенным непрерывно приложенным PT1. Ингибирование сменяется на потенцирование с увеличением интервала между приложениями агониста. (В, Г) Кривые «доза–ответ» для ингибирования (n = 22) и потенцирования (n = 24) P2X3 рецепторов (получены с трехминутными интервалами между приложениями агониста; средние значения ± SD).


А
0
15
30
мин
10 нМ PT1
10 мкМ АТФ
200 пА
250 мс
10 нМ PT1
10 мкМ АТФ
2 нА
250 мс
Б
20 нМ PT1
100 мкМ ЦТФ
1 нА
300 мс
0
3
6
9
19
49
52
мин
В
Нормализованный ток
1,0
0,75
0,5
0,25
0
0,1
1
10
100
Концентрация, нМ
Г
Нормализованный ток
2,0
1,5
1,0
1
10
100
Концентрация, нМ

3.9.2.2. Активность пуротоксинов на рекомбинантных P2X3 рецепторах

Для подтверждения того, что P2X3 рецепторы служат молекулярной мишенью пуротоксинов, мы изучили их взаимодействие в условиях экспрессии генов рецепторов в клетках млекопитающих с помощью метода локальной фиксации потенциала. Гены пуриновых рецепторов P2X2 и 3 человека и мыши экспрессировали в клетках HEK 293 и CHO. Оказалось, что PT1, 2 и 6 эффективно ингибируют рекомбинантные P2X3 рецепторы, но не P2X2 или гетеромерные P2X2/3 рецепторы (см. ниже). При этом ингибирующий эффект, как и в случае выделенных нейронов, развивался медленно: например, предварительная инкубация клеток CHO, экспрессирующих P2X3 рецепторы человека, с 10 нМ PT6 в течение 15 мин приводила к почти полному подавлению токов в ответ на приложение 100 мкМ ЦТФ, в то время как сокращение времени инкубации до 1 мин вызывало ингибирование лишь на ≈40% в насыщающих концентрациях PT6 100 нМ и выше (рисунок 96А, Б). Ввиду технических сложностей (слишком большого времени восстановления ответов и высокой вариабельности эффектов от клетки к клетке) мы построили кривую «доза–ответ» для PT6 при инкубации в течение 1 мин; значение EC_{50} составило 8,4 ± 0,5 нМ (h = 2,7 ± 0,3; рисунок 96Г).

Кроме того, мы обнаружили, что PT1 и 2 уменьшали амплитуду токов, опосредованных P2X3 рецепторами, и замедляли их выход из десенситизации при условии, что АТФ или ЦТФ постоянно присутствовали в растворе в низкой подпороговой концентрации. Это говорит о том, что пуротоксины усиливают т.н. «высокоаффинную десенситизацию» P2X3 рецепторов (1146). Кривая высокоаффинной десенситизации смещается к более низким концентрациям агониста в присутствии пуротоксинов (рисунок 97). Значение IC_{50} для ЦТФ в отношении mP2X3 снизилось с 46,5 нМ в контроле до 12,7 нМ в присутствии 50 нМ PT1. Аналогичным образом IC_{50} для АТФ в отношении hP2X3 снизилась с 2,67 нМ в контроле до 0,77 нМ в присутствии 50 нМ PT2.

3.9.2.3. Селективность действия пуротоксинов на пуриновые рецепторы

PT1 и 6 были неэффективны (в концентрациях до 1 мкМ) против более медленных в сравнении с P2X3 ответов на АТФ, генерируемых рецепторами P2X2 или гетеромерами P2X2/3 в чувствительных нейронах крысы (1147). Экспрессия в клетках CHO генов рецепторов P2X2 или P2X3 по отдельности приводила к различным ответам на АТФ. В отличие от P2X3-позитивных клеток, токи в P2X2-позитивных клетках активировались относительно медленно и инактивировались значительно слабее, что согласуется с наблюдениями других исследователей (1134).

Рисунок 96. Активность PT6 на пуриновых рецепторах, экспрессированных в клетках CHO. (А и Б) Репрезентативные записи токов, опосредованных P2X3 рецепторами, в ответ на приложение 100 мкМ ЦТФ. (А) При кратковременной (1 мин) предварительной инкубации эффект 5 нМ PT6 был небольшим и полностью обратимым. (Б) При длительной инкубации ток подавлялся вплоть до полного ингибирования, которое было только частично обратимым. (В) Репрезентативные записи токов, опосредованных гетеротримерами P2X2/3. (Г) Кривая «доза–ответ» для P2X3 рецепторов и предварительной инкубации в течение 1 мин (n = 14; средние значения ± SD). (Д) Амплитуда ответов для гетеротримеров P2X2/3 (n = 12).

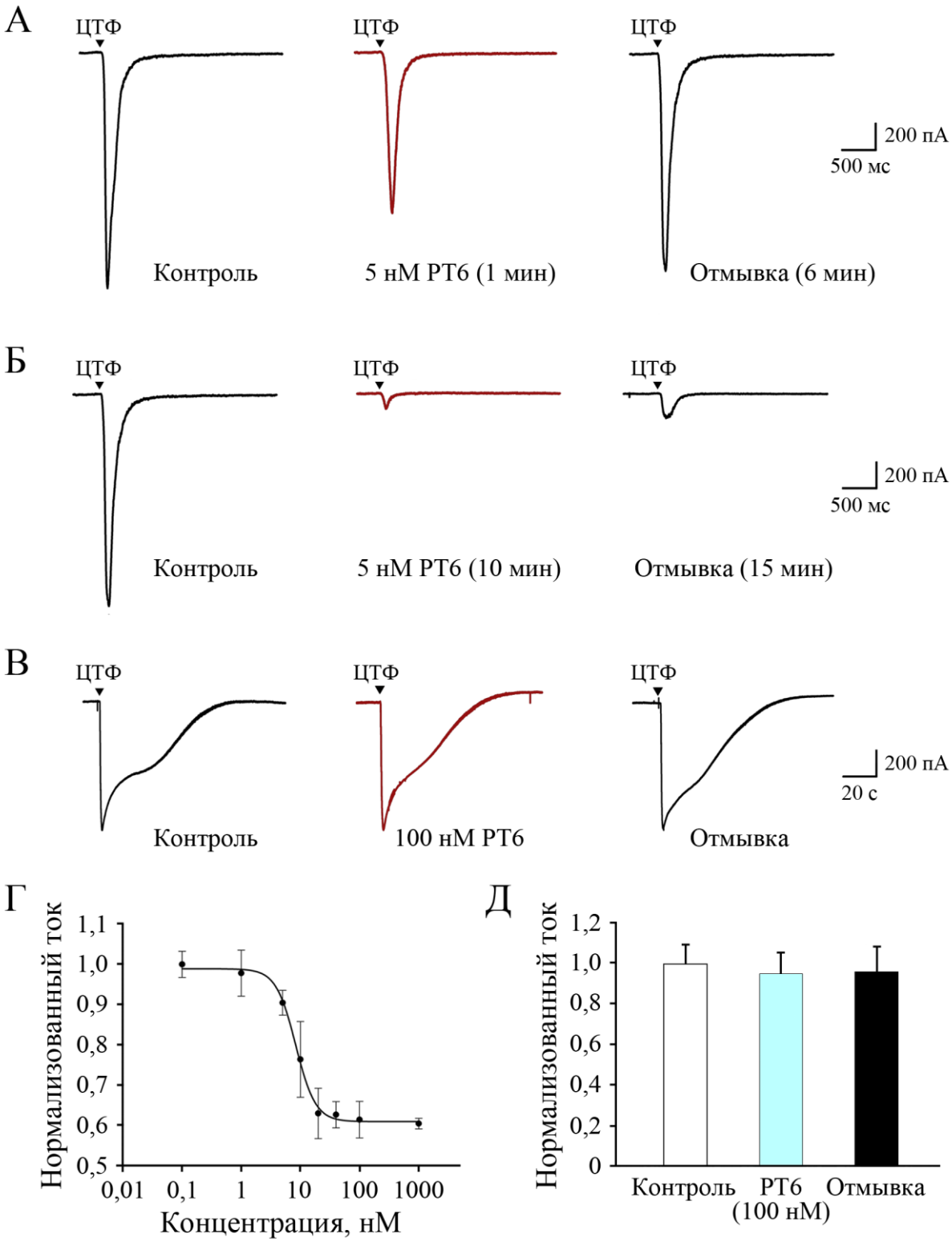
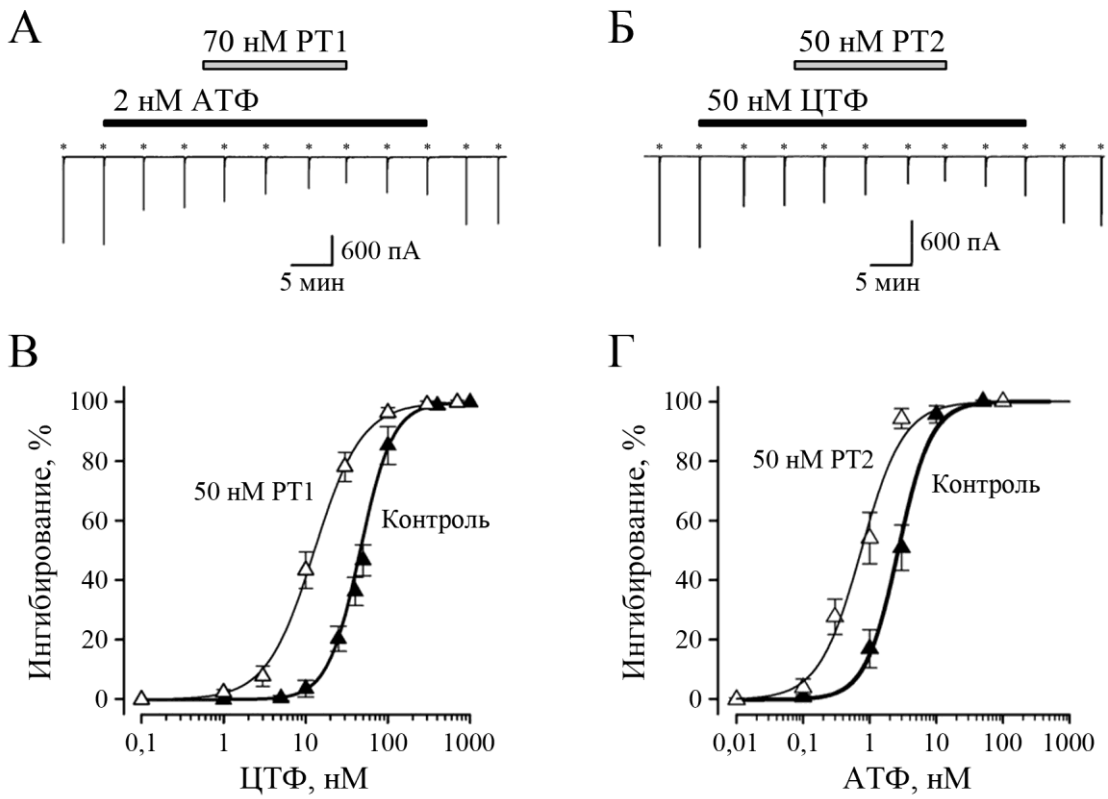


Рисунок 97. Воздействие PT1 и 2 на высокоаффинную десенситизацию P2X3. (А, Б) Репрезентативные записи токов, опосредованных hP2X3 (А) или mP2X3 (Б) и вызванных приложением 10 мкМ АТФ (А) или 100 мкМ ЦТФ (Б) в течение 2 с. Приложение агонистов отмечено звездочками над записями. Длительное приложение агонистов в низкой концентрации (2 нМ АТФ или 50 нМ ЦТФ) и пуротоксинов указано отрезками. (В, Г) Снижение амплитуды тока, опосредованного mP2X3 (В) или hP2X3 (Г), в ответ на приложение 100 мкМ ЦТФ (В) или 10 мкМ АТФ (Г) в зависимости от концентрации постоянно присутствовавшего ЦТФ (В) или АТФ (Г) в омывающем растворе в контроле (▲; средние значения ± SD) и в присутствии 50 нМ PT1 или 2 (△). Сплошные линии соответствуют аппроксимации данных по формуле 26 со значениями: IC_{50} = 46,5 нМ, h = 2,2 (В, жирная линия); IC_{50} = 12,7 нМ, h = 1,6 (В, тонкая линия); IC_{50} = 2,67 нМ, h = 1,7 (Г, жирная линия); IC_{50} = 0,77 нМ, h = 1,4 (Г, тонкая линия).



При совместной трансфекции конструкциями с генами P2X2 и P2X3 клетки CHO демонстрировали АТФ-зависимые токи, которые отличались от тех, которые опосредованы гомомерными рецепторами. Поскольку ток через мембрану клеток при двойной трансфекции не может быть описан какой-либо линейной комбинацией токов, опосредованных P2X2 и P2X3, мы предположили, что именно гетеромерные рецепторы P2X2/3 в значительной степени ответственны за такие АТФ-зависимые токи. PT1, 2 и 6 не влияли на АТФ-управляемые токи через рецепторы P2X2 или P2X2/3 (рисунок 96 В, Д).

Мы не обнаружили никакой активности PT1 или 6 в отношении ряда потенциалчувствительных и лиганд-активируемых ионных каналов, включая изоформы Ca_v, K_v, Na_v, nAChR, ASIC, TRPV. Таким образом, рецептор P2X3 служит специфической мишенью ис-

следованных пуротоксинов, а PT1 является первым известным селективным пептидным модулятором P2X3 рецепторов.

Молекулярный механизм действия PT1, 2 и 6 на пуриновые рецепторы особенный: они не оказывают влияния на медленно десенситизирующиеся подтипы P2X2 и 2/3 рецепторов, но избирательно угнетают быстро десенситизирующийся подтип P2X3, по-видимому, специфично связываясь именно с десенситизированным состоянием рецептора. Насколько нам известно, только P_1,P_5-ди(инозин-5'-)пентафосфат, неконкурентный антагонист быстро десенситизирующихся пуриноцепторов P2X1 и 3, способен действовать похожим образом (1148). Однако взаимосвязь его эффектов с высокоаффинной десенситизацией остается неисследованной.

Наши данные указывают на то, что чем бóльшая доля P2X3 рецепторов подвержена высокоаффинной десенситизации, тем более выраженных эффектов пуротоксинов на токи, опосредованные этими рецепторами, можно ожидать. Хотя содержание АТФ в межклеточной среде достоверно неизвестно, оценки, доступные для некоторых тканей, варьируют от сотен пМ до десятков нМ (1149, 1150). Следовательно, *in vivo* высокоаффинная десенситизация может быть важным фактором активности P2X3 рецепторов в ответ на высвобождение АТФ из клеток, например при воспалении. Если это так, то введение пуротоксинов должно усиливать высокоаффинную десенситизацию P2X3. Это может объяснить анальгетический эффект PT1 и 6, наблюдаемый в животных моделях.

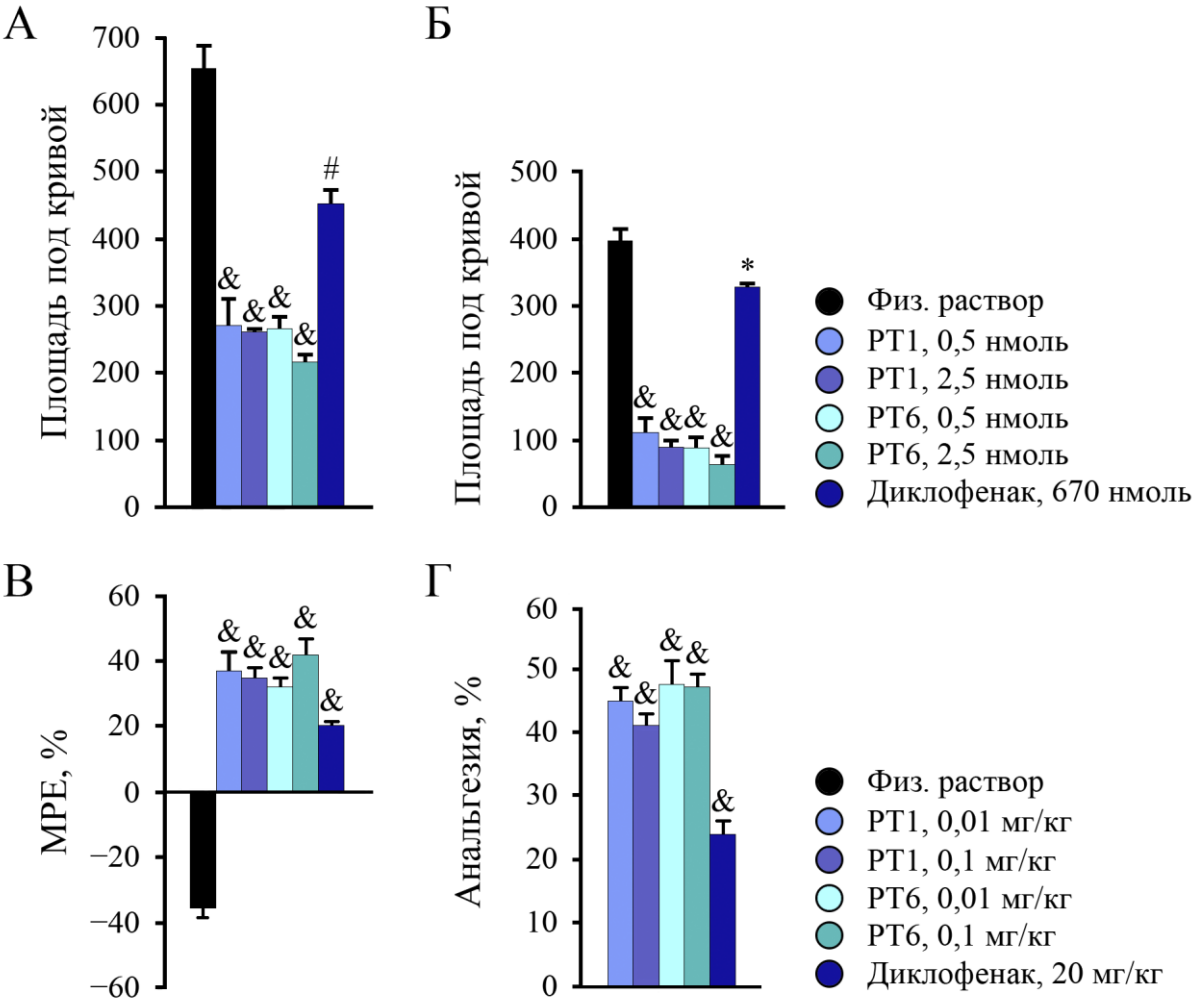
3.9.3. Биологическая активность пуротоксинов

Как говорилось ранее, P2X3 рецепторы вносят существенный вклад в болевую чувствительность, в частности при воспалении (1137, 1138). Поэтому мы оценили активность пуротоксинов в болевых моделях на животных. Поскольку PT6 представляется «оптимизированным» пуротоксином, наибольшее число тестов было выполнено для этого соединения. Мы использовали целый ряд животных моделей, включая формалиновый тест, «уксусные корчи», ПАФ-тест, модель остеоартрита, вызванного введением йодацетата, и модель невралгии, вызванной перевязкой подглазничного нерва.

Вначале мы использовали неспецифические, но широко используемые модели для анализа обезболивающей активности: формалиновый тест, ПАФ-тест, «уксусные корчи» (рисунок 98). Инъекция 2,5% раствора формалина в заднюю лапу крысы вызывала типичную двухфазную картину, наблюдали болевую реакцию в виде облизывания, покусывания, поджатия лапы. Первая «острая» фаза длилась ≈15 мин, вторая «тоническая» — с 20 по ≈45 мин. Подкожная инъекция PT1 или 6 (0,5 или 2,5 нмоль, т.е. ≈0,01 или 0,05 мг/кг) значительно сократила общее время болевых реакций в обеих фазах. Нестероидное противовоспалительное

средство (НПВС) диклофенак (в дозе ≈ 1,2 мг/кг, s.c.) было более активно в первой фазе и значительно уступало по эффективности пуротоксинам (рисунок 98А, Б).

Рисунок 98. Антиноцицептивный эффект пуротоксинов. (А, Б) Результаты формалинового теста. Представлены значения площади под кривой зависимости продолжительности болевых реакций от времени в первой (А) и второй фазе (Б); средние значения ± SE. $*p < 0{,}05$, $^{\#}p < 10^{-4}$, $^{\&}p < 10^{-5}$ по сравнению с физиологическим раствором, дисперсионный анализ и тест Даннетта (n = 6). (В) Процент максимально возможного эффекта (%MPE) в тесте «горячая пластина» после введения ПАФ (n = 8). (Г) Результаты теста «уксусные корчи». Подсчитывали количество проявлений характерного поведения и выражали его в процентах анальгезии по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор (n = 6).



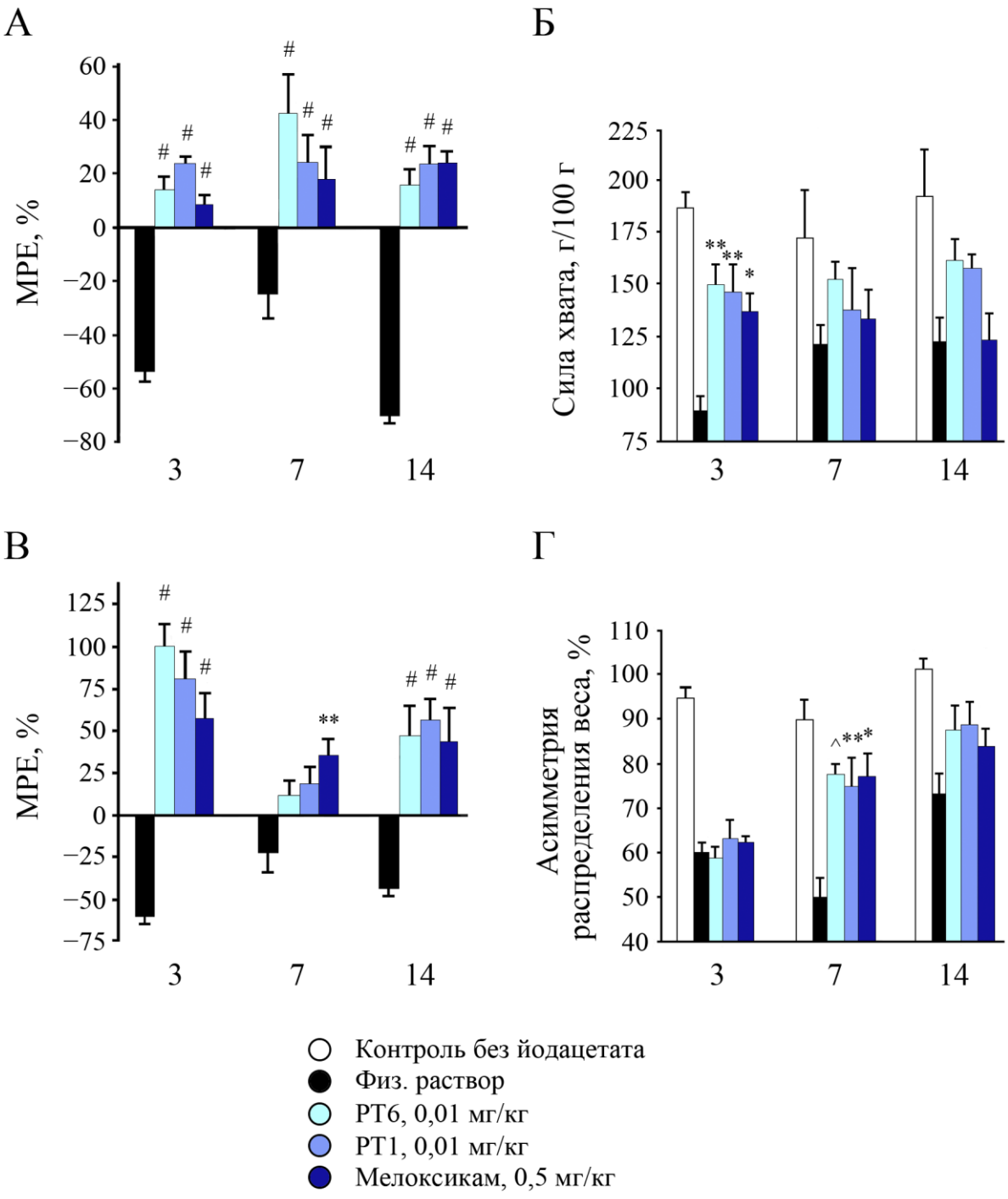
ПАФ-тест заключался в оценке термической чувствительности мышей при введении им в заднюю лапу ПАФ — с помощью «горячей пластины» (рисунок 98В). РТ1 и 6 показали значительный анальгетический эффект: время наступления реакции у животных, которым вводили пуротоксины (в дозах 0,01 и 0,1 мг/кг, s.c.), было сопоставимо с контрольной группой без воспаления, индуцированного ПАФ; значения %MPE были выше, чем у диклофенака

(в дозе 20 мг/кг, s.c.). Внутрибрюшинное введение мышам 0,6% раствора уксусной кислоты приводило к характерному поведению («корчам»). PT1 и 6 были активны в тех же дозах, что в ПАФ-тесте, и опять их эффективность была выше, чем у диклофенака (рисунок 98Г).

Чтобы подтвердить, что наблюдаемая биологическая активность PT6 обусловлена его специфическим действием на P2X3, наши коллеги в Институте биологии гена РАН получили мышей с нокаутом гена *P2rx3*, используя систему CRISPR-Cas9 (1151). В тесте «уксусные корчи» на таких мышах PT6 и джефапиксант не показали активности, в отличие от НПВС диклофенака, который продолжал действовать. Таким образом, анальгетическая (антиноцицептивная) активность PT6 и джефапиксанта опосредована продуктом гена *P2rx3*, указывая на то, что их специфической мишенью служат P2X3 рецепторы.

Затем мы использовали модель остеоартрита, вызванного введением йодацетата крысам в коленный сустав (рисунок 99); эту модель считают более специфичной по сравнению с приведенными выше. Активность пуротоксинов оценили в ряде тестов, которые проводили спустя 3, 7 и 14 дней после инъекции йодацетата. В частности, термическая чувствительность крыс в тесте «горячая пластина» (рисунок 99А) возрастала на фоне воспаления и снижалась при введении PT1 или 6 (0,01 мг/кг, s.c.), эффект был сравним с НПВС мелоксикамом (0,5 мг/кг, s.c.). Оценку функциональности задних лап крыс проводили с помощью теста на силу хвата (рисунок 99Б), которая достоверно увеличивалась при введении пуротоксинов или мелоксикама в тех же дозах на третий день после йодацетата (наблюдали также некоторое восстановление функциональности у контрольных животных без введения лекарства). У крыс с индукцией воспаления был значительно снижен порог в тесте фон Фрея (рисунок 99В); введение пуротоксинов на третий день приводило к достижению значений %MPE ≈ 100 и ≈50% на 14 день; похожий эффект наблюдали в случае мелоксикама. Тест на распределение веса использовали в качестве функциональной меры моделирования остеоартрита. Распределение веса было приблизительно равномерным (90–100%) между правой (инъецированной) и левой (неинъецированной) задними лапами в группе, получавшей физиологический раствор, однако у крыс с инъекцией йодацетата асимметрия превосходила 25% (рисунок 99Г). Все изученные препараты (пуротоксины и мелоксикам) показали эффективность на седьмой день и снижали индекс дискомфорта на ≈25%.

Рисунок 99. Эффекты пуротоксинов в модели остеоартрита, вызванного йодацетатом. Тесты проводились на 3, 7 и 14 дни после инъекции. (А) Оценка термической чувствительности в тесте «горячая пластина». (Б) Сила хвата, нормированная на 100 г массы тела. (В) Порог отдергивания лапы в тесте фон Фрея, нормализованный на среднее значение в группе, не получившей йодацетата. (Г) Распределение веса между лапами, нормированное на принятое за 100% значение для неповрежденной лапы. Данные представлены как средние значения ± SE. *$p < 0,05$, **$p < 0,01$, ^$p < 0,001$, $^{\#}p < 10^{-4}$ в сравнении с группой йодацетат + физиологический раствор, двухфакторный дисперсионный анализ и тест Даннетта (n = 7).



Рецепторы P2X3 вовлечены в невропатию тройничного нерва (1152), и мы решили проверить эффективность PT6 в соответствующей модели, а именно в модели невралгии, индуцированной перевязкой подглазничного нерва у крыс. В этой модели проводят хирургическую операцию, в ходе которой односторонне накладывают лигатуру на подглазничный нерв, и в результате развивается невралгия ростральной части морды животного. Через пять дней после операции чувствительность прооперированной стороны, определяемая при помощи эстезиометра, была существенно выше по сравнению с ложнооперированной. При этом введение PT6 (0,01 мг/кг, s.c.) габапентина (100 мг/кг, s.c.), карбамазепина (50 мг/кг, i.p.) и джефапиксанта (10 мг/кг, i.p.) увеличивало порог чувствительности прооперированной стороны в тесте фон Фрея — до значений, характерных для ложнооперированной стороны (габапентин снижал чувствительность и без операции).

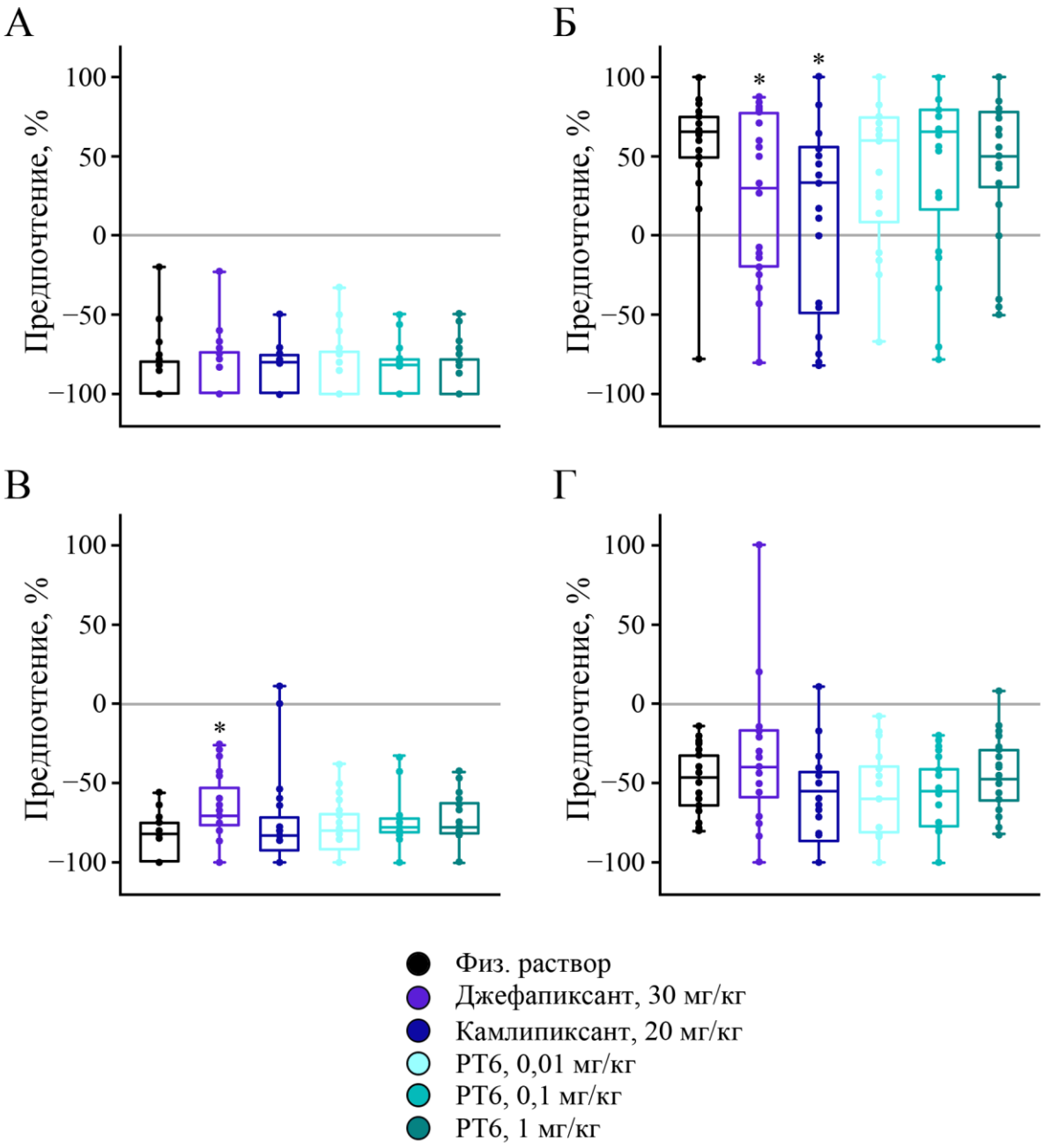
Пожалуй, наиболее вероятным побочным эффектом ингибиторов P2X3 рецепторов является дисгевзия (расстройство вкуса) (1153). Мы проверили, влияет ли PT6 (в дозах 0,01, 0,1 и 1 мг/кг, s.c.) на вкусовую чувствительность, используя стандартный «двухбутылочный» тест; эксперименты выполнены в ООО «НИИ Митоинженерии МГУ» (рисунок 100). Для сравнения мы взяли джефапиксант (30 мг/кг, перорально), у которого низкая селективность в отношении P2X3 по сравнению с P2X2/3 рецепторами (1154), и камлипиксант (20 мг/кг, i.p.), который, как утверждается, показывает высокую селективность (1144). Предпочтение простой воды горькому (0,3 мМ хинин) или соленому (300 мМ NaCl) растворам не было затронуто ни одним из препаратов. Джефапиксант влиял на предпочтение воды кислому раствору (10 мМ лимонная кислота), а предпочтение сладкого раствора (10 мМ сахарин) простой воде уменьшилось в тестах с джефапиксантом и камлипиксантом. PT6 не затронул вкусовые предпочтения даже в максимальной дозе.

3.9.4. Природная функция пуротоксинов. Перспективы использования пуротоксинов для разработки лекарственных препаратов

Отдельного внимания заслуживает вопрос о природной функции пуротоксинов. Очевидно, что P2X3 рецепторы человека или других млекопитающих не могут быть природной мишенью этих соединений. Во-первых, млекопитающие вряд ли являются мишенью яда некоторых видов пауков, где были обнаружены пуротоксины, по причине малого размера особей. Во-вторых, даже если существует возможность отравления ядом, содержащим пуротоксины, остается неясной их биологическая функция в таком сценарии: для чего пауку обезболивание его жертвы или обидчика? Мы полагаем, что обнаруженная нами активность пуротоксинов — счастливая случайность сродни активности коротких инсектотоксинов в отношении глиом (см. Обзор литературы, раздел «Глиомы и противоопухолевые препараты»).

Скорей всего, сработал принцип комбинаторных библиотек, которому мы посвятили рассуждения выше (см. Обзор литературы, раздел «Яд как комбинаторная библиотека токсинов»): среди огромного множества пептидов с цистиновым узлом оказались такие, которые с высокой аффинностью связываются с P2X рецепторами.

Рисунок 100. PT6 не влияет на вкусовую чувствительность мышей. Предпочтение (А) горького, (Б) сладкого, (В) кислого и (Г) соленого растворов в сравнении с водой, измеренное в «двухбутылочном» тесте. Приведены индивидуальные значения индекса предпочтения и диаграммы «усатый ящик». *p < 0,05, дисперсионный анализ и тест Тьюки (n = 20).



Можно сказать, что в данном случае нейротоксины имитируют антитела: если в случае последних отбирают молекулы со способностью связывать заданную мишень среди множества на основе иммуноглобулинового домена с гипервариабельными петлями, то в случае первых гипервариабельные петли крепятся к другому скаффолду — цистиновому узлу. Отсюда и похожие свойства токсинов, воздействующих на «неортодоксальные» мишени (полученные благодаря случайности, а не являющиеся результатом эволюционного отбора по способности воздействовать на такую мишень), и терапевтических антител, созданных для связывания с белками-мишенями в заболеваниях. В случае антител реализуется множество возможных механизмов действия, триггером в которых служит попросту специфическое связывание с мишенью, при этом зачастую доподлинно неизвестно, какой именно механизм приводит к наблюдаемому терапевтическому эффекту (1155). Аналогично и в случае токсинов, найденных по способности связывать заданную мишень: их молекулярный механизм действия может сильно отличаться от сравнительно «простых» случаев, хорошо изученных для «классических» токсинов, т.е. блока или наоборот потенцирования ионного тока, опосредуемого данным рецептором. Так, для пуротоксинов мы предполагаем механизм через усиление высокоаффинной десенситизации P2X3 рецепторов. Для упомянутых коротких инсектотоксинов (прежде всего ClTx), несмотря на многолетние усилия множества коллективов, до сих пор неизвестна молекулярная мишень в составе клеток глиом, и плохо понятен молекулярный механизм угнетения их подвижности. Похожий на пуротоксины пример — псалмотоксин, воздействующий на ASIC 1a (602) [см. Обзор литературы, раздел «Токсины, воздействующие на рецепторы кислоты (каналы ASIC)»]. Он был вначале описан как селективный ингибитор, затем оказалось, что селективность его не абсолютна, впоследствии выяснилось, что в зависимости от видовой принадлежности и условий экспрессии каналов он может выступать и как ингибитор, и как потенциатор, наконец, наблюдаемый терапевтический эффект стали относить не на счет функции непосредственно ASIC 1a в болевой рецепции, а приписывать опосредованному воздействию на опиоидные рецепторы (1156).

Вместе с тем оказалось, что гомологи описанных нами пуротоксинов широко распространены среди пауков (таблица 46), а содержание этих соединений в яде может быть высоко (как в случае PT1 и 2), поэтому скорей всего у них имеется определенная функция. Наиболее вероятно, что природной мишенью пуротоксинов являются насекомые — как природная мишень яда большинства пауков, где найдены эти соединения или их гомологи. Несмотря на это, нам не удалось обнаружить ни инсектицидной активности пуротоксинов, ни эффекта в отношении каких-либо ионных каналов или нейрорецепторов помимо P2X. Таким образом, вопрос о природной функции этих соединений остается открытым.

Китайские исследователи изучили прокоагулянтную активность токсина LCTX-F2 — близкого гомолога PT2, обнаруженного при анализе транскриптома ядовитых желез паука-волка *Lycosa singoriensis* (Lycosidae) (1157). Был получен рекомбинантный LCTX-F2, который значительно сокращал активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), время свертывания крови и время рекальцификации плазмы в микромолярных концентрациях. Методом поверхностного плазмонного резонанса показано, что LCTX-F2 взаимодействует с калликреином, тромбином и факторами Xa и XIIa с микромолярной аффинностью. Сайт-направленный мутагенез, молекулярный докинг и МД позволили выявить некоторые существенные а.о. и предложить модель взаимодействия LCTX-F2 с тромбином и фактором XIIa (1158). Более того, LCTX-F2 оказался эффективен в дозе ≈ 1–2 мг/кг в двух моделях кровотечения у мышей, при этом его гемостатический эффект был выше, чем у ε-аминокапроновой кислоты. Обнаружилось также, что LCTX-F2 ингибирует ASIC 1a и 3 с микромолярным сродством (1159). Однако, ввиду соображений, приведенных выше, сложно ожидать, что природной мишенью LCTX-F2, PT2 или их гомологов служит система гемостаза или болевые рецепторы позвоночных.

Наши результаты исследований пуротоксинов опубликованы (658, 1160-1163).

3.10. Слитные конструкты из нейротоксинов и флуоресцентных белков

Флуоресцентные белки (FP) семейства GFP стали вездесущими молекулярными инструментами, области их использования широки и охватывают разнообразные методы визуализации и управления функцией биологических объектов (1164). Пожалуй, наибольшее распространение получил прием, когда FP ковалентно присоединяется к объекту исследования; чаще всего ген FP клонируют в одной рамке считывания с геном изучаемого белка, и в результате их экспрессии образуются слитные белки. Поскольку GFP и его родственники характеризуются высокой инертностью, в общем случае предполагают, что они не мешают исследуемым объектам выполнять их функции, и тогда FP служат попросту флуоресцентной меткой. Мы решили распространить использование FP на область полипептидных нейротоксинов, связывающихся с ионными каналами (будем далее обозначать их Tx). В этом случае слитные белки вида FP-Tx характеризуются модульным строением с разделением функций: модуль FP, как и в других случаях, служит флуоресцентной меткой, а вот модуль Tx способен селективно связываться с определенными ионными каналами. Тогда FP-Tx можно использовать как молекулярный инструмент для визуализации этих объектов.

3.10.1. Слитные конструкты FP-KTx

Вначале мы решили получить FP-Tx, у которых модулем Tx является блокатор K^+ каналов (KTx). Этот выбор был обусловлен следующими обстоятельствами: (а) среди KTx находят соединения с высочайшей аффинностью и селективностью; (б) это сравнительно небольшие пептиды (см. Обзор литературы, раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов»); (в) они легко могут быть получены в гетерологичной системе экспрессии (см. раздел «Получение рекомбинантных α-KTx» Результатов); (г) известна структура комплекса KTx с K^+ каналом (см. рисунок 9) (347), из которой следует, что N- и C-концевые области токсина слабо взаимодействуют или вовсе не взаимодействуют с каналом, а значит их модификация не должна приводить к существенным изменениям активности.

3.10.1.1. Получение химер eGFP-OSK1 и RFP-AgTx-2

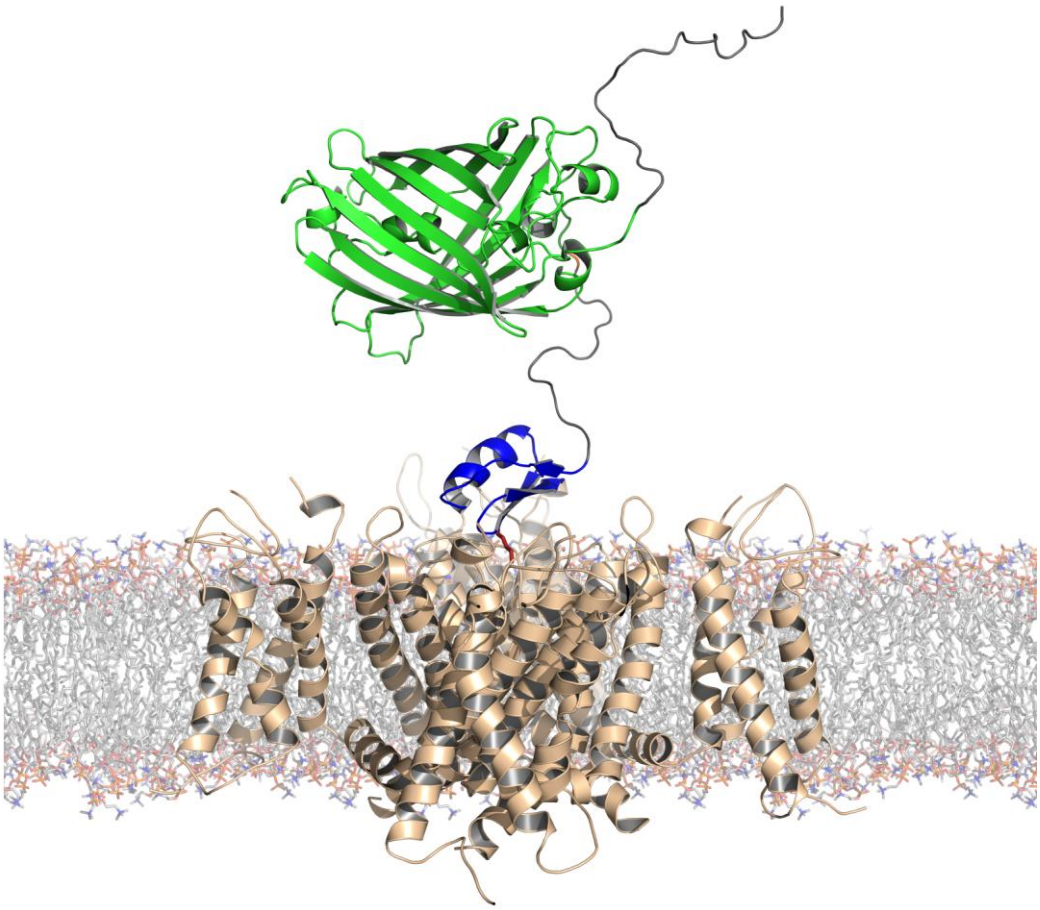
Мы разработали две конструкции, кодирующие FP-Tx (рисунок 101). Мы выбрали два хорошо изученных KTx: OSK1 из яда *O. scrobiculosus* (α-KTx 3.7) (333) и AgTx-2 из *L. quinquestriatus hebraeus* (α-KTx 3.2; см. Обзор литературы, раздел «Поровые блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов»; аминокислотные последовательности приведены в таблице 7) (332). Мы также выбрали два FP: eGFP (FPbase ID: R9NL8) и TagRFP (S4HC8). Оба характеризуются высокой яркостью и способностью сохранять мономерную форму даже при высоких концентрациях и широко используются в качестве меток *in vitro* и *in vivo*.

Рисунок 101. Структура eGFP-OSK1. (А) Аминокислотная последовательность химерного белка. Участки окрашены: eGFP зеленым, OSK1 синим; остаток глутамата, использованный для разделения модулей, оранжевым; ключевой остаток лизина — красным; His-таг выделен курсивом. (Б) Молекулярная модель комплекса K_v и eGFP-OSK1. Модули FP-Tx окрашены аналогично панели (А). Модель построена по гомологии с известными структурами eGFP (PDB ID: 2Y0G), OSK1 (1SCO) и комплекса CTX с химерой K_v1.2/K_v2.1 (4JTA).

А

MGSS*HHHHHH*SSGLVPRGSHMMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSG
EGEGDATYGKLTLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVQCFSRYPDHMKQHDFF
KSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNIL
GHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGD
GPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMVLLEFVTAAGITLGMDELYEGGGGS
GGGGSGGGGSGVIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK

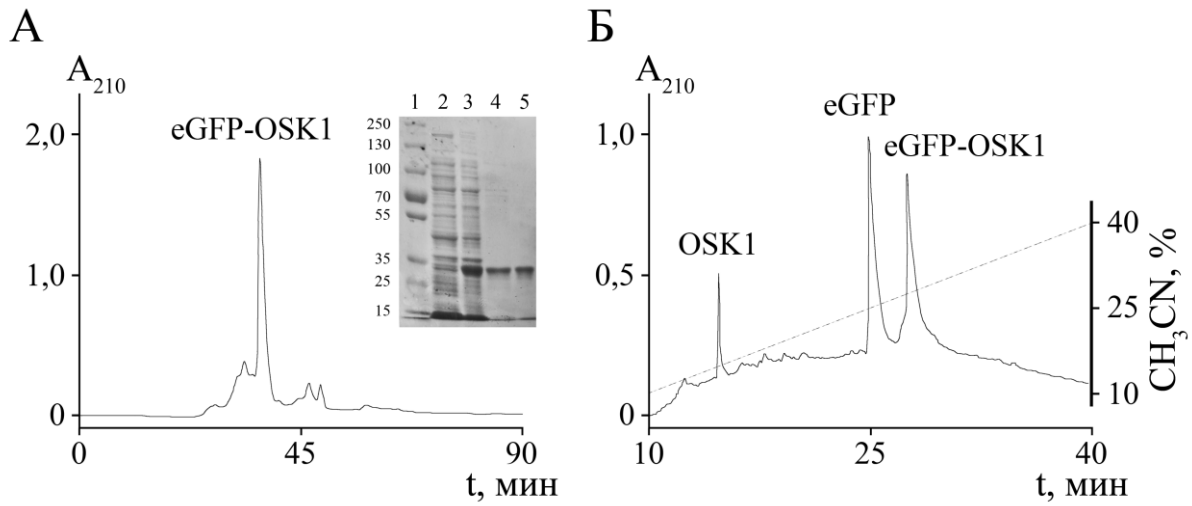
Б



Гены, кодирующие химеры eGFP-OSK1 и RFP-AgTx-2, экспрессировали в *E. coli* BL21(DE3) и Rosetta-gami B(DE3)pLysS, белки выделяли из лизатов с помощью аффинной хроматографии и очищали с помощью гель-фильтрации (рисунок 102А). Корректность структуры подтверждали с помощью МС и селективного протеолиза. Так, расщепление eGFP-OSK1 эндопротеиназой Glu-C приводило к образованию двух фрагментов (см. рисунки 101А и 102Б), измеренные Мм которых соответствовали расчетным. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции eGFP-OSK1 и RFP-AgTx-2 (рисунок 103А, Б) были идентичны на-

тивным eGFP и TagRFP. Выход рекомбинантных eGFP-OSK1 и RFP-AgTx-2 достигал 100 мг/л питательной среды.

Рисунок 102. Выделение и расщепление химерного белка eGFP-OSK1. (А) Очистка eGFP-OSK1 с помощью гель-фильтрации на колонке TSK 2000SW (7,5×600 мм). Во вставке приведены результаты электрофоретического разделения образцов, отобранных в ходе получения рекомбинантного белка. Использовали ДСН-ПААГ (12%). На дорожку 1 нанесены молекулярные стандарты (5 мкл PageRuler Plus Prestained Protein Ladder), Мм указаны слева. На дорожку 2 нанесен лизат клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих плазмиду pET-28a-eGFP-OSK1, до индукции; 3 — после индукции экспрессии 0,5 мМ ИПТГ; 4 — очищенный с помощью IMAC белок; 5 — дополнительная очистка гель-фильтрацией. (Б) ОФ-ВЭЖХ гидролизата eGFP-OSK1, расщепленного эндопротеиназой Glu-C. Использовали колонку Vydac C_{18} (4,6×250 мм), элюцию проводили линейным градиентом концентрации ацетонитрила (пунктирная линия). Идентифицированные полипептиды указаны подписями над пиками.

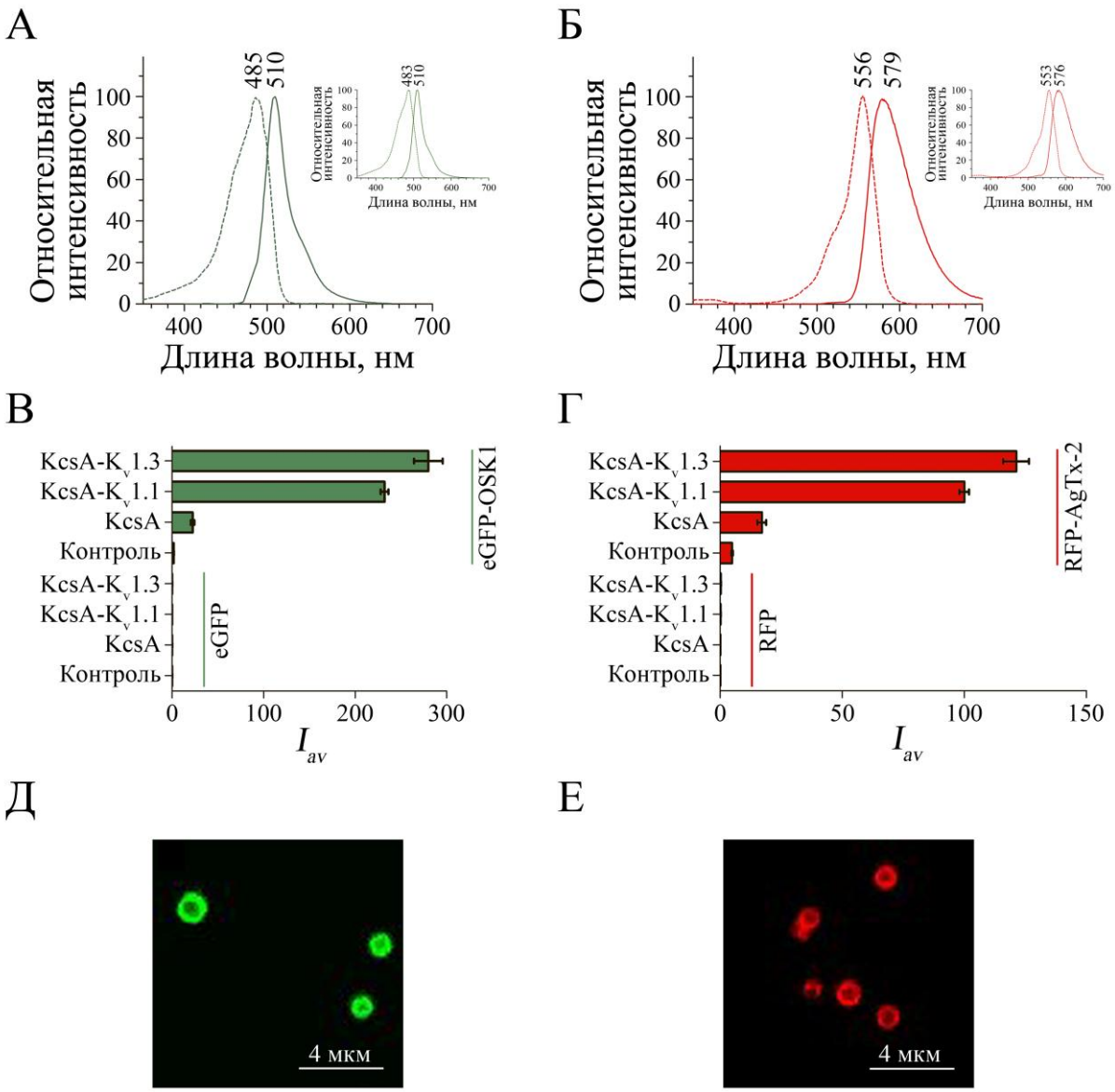


3.10.1.2. Свойства eGFP-OSK1 и RFP-AgTx-2

Активность химер FP-Tx в сравнении с исходными токсинами мы тестировали на K_v методом двухэлектродной фиксации потенциала (см. таблицу 47). FP-Tx хорошо воспроизводят фармакологические свойства интактных токсинов. Неожиданно оказалось, однако, что обе химеры утратили активность на K_v1.2. Это означает, что перед использованием активность полученных химер необходимо подтверждать.

Мы также использовали упоминавшуюся систему на основе химерных каналов KcsA-K_v (см. выше раздел «Использование аналитической системы на основе химеры KcsA-K_v1.1»). Обе химеры FP-Tx были способны связываться со сферопластами *E. coli,* содержащими химерные каналы, и ярко флуоресцировать (рисунок 103B–E). Они показали зависимое от концентрации связывание с насыщением и не связывались со сферопластами без химерных каналов. Связывание было специфичным и обратимым; FP-Tx вытеснялись из комплексов поровыми блокаторами K_v, включая OSK1, AgTx-2 и TEA.

Рисунок 103. Флуоресценция FP-Tx и связывание с химерными каналами KcsA-K_v. (А, Б) Спектры возбуждения (пунктирные линии) и испускания флуоресценции (сплошные линии) eGFP-OSK1 (А) и RFP-AgTx-2 (Б). На вставках показаны спектры возбуждения и испускания интактных eGFP и TagRFP. (В, Г) Связывание eGFP-OSK1 и eGFP (20 нМ; В), а также RFP-AgTx-2 и RFP (10 нМ; Г) со сферопластами, содержащими KcsA-K_v1.3, KcsA-K_v1.1 и KcsA, а также контрольными сферопластами без рекомбинантных каналов. Представлены средние значения ± SE (n = 3). (Д, Е) Типичные конфокальные флуоресцентные изображения сферопластов, содержащих KcsA-K_v1.3, окрашенных eGFP-OSK1 (Д), и сферопластов, содержащих KcsA-K_v1.1, окрашенных RFP-AgTx-2 (Е).



Собственно использование в системах на основе химерных каналов KcsA-K_v вместо лигандов, химически модифицированных красителем (как AgTx-2-TAMRA, см. раздел «Химерные KcsA-K_v каналы и флуоресцентная микроскопия» Методов), — одна из возможных областей применения созданных нами инструментов. Чтобы продемонстрировать, что FP-Tx можно использовать для скрининга лигандов в таких системах, мы изучили влияние различ-

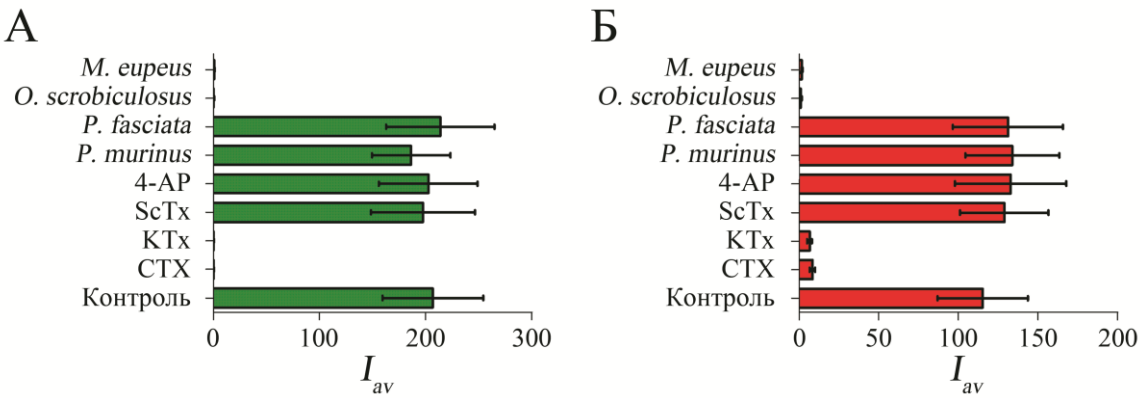
ных блокаторов K_v и цельных ядов на связывание FP-Tx со сферопластами, содержащими KcsA-K_v1.3 (рисунок 104).

Таблица 47. Активность токсинов и слитных конструктов FP-KTx на K_v.

Лиганд	Канал					
	K_v1.1		K_v1.3		K_v1.6	
	IC_{50}, нМ	*h*	IC_{50}, нМ	*h*	IC_{50}, нМ	*h*
OSK1	72 ± 14	0,8 ± 0,1	6 ± 2	1,1 ± 0,2	71 ± 11	0,9 ± 0,1
eGFP-OSK1	90 ± 17	0,9 ± 0,1	8 ± 2	1,0 ± 0,1	66 ± 5	1,1 ± 0,1
AgTx-2	2,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	9 ± 2	1,2 ± 0,2	92 ± 10	1,3 ± 0,2
RFP-AgTx-2	3,0 ± 0,4	0,9 ± 0,1	83 ± 13	1,2 ± 0,2	94 ± 16	1,0 ± 0,1

Представлены средние значения ± SE (n ≥ 3).

Рисунок 104. Применение FP-Tx и сферопластов *E. coli* в качестве инструмента скрининга. Влияние блокаторов K^+ каналов CTX (300 нМ), KTX (30 нМ), сциллатоксина (ScTx, 1 мкМ) и 4-аминопиридина (4-AP, 10 мМ) и цельных ядов (38 мкг/мл) *M. eupeus*, *O. scrobiculosus*, *Poecilotheria fasciata* и *Pterinochilus murinus* на связывание 5,6 нМ eGFP-OSK1 (А) и RFP-AgTx2 (Б) со сферопластами, содержащими KcsA-K_v1.3. Показаны средние значения ± SE (n = 3).



Вытеснение FP-Tx из комплекса с KcsA-K_v1.3 свидетельствует о присутствии поровых блокаторов K_v в анализируемом образце. Как и ожидалось, CTX и KTX конкурировали с FP-Tx за связывание со сферопластами, в то время как сциллатоксин (P16341; α-KTx 5.1), блокатор K_{Ca} (1165), и 4-аминопиридин, низкомолекулярный блокатор, который связывается с внутренней полостью K_v (1166), не вытесняли FP-Tx. eGFP-OSK1 и RFP-AgTx2 вытеснялись из комплекса с KcsA-K_v1.3 ядами скорпионов, содержащими блокаторы K_v, но не пауков, в ядах которых отсутствуют такие соединения (рисунок 104).

3.10.2. Слитные конструкты FP-3FTx

На следующем этапе мы решили продемонстрировать возможность получения FP-Tx, у которых модулем Tx служит токсин какого-либо другого типа, отличный от KTx. Наш выбор пал на 3FTx. Дело в том, что с токсинов такого типа началась современная эра токсинологии (см. Введение), и в ИБХ РАН ими традиционно и успешно занимаются (вначале Е.В. Гришин, а теперь приоритет у отдела под руководством В.И. Цетлина, в сотрудничестве с которым мы и выполнили эту работу).

3.10.2.1. Получение химеры eGFP-α-CbTx

Мы выбрали хорошо изученный α-CbTx (PDB ID: P01391) из моноклевой кобры *Naja kaouthia* (1167), который с высокой аффинностью и практически необратимо связывается с nAChR мышечного типа, а также нейрональными α7 и α9/α10 nAChR (1168). Химерный белок eGFP-α-CbTx мы получили аналогично eGFP-OSK1 — путем экспрессии его гена в *E. coli* и очистки с помощью аффинной хроматографии и гель-фильтрации. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции eGFP-α-CbTx были идентичны нативному eGFP. Выход рекомбинантного eGFP-α-CbTx составил 10 мг/л питательной среды.

3.10.2.2. Активность eGFP-α-CbTx

Мы оценили аффинность eGFP-α-CbTx к nAChR мышечного типа из электрического органа *T. californica* и нейрональному α7 nAChR человека, экспрессируемому в клетках GH_4C_1, а также к AChBP из *L. stagnalis*, который является гомологом лиганд-связывающего домена nAChR. Эксперименты выполнили путем измерения способности eGFP-α-CbTx конкурировать с ^{125}I-α-BgTx, используемым в качестве радиолиганда. Полученные кривые ингибирования показаны на рисунке 105, а значения IC_{50} и коэффициента Хилла представлены в таблице 48. Для сравнения мы использовали немеченый α-CbTx и этот же токсин, меченный по остатку K23 химическим красителем — разработанным в ИБХ РАН аналогом хромофора GFP (5Z)-5-[(2-дифторборил-4-гидроксифенил)-метилиден]-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-оном (*p*-HOBDI-BF_2) (1169) (*p*-HOBDI-BF_2-α-CbTx).

Модификация α-CbTx с помощью eGFP привела к снижению сродства ко всем трем мишеням: в ≈270, 170 и 10 раз для nAChR мышечного типа, α7 и AChBP, соответственно. Введение химической метки *p*-HOBDI-BF_2 тоже снизило сродство, но в меньшей степени: в ≈2–10 раз. Интересно, что сам eGFP продемонстрировал способность конкурировать с ^{125}I-α-BgTx за связывание с nAChR из *T. californica,* пусть и слабую (рисунок 105A), но когда N-концевой His-таг был удален, эта ингибирующая активность исчезла (данные не показаны).

Рисунок 105. Радиолигандный анализ связывания eGFP-α-CbTx с nAChR. Ингибирование начальной скорости связывания ^{125}I-α-BgTx с nAChR (А) электрического органа *T. californica*, (Б) α7 nAChR человека и (В) AChBP из *L. stagnalis* с помощью α-CbTx (□), eGFP-α-CbTx (△), *p*-HOBDI-BF_2-α-CbTx (○) и eGFP (×). Данные представлены как средние значения ± SE (n = 3).

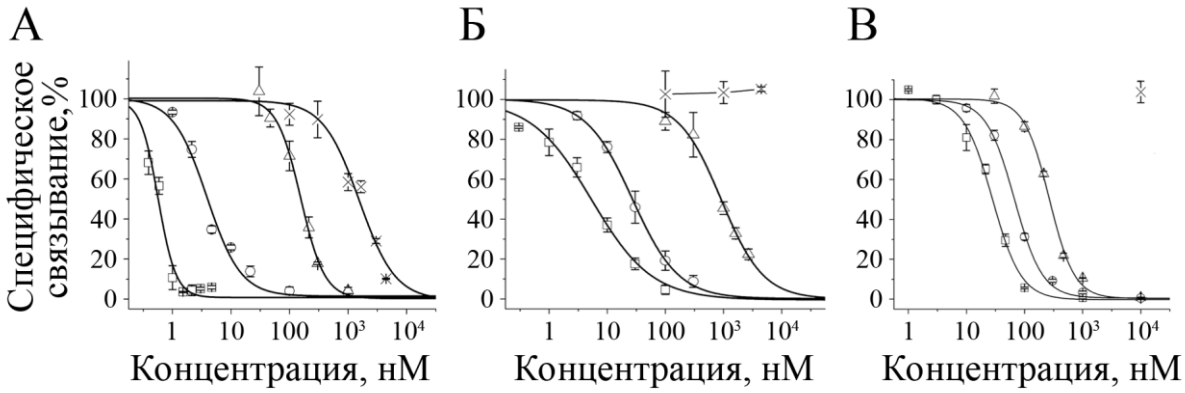


Таблица 48. Активность α-CbTx и eGFP-α-CbTx на nAChR.

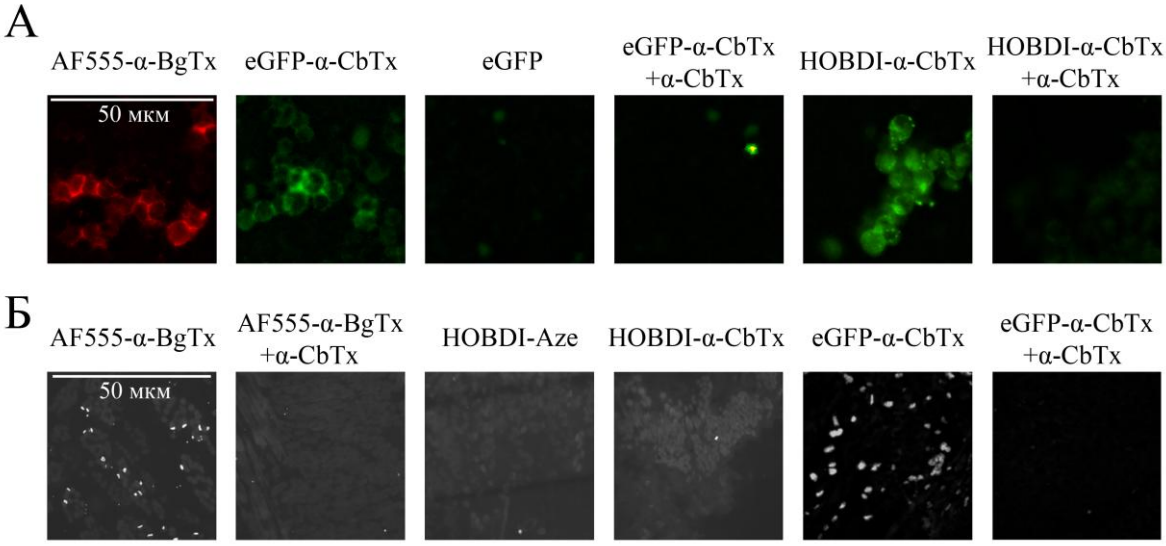
Лиганд	Рецептор					
	T. californica nAChR		α7 nAChR человека		AChBP из *L. stagnalis*	
	IC_{50}, нМ	*h*	IC_{50}, нМ	*h*	IC_{50}, нМ	*h*
α-CbTx	0,57 ± 0,03	2,86 ± 0,34	5,4 ± 0,4	0,84 ± 0,05	28 ± 1	1,76 ± 0,12
eGFP-α-CbTx	155 ± 5	2,10 ± 0,10	912 ± 36	1,20 ± 0,05	266 ± 7	2,01 ± 0,09
eGFP	1550 ± 120	1,41 ± 0,15	>4500		>10 000	

Представлены средние значения ± SE (n = 3).

3.10.2.3. Использование eGFP-α-CbTx для мечения nAChR

Для демонстрации применимости химеры eGFP-α-CbTx в качестве молекулярного инструмента мы использовали клетки Neuro-2a, экспрессирующие α7 nAChR человека, и препарат языка крысы, содержащий мышечные волокна с концевыми пластинками, где имеется мышечный α1β1εδ nAChR (рисунок 106). С помощью флуоресцентной микроскопии мы наблюдали яркое специфическое окрашивание клеток Neuro-2a и срезов языка при инкубации с 500 нМ eGFP-α-CbTx. Это окрашивание устранялось предварительной инкубацией с 30–50-молярным избытком α-CbTx в течение 1 ч, а eGFP сам по себе не окрашивал препараты, что подтверждает специфичность связывания химеры с nAChR. Для сравнения мы использовали упомянутый ранее *p*-HOBDI-BF_2-α-CbTx, линейный пептид аземиопсин (PDB ID: B3EWH2) (1170), ингибирующий nAChR и тоже меченный *p*-HOBDI-BF_2, и α-BgTx, меченный другим химическим красителем — Alexa Fluor 555 (AF555-α-BgTx).

Рисунок 106. Применение FP-3FTx для мечения nAChR. Флуоресцентные микрофотографии клеток Neuro-2a, экспрессирующих α7 nAChR человека, и препарата языка крысы с мышечными волокнами. (А) Окрашивание клеток Neuro-2a с помощью AF555-α-BgTx (50 нМ) и химерного белка eGFP-α-CbTx (500 нМ). Интактный eGFP не окрашивает клетки. Окрашивание eGFP-α-CbTx устраняется при предварительной инкубации с 15 мкМ α-CbTx. (Б) AF555-α-BgTx (100 нМ) окрашивает концевые пластинки в поперечных срезах языка крысы, окрашивание не наблюдается в срезах, предварительно обработанных 5 мкМ α-CbTx. Химерный белок eGFP-α-CbTx (500 нМ) также ярко окрашивает срезы, что предотвращается предварительной обработкой 15 мкМ α-CbTx.



3.10.3. Значение исследования слитных конструктов FP-Tx

Мы показали принципиальную реализуемость мечения полипептидных лигандов ионных каналов и нейрорецепторов с помощью FP. Более того, мы продемонстрировали, что этот подход может быть использован для различных Tx и различных FP. Можно ожидать разработки богатого ассортимента FP-Tx различных цветов и с различной селективностью. Наконец, мы показали, что полученные нами химерные белки FP-KTx и FP-3FTx могут быть использованы как молекулярные инструменты в скрининговых системах и для локализации соответствующих мишеней в клетках и тканях. Этим возможости использования меченых токсинов не ограничивается (см. Обзор литературы, раздел «Токсины паукообразных как молекулярные инструменты исследования нервной системы»), и мы ожидаем, что предложенные нами FP-Tx найдут разнообразные области применения. В настоящее время наши ожидания отчасти оправдываются: наши коллеги занимаются расширением ассортимента FP-KTx (1171-1173); мы же показали, что подход применим к прокариотическому каналу KcsA (1174).

Результаты, касающиеся слитных конструктов FP-Tx и представленные здесь, опубликованы (1174-1177).

3.11. Мембрано-активные токсины из яда пауков

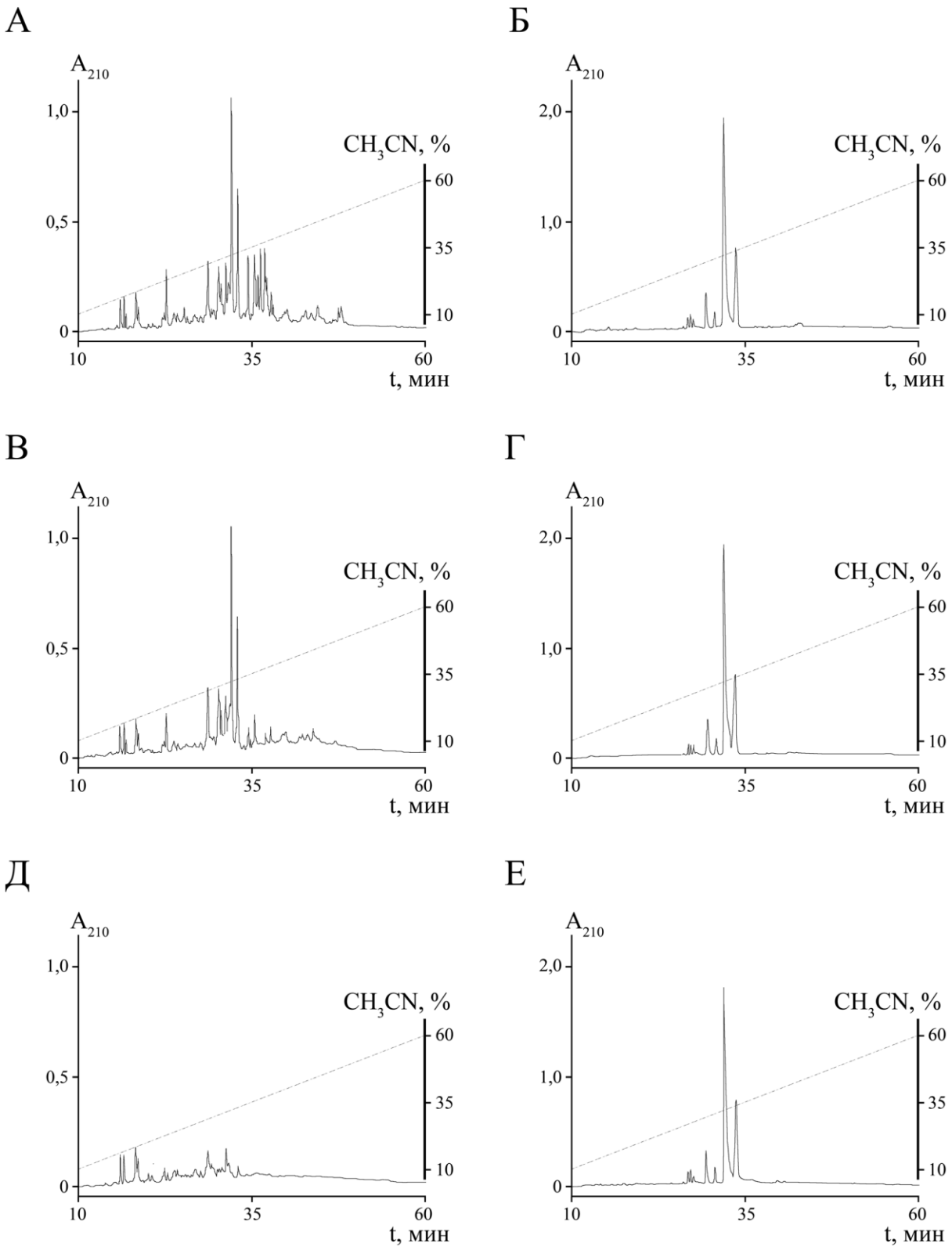
3.11.1. Яд паука Lachesana tarabaevi *— уникальный источник мембрано-активных токсинов*

Инкубация цельного яда паука-муравьеда *Lachesana tarabaevi* (NCBI/UniProt taxon identifier: 379576; семейство Zodariidae) с суспензией гигантских липосом (1000 нм) из ДОФХ или ДОФЭ / ДОФГ с последующим осаждением центрифугированием приводила к исчезновению мембрано-активных компонентов из раствора. Анализ супернатанта с помощью ОФ-ВЭЖХ показал, что большинство компонентов яда *L. tarabaevi*, составляющие до 80% сухого веса, связываются с анионными липосомами (ДОФЭ / ДОФГ; рисунок 107А, Д). Соответствующие пики исчезли из профиля ОФ-ВЭЖХ после инкубации с липидными везикулами и центрифугирования. Кроме того, компоненты, элюирующиеся с C_5-колонки при концентрации ацетонитрила выше ≈30% и составляющие ≈30% веса сухого яда, также взаимодействовали с цвиттерионными липосомами (ДОФХ; рисунок 107В). Таким образом, большинство компонентов яда *L. tarabaevi* являются мембрано-активными. Следует отметить, что такая же процедура с ядом воронкового паука *A. orientalis* (семейство Agelenidae; см. посвященный этому яду раздел «Токсины из яда паука *Agelena orientalis*» выше) не приводила к изменению профиля ВЭЖХ (рисунок 107Б, Г, Е).

Наша предыдущая работа была посвящена исследованию мембрано-активных и цитолитических компонентов яда *L. tarabaevi* (99). С помощью комбинации методов физико-химической и молекулярной биологии нам удалось выделить в очищенном виде и осуществить характеристику нескольких относительно коротких (~20–35 а.о.) цитолитических и антимикробных пептидов — латарцинов (Ltc; от англ. latarcin, акроним *La*chesana *tar*abaevi и -cin, суффикс, обозначающий антибиотические свойства). В настоящее время латарцины — одни из наиболее интенсивно изучаемых АМП (см. соответствующий раздел Обзора литературы; на рисунке 3 показана пространственная организация Ltc 1 и 2a в суспензии мицелл ДСН, рисунок 4 иллюстрирует цитолитическую активность Ltc 2a) (107, 1178).

Кроме того, мы обнаружили сравнительно короткие Rpe (от англ. repetitive polypeptide elements, повторяющиеся полипептидные элементы; 18 а.о.; название происходит из описания структуры белков-предшественников Ltc 4a/b; см. диаграмму на рисунке 33, панель Г, голубой цвет), сравнительно длинные мет-лизины (MLys; 51 а.о.; название происходит от высокого содержания остатков метионина и лизина) и «гигантские» цитоинсектотоксины (CIT; 61–79 а.о.; название указывает на их высокую цитолитическую и инсектицидную активность; см. подробней ниже в разделе «Модульное строение цитоинсектотоксинов») (281). Аминокислотные последовательности этих полипептидов приведены в таблице 49. На следующем этапе мы решили осуществить более полную характеристику яда *L. tarabaevi*.

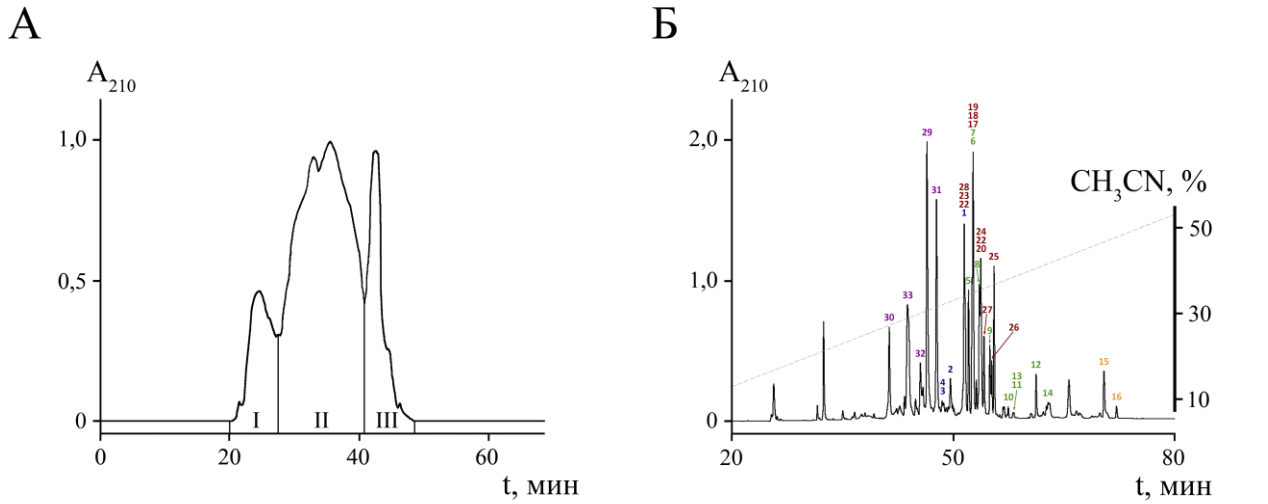
Рисунок 107. Соосаждение компонентов яда пауков с липосомами. Анализ выполнен для яда *L. tarabaevi* (А, В, Д) и *A. orientalis* (Б, Г, Е). Яд инкубировали в фосфатном буфере (А, Б), суспензии цвиттерионных (В, Г) или анионных гигантских липосом (Д, Е). Показаны профили разделения водных растворов, оставшихся после центрифугирования образцов, с помощью ОФ-ВЭЖХ на колонке Jupiter C_5 (4,6×250 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром.



3.11.1.1. Выделение мембрано-активных токсинов из яда *L. tarabaevi*

Цельный яд сначала фракционировали с использованием эксклюзионной хроматографии (рисунок 108А), активную фракцию II подвергали дальнейшему разделению с помощью ОФ-ВЭЖХ (рисунок 108Б). МС анализ и сравнение хроматографических профилей позволили нам обнаружить все ранее описанные компоненты. Кроме того, мы идентифицировали шесть новых мембрано-активных полипептидов (рисунок 108Б, таблица 49). Эти компоненты были подвергнуты дополнительным стадиям ОФ-ВЭЖХ для очистки, и в результате все вещества были получены в индивидуальном состоянии, их Мм были измерены с помощью МАЛДИ МС, а первичная структура была установлена с помощью секвенирования по Эдману и селективного протеолиза (таблица 49).

Рисунок 108. Разделение яда *L. tarabaevi*. (А) Эксклюзионная хроматография цельного яда на колонке TSK 2000SW (7,5×600 мм). Фракции обозначены римскими цифрами. (Б) ОФ-ВЭЖХ фракции II из (А) на колонке Vydac C_{18} (4,6×250 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Цветные числа обозначают компоненты, идентифицированные в яде, и соответствуют столбцу «#» в таблице 49. Цветовая схема соотносит отдельные компоненты с классами: синий для Rpe, зеленый — Ltc, желтый — MLys, красный — CIT, пурпурный — LtTx.



В яде *L. tarabaevi* содержатся четыре коротких пептида, элюирующиеся относительно рано (при ≈30% ацетонитрила), 11 латарцинов и 12 цитоинсектотоксинов, элюирующиеся при ≈35–40% ацетонитрила, а также два MLys со сравнительно большим временем удерживания (элюируются при ≈45% ацетонитрила). Все эти компоненты взаимодействуют как с анионными, так и с цвиттерионными липосомами и не содержат остатков цистеина (попытка восстановления и алкилирования тиольных групп не привела к увеличению Мм). Кроме того, мы обнаружили пять компонентов, осаждающихся только с анионными липосомами и элюирующихся в области ≈25–30% ацетонитрила. Эти сравнительно длинные полипептиды (Мм ≈

6,5–8,5 кДа) содержат 4–5 дисульфидных связей и получили название «латартоксинов» (LtTx; от англ. *La**chesana** tar**abaevi* toxins; подробное описание см. ниже в разделе «Латартоксины, модульные токсины из яда паука *Lachesana tarabaevi*»).

3.11.1.2. Биологическая активность Rpe, MLys и CIT

Инсектицидную активность очищенных компонентов яда тестировали на личинках мясной мухи *S. carnaria*. CIT 2–4 вызывали летальные эффекты, значения $ЛД_{50}$ лежат в диапазоне 40–75 мкг/г (таблица 50). В соответствии со своим цитолитическим механизмом действия CIT вызывали появление некротических пятен и вытекание жидкости из отверстия, оставшегося после введения шприца. Ни Rpe, ни MLys не проявляли токсичности в дозе 600 мкг/г.

При анализе антибактериальной активности только CIT продемонстрировали высокую способность ингибировать рост как грамположительных (*B. subtilis*), так и грамотрицательных (*E. coli*) бактерий со значениями МИК в диапазоне 0,63–10 мкМ (таблица 50). Для MLys и Rpe антимикробный эффект не наблюдали в концентрации 20 мкМ.

3.11.1.3. Уникальный состав яда *L. tarabaevi*

Как было сказано в Обзоре литературы, в большинстве изученных к настоящему времени ядов паукообразных главная роль принадлежит дисульфид-богатым нейротоксинам, а цитолитические пептиды, по-видимому, выполняют вспомогательные функции. Совершенно неожиданно оказалось, что паук *L. tarabaevi* «выбрал» противоположную стратегию: в его яде преобладают цитолитические мембрано-активные пептиды. Интересно также то обстоятельство, что бóльшую часть его яда (свыше 50%, если оценивать по площади хроматографических пиков) составляют не обычные короткие однодоменные пептиды, как у большинства исследованных пауков, а сравнительно длинные «модульные» токсины (см. подробней ниже) с Мм ≈ 6,5–8,5 кДа. Это заметно и при разделении цельного яда с помощью электрофореза (рисунок 40, дорожка 7). Таким образом, исследованный нами паук *L. tarabaevi* уникален с точки зрения состава яда.

Результаты исследования яда *L. tarabaevi* опубликованы (1179).

Таблица 49. Аминокислотные последовательности мембрано-активных полипептидов из яда *L. tarabaevi*.

Название	UniProt ID	#*	Последовательность	Мм, Да
			Повторяющиеся пептидные элементы	
Rpe 1a	Q1ELU5	1	GGIDRKLMEVVNNLRKVQ-NH_2	2068,5
Rpe 1b	Q1ELU5	2	GGINRKLMEMVNNLRKVQ-NH_2	2099,6
Rpe 1c	Q1ELU4	3	GGINRKLMEMVNKLRKVQ-NH_2	2113,6
Rpe 1d	Q1ELU4	4	AGINRKLMEMVNKLRKVQ-NH_2	2127,7
			Латарцины	
Ltc 1	Q1ELT9	5	SMWSGMWRRKLKKLRNALKKKLKGE	3074,0
Ltc 2a	Q1ELU1	6	GLFGKLIKKFGRKAISYAVKKARGKH	2902,7
Ltc 2b	Q1ELU0	7	GLFGKLIKKFGRKAISYAVKKARGKN	2879,7
Ltc 3a	Q1ELU3	8	SWKSMAKKLKEYMEKLKQRA-NH_2	2483,3
Ltc 3b	Q1ELU2	9	SWASMAKKLKEYMEKLKQRA-NH_2	2426,0
Ltc 4a	Q1ELU5	10	GLKDKFKSMGEKLKQYIQTWKAKF-NH_2	2902,7
Ltc 4b	Q1ELU4	11	SLKDKVKSMGEKLKQYIQTWKAKF-NH_2	2884,7
Ltc 5	Q1ELU9	12	GFFGKMKEYFKKFGASFKRRFANLKKRL-NH_2	3430,4
Ltc 6a	Q1ELU8	13	ZAFQTFKPDWNKIRYDAMKMQTSLGQMKKRFNL	4035,1
Ltc 7	Q1ELV0	14	GETFDKLKEKLKTFYQKLVEKAEDLKGDLKAKLS	3942,9
			Мет-лизины	
MLys 1a	C0HJV7	15	MDKLEEMALKLKDKLKTMAEKGAQMGEKLKEMLPKAIEKLKELTEKMKNKM-NH_2	5951,9
MLys 1b	C0HJV8	16	MDKLEEMALKLKDKLKTMAEKGAQMGEKLKEMLPKAMEKLKELMEKMKNKM-NH_2	6000,1
			Цитоинсектотоксины	
CIT 1a	P85253	17	GFFGNTWKKIKGKADKIMLKKAVKIMVKKEGISKEEAQAKVDAMSKKQIRLYLLKYYGKKALQKASEKL	7905,9
CIT 1b	P85254	18	GFFGNTWKKIKGKADKIMLKKAVKLMVKKEGISKEEAQAKVDAMSKKQIRLYLLKYYGKKALQKASEKL	7906,1
CIT 1c	P85255	19	GFFGNTWKKIKGKADKIMLKKAVKIMVKKEGISKEEAQAKVDAMSKKQIRLYVLKYYGKKALQKASEKL	7892,4
CIT 1d	P85256	20	GFFGNTWKKIKGKADKIMLKKAVKIMVKKEGITKEEAQAKVDAMSKKQIRLYLLKYYGKKALQKASEKL	7920,4
CIT 1e	P85257	21	GFFGNTWKKIKGKSDKIMLKKAVKIMVKKEGISKEEAQAKVDAMSKKQIRLYLLKYYGKKALQKASEKL	7921,9
CIT 1f	P85258	22	GFFGNTWKKIKGKADKIMLKKAVKIMVKKEGISKEEAQAKVDAMSKKQIRLYLLKHYGKKALQKASEKL	7880,2
CIT 1g	P85259	23	GFFGNTWKKIKGKADKIMLKKAVKIMVKKEGISKEEAQAKVDAMSKKQIRLYVLKHYGKKALQKASEKL	7866,1
CIT 1h	P85247	24	GFFGNAWKKIKGKAEKFFRKKAAKIIAKKEGITKEEAEAKVDTMSKKQIKVYLLKHYGKKALQKASEKL	7886,0
CIT 2a	C0HJV3	25	SWDSIWKSAKNKMDKIMRQKVAKWMAKKEGKSVEEVQAKVDAMSKKDIRLHVISHYGKKAFEQLSKSLE	8051,2
CIT 2c	C0HJV4	26	SWDSIWKSAKNKMDKIMRQKVAKWMAKKEGKSVEEVQAKVDAMSKKDIRMHVISHYGKKAFEQLSKSLEE	8198,8

Название	UniProt ID	#*	Последовательность	Мм, Да
CIT 3	C0HJV5	**27**	KSKWGKLWGKAKGVAKKGAKKVKKALLKALKKKLAKEMAKSKGVDYKEMKAKVMAMDKAKVLQEAMKILGKKAMDKYLS	8796,4
CIT 4	C0HJV6	**28**	GYKDYMSKAKDLYKDIKKDKRVKAVMKSSYMKEAKKLYKDNPVRDAYQVYKGVKAGGKLLF-NH_2	7128,9
			Латартоксины	
LtTx 1a	B3EWF2	**29**	E**C**IPTKHD**C**TNDRKN**CC**PGHE**C**K**C**YNTQIGGSKKEQ**C**G**C**KKSLLAKAKNFGGKVITIFKA	6570,3
LtTx 1b	B3EWF3	**30**	D**C**IPTRHE**C**TNNQQN**CC**EGHD**C**K**C**DYTEIGGAKKEI**C**Y**C**KKTLWQKTKDKLSTAGDILKS	6791,4
LtTx 2a	B3EWF4	**31**	E**C**IPLYND**C**TAFKYNNN**CC**KDPEKKYQYK**C**S**C**IV**C**KEGKEQ**C**T**C**QRKETVESMMK**C**VRFVKKVGEKVIEKV-NH_2	8334,0
LtTx 2b	B3EWF5	**32**	E**C**IPLYND**C**KEFKYNNN**CC**KDPEKKYQYK**C**S**C**IM**C**EGGEEQ**C**T**C**QRKETVENMMK**C**VRFVKKVVEKV-NH_2	7980,7
LtTx 2c	B3EWF6	**33**	E**C**VPLEND**C**TKLKYSNP**CC**KDEKKKYQYK**C**S**C**IVD--KTEQ**C**T**C**QRKETVEKMMKGMKYIKNLGKKI-NH_2	7669,7

Остатки, отличающиеся у полипептидов из одного и того же семейства, отмечены серым фоном. Для удобства сравнения в последовательность LtTx 2c внесен разрыв. Z, остаток пироглутаминовой кислоты; -NH_2, С-концевое амидирование. Остатки цистеина в LtTx выделены жирным. Измеренные средние Мм представлены в правой колонке. *Те же номера отмечены на рисунке 108 и выделены теми же цветами.

Таблица 50. Инсектицидная и антимикробная активность токсинов из яда *L. tarabaevi*.

	Rpe 1b	MLys 1a	CIT 2a	CIT 2c	CIT 3	CIT 4	LtTx 1a	LtTx 2a	LtTx 2c	LtTx 1a-C
					Инсектицидная активность ($ЛД_{50}$, мкг/г)					
S. carnaria	>600	>600	40	40	66	75	45	35	50	>170
					Антимикробная активность (МИК, мкМ)					
B. subtilis ВКМ B-501	>20	>20	0,6–1,25	0,6–1,25	0,3–0,6	1,25–2,5	>20			6,2
E. coli DH5α	>20	>20	1,25–2,5	1,25–2,5	1,25–2,5	5–10	>20			>50

Представлены значения $ЛД_{50}$ при введении в личинки мясных мух и МИК против бактерий.

3.11.2. Мембрано-активные токсины из яда паука Oxyopes takobius

Яд паука-«рыси» *O. takobius* (NCBI/UniProt taxon identifier: 666126; семейство Oxyopidae) был исследован ранее Ж. Корзо и др. (Национальный автономный университет Мексики) (245). Из яда этого паука были выделены цитолитические и антимикробные пептиды оксиопинины 1 и 2a–d (Oxt 1a и Oxt 2a–d; см. таблицы 3 и 51). Этот же яд послужил объектом при поиске эффективных инсектотоксинов, который проводился в рамках одного из проектов под руководством Е.В. Гришина. В ходе работ была выявлена высокая цитолитическая активность яда, чем и был обусловлен наш интерес к его дальнейшему изучению.

3.11.2.1. Выделение и секвенирование новых мембрано-активных токсинов из яда *O. takobius*

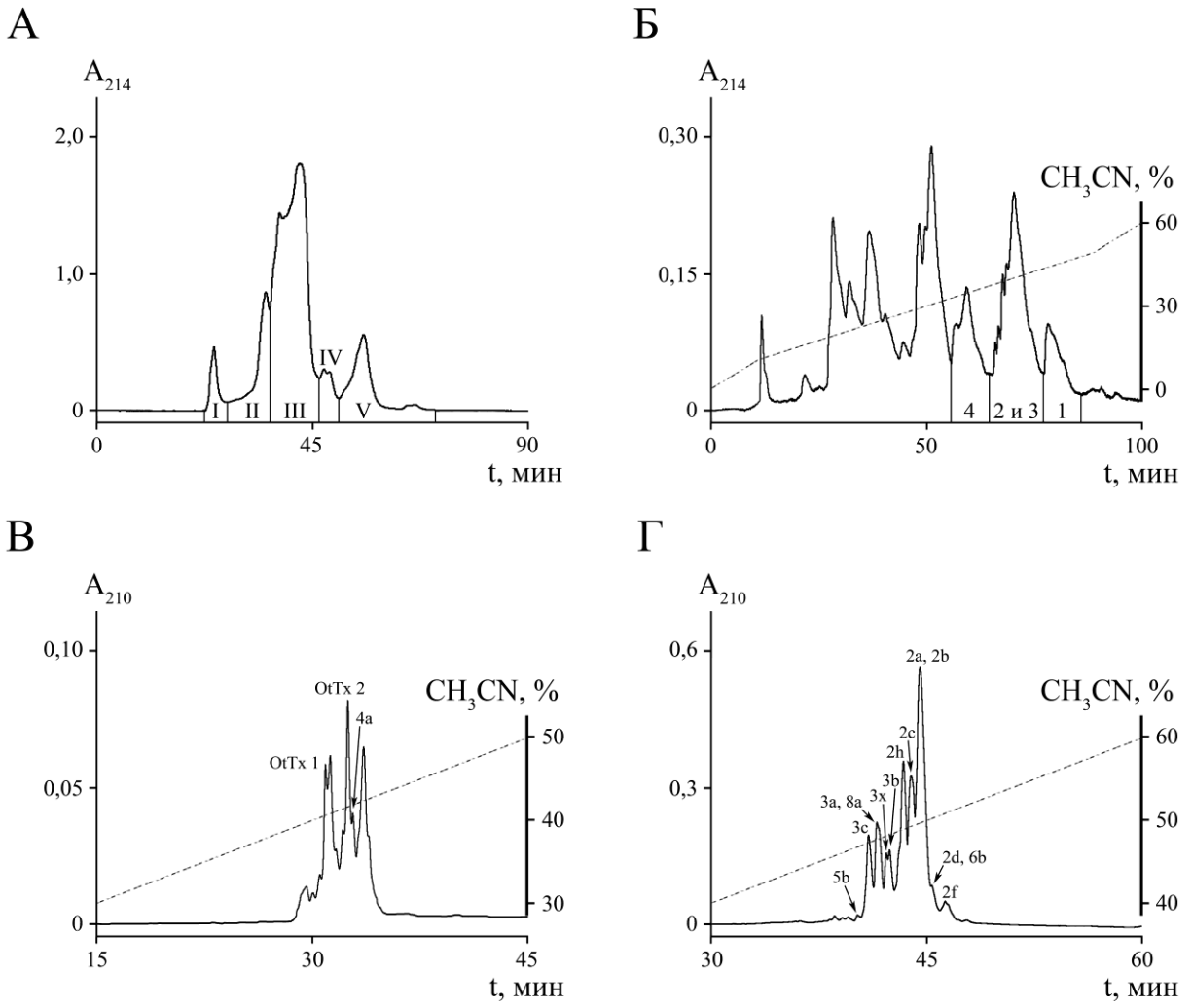
Для разделения яда *O. takobius* мы использовали гель-фильтрацию и две стадии ОФ-ВЭЖХ (рисунок 109). В результате мы обнаружили компоненты, описанные Ж. Корзо и др. Кроме того, мы получили несколько (суб)фракций, содержащих новые полипептиды, обладающие сильной антибактериальной активностью. Аминокислотные последовательности этих соединений приведены в таблице 51. В частности, мы обнаружили близкие гомологи Oxt 1a, получившие названия Oxt 1b и Oxt 1c, отличающиеся одним и тремя а.о., соответственно. Мы также обнаружили большое разнообразие новых Oxt 2 (2e–h), тоже отличающиеся точечными заменами от ранее известных. Ввиду близкого сходства этих новых пептидов с уже хорошо изученными токсинами, их активность дополнительно мы не изучали.

Во фракциях со временем элюции меньшим, чем для описанных ранее Oxt 1 и 2 (245), мы обнаружили сравнительно короткие линейные катионные пептиды, которые назвали оксиопининами 3a–c и x (Oxt 3a–c и x; рисунок 109Г). Эти пептиды содержат 25–26 а.о. и несут заряд +7/+8 при pH 7. А в еще одной из активных фракций (рисунок 109В) мы идентифицировали компонент, который назвали оксиопинином 4a (Oxt 4a), с измеренной Мм = 3612,5 Да. Автоматическая деградация по Эдману восстановленного и алкилированного пептида дала последовательность длиной 30 а.о. (UniProt ID: F8J4S0). Рассчитанная Мм (3614,5 Да) была больше, чем измеренная величина на 2 Да, алкилирование невосстановленного пептида не приводило к увеличению его Мм, что указывало на образование дисульфидной связи между C4 и C10 и отсутствие каких-либо других модификаций.

Отметим, что Oxt 3 и Oxt 4a не имеют гомологии с другими известными пептидами или белками. При этом Oxt 4a уникален среди токсинов паукообразных. Дело в том, что как было подробно описано в Обзоре литературы, две хорошо охарактеризованные группы токсинов паукообразных представляют собой линейные (без дисульфидов) пептиды с цитолитической активностью и дисульфид-содержащие (с тремя или более S-S-мостиками) пептиды,

обладающие нейротоксичностью. Oxt 4a не является линейным, но содержит только одну дисульфидную связь, резко контрастируя со всеми другими известными токсинами пауков. Поэтому его можно рассматривать как первый член нового семейства токсинов паукообразных с уникальными структурными особенностями.

Рисунок 109. Разделение яда *O. takobius*. (А) Эксклюзионная хроматография цельного яда на колонке TSK 2000SW (7,5×600 мм). Фракции обозначены римскими цифрами. (Б) ОФ-ВЭЖХ фракции III из (А) на колонке Delta-Pak C_4 (3,9×150 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Цифрами отмечены субфракции, содержащие оксиопинины (соответствуют номеру семейства). (В, Г) Повторная хроматография субфракций 4 (В) и “2 и 3” (Г) из (Б) на колонке Jupiter C_5 (2×150 мм). Цифрами с буквами отмечены субфракции, содержащие оксиопинины. На панели (В) также отмечены субфракции, содержащие спайдерины.



3.11.2.2. Анализ транскриптома ядовитых желез паука *O. takobius*

Библиотеку кДНК из ядовитых желез паука приготовили стандартным образом и секвенировали по Сэнгеру. Всего получили 762 нуклеотидные последовательности, которые преобразовали в 4 572 белковые (трансляция обеих цепей кДНК в трех рамках). Анализ транскриптома выполнили по процедуре, аналогичной подробно описанной выше для скорпиона *M. eupeus* (раздел «Анализ транскриптома ядовитых желез скорпиона *M. eupeus*»). В результате мы обнаружили последовательности предполагаемых предшественников 81 полипептида с мотивом ICK; изучение этого многообразия — дело будущего.

Все найденные предшественники ноттинов — препропептиды стандартной организации с мотивом PQM (рисунок 33, панель Б). Мы также обнаружили последовательности предшественников аналогичного строения, зрелая цепь которых не содержит мотива ICK. Среди них — предшественники Oxt 1a–c и 4a (pOxt 1a–c и 4a; GenBank IDs: MH890692 MH890686, MH890687, FN997582) и нескольких их близких гомологов (Oxt 1d–g, 4b и c; таблица 51), а также необычных линейных пептидов с высоким содержанием остатков аргинина, получивших названия Oxt 9a, 10a и b. Однако наибольший интерес представляет строение белков-предшественников других оксиопининов.

Предшественники Oxt 2a–h оказались и обычными («простыми»), и «двойными» и более сложными — с дополнительными пропоследовательностями, разделяющими зрелые цепи и содержащими мотивы PQM и iPQM (ср.: рисунок 33, панели В и Г). Мы обнаружили также последовательности, кодирующие близкие гомологи идентифицированных в яде пептидов (Oxt 2i–m). Наиболее протяженные последовательности были секвенированы лишь частично, поэтому в настоящее время мы не знаем полного разнообразия строения предшественников Oxt 2. Интересно, что из одного белка-предшественника (двойного; MH890691) образуются Oxt 2a и 2b, из другого (сложного; MW718832) — Oxt 2a и 2c, из третьего (тоже сложного; MW718833) — Oxt 2a и 2d. Обнаружился двойной предшественник (MW718837), вторая зрелая цепь которого сильно укорочена (только 9 а.о.). Некоторые предшественники (например, MW718839) вместо консервативного аргинина в iPQM содержат лизин. В настоящее время неизвестно, происходит ли синтез малой цепи и процессируются ли предшественники с измененным iPQM. Наконец, одинаковые зрелые оксиопинины могут образовываться из разных белков-предшественников (как в случае Oxt 2a) и занимать в их составе разное положение. Перечисленные наблюдения заставляют предполагать, что в данном случае мы имеем дело с эволюцией генного семейства Oxt 2 с перетасовкой экзонов, однако требуются дополнительные эксперименты для подтверждения этой гипотезы.

Белок-предшественник Oxt 3 (MH890690; установлена частичная последовательность) тоже оказался сложного строения; он содержит все три зрелых Oxt 3a–c, разделенных корот-

кими линкерами (7 а.о.: RSEEEAR и RSDEEVR), которые представляются максимально сближенными PQM и iPQM. Обнаружены другие последовательности, которые кодируют сложные предшественники линейных пептидов, сходных с оксиопининами (см. таблицу 51). pOxt 5-1 (MW718842) содержит сигнальный пептид, пропоследовательность и, по крайней мере, три зрелые цепи (Oxt 5a, 6a-1 и 7a-1), разделенные короткими линкерами. Аналогично pOxt 5-2 (MW718843) содержит, по крайней мере, четыре зрелые цепи (Oxt 5a, 6a-2, 7a-2 и 7b). pOxt 6-1 (MW718844) «четверной», он содержит четыре зрелые цепи (Oxt 8a, 5b, 6b и 3x); все соответствующие пептиды были идентифицированы в составе яда *O. takobius* (рисунок 109Г; Мм приведены в таблице 51), а их аминокислотные последовательности подтверждены с помощью МС/МС.

3.11.2.3. Биологическая активность новых токсинов

Мы получили синтетические оксиопинины 3b и 4a обычным твердофазным пептидным синтезом (с последующим окислением остатков цистеина у Oxt 4a). Мы показали, что синтетический Oxt 4a эквивалентен природному: они имеют одинаковую Мм, N-концевую последовательность, хроматографическую подвижность и активность против *E. coli*. Синтетические пептиды испытали на антимикробную активность против грамположительных (*B. subtilis, S. aureus*) и грамотрицательных бактерий (*E. coli, P. fluorescens*) и цитолитическую активность по отношению к эритроцитам человека. Пептиды проявляют сильную активность широкого спектра действия (таблица 52); активность Oxt 4a сравнима с таковой мелиттина из медоносной пчелы (254) или Ltc 2a из яда *L. tarabaevi* (см. выше) (107), двух хорошо изученных цитолитических пептидов.

Таблица 51. Аминокислотные последовательности мембрано-активных полипептидов из яда *O. takobius*.

Название	GenBank / UniProt ID	Последовательность	Мм, Да
		Оксиопинины	
Oxt 1a	P83247	FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKALAKSMADENAIRQQNQ	5221,1
Oxt 1b	C0HLF5	FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKALAKSLADENAIRQQNQ	5203,6
Oxt 1c	C0HLF6	FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKILPKAAKAGKSLAKSLADENAIRQQNQ	5232,9
Oxt 1d		FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKSLAKSLADENAIRQQNQ	
Oxt 1e		FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKALAKSMADENAIRQQN-	
Oxt 1f		FRGLAKLLKIALKSLARVIQKFLPKAAKAGKALVKSLADENAIKQQDQ	
Oxt 1g		FRGLAKLLKIALKSIARLVQKFLPKAAKAGKALVKSLADENAIKQQDQ	
Oxt 2a	P83248	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDLDKNQ	4126,8
Oxt 2b	P83249	GKFSGFAKILKSIAKFFKGVGKVRKQFKEASDLDKNQ	4147,2
Oxt 2c	P83250	GKLSGISKVLRAIAKFFKGVGKARKQFKEASDLDKNQ	4064,8
Oxt 2d	P83251	GKFSVFSKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDLDKNQ	4156,8
Oxt 2e	MW718838	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKEASDLDKNQ	4155,3
Oxt 2f	MW718837	GKFSIFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDLDKNQ	4141,0
Oxt 2g	MW718836	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDLDRNQ	4155,3
Oxt 2h	MW718834	GKFSGFAKVLRSIAKFFKGVGKVRKQFKEASDLDKNQ	4160,6
Oxt 2i	MW718840	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKKASDLDKNQ	
Oxt 2j	MW718835	GKFSVFGKILKSIAKFFKGVGKVRKQFKEASDLDKNQ	
Oxt 2k	MW718840	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKEAKDMDKNQ	
Oxt 2l	MW718841	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVRKVRKQFKEAKDLDKNQ	
Oxt 2m	MW718839	GKLSGISKVLRAIAKFFKGVGKVRKQFKEAKDLDKNQ	
Oxt 3a	C0HLF9	G-IKDYLKKLLQKAINKIKSLRKKQDA	3042,5
Oxt 3b	C0HLG0	G-VKDYFKKLLQKVINKIKSFRKKQEA	3137,7
Oxt 3c	C0HLG1	G-MKDYFKKLLQKVIKKIKSFRKKQD-	3099,6
Oxt 3x	MW718844	GKFGSVFKKLLKTVIRRLKAYKKSQS-	3011,9
Oxt 4a	F8J4S0	GIRCPKSWKCKAFKQRVLKRLLAMLRQHAF	3612,5
Oxt 4b	MW679716	RIRCPKSWKCKAFKQRVLKRLLAMLRQHAF	
Oxt 4c	MW679717	GIRCPKSWKCKAFKQSVLKRLLAMLRQHAF	
Oxt 5a	MW718842	-ESSHYFKKLLKKIRGMLDRFYQSAA-NH_2	
Oxt 5b	MW718844	GSRSHFLKKLLKRIRLMLNKYGRRH--NH_2	3108,0

Название	GenBank / UniProt ID	Последовательность	Мм, Да
Oxt 6a-1	MW718842	KFSFKKFLKKLRKRIMKSFRKM-NH_2	
Oxt 6a-2	MW718843	KFSFKKFLKKLRKRIMKSFRKI-NH_2	
Oxt 6b	MW718844	KFSFKKLLKKIKNKIMKTFRSM-NH_2	2744,6
Oxt 7a-1	MW718842	KVNQGFAKFLQQMKDKLKRVKT-NH_2	
Oxt 7a-2	MW718843	KVNEGFAKFLQQMKDKLKRVKT-NH_2	
Oxt 7b	MW718843	----KISPFLQQAKDKLKRVKA-NH_2	
Oxt 8a	MW718844	-RKMTLKRFLKAVKQLLQSRGL-NH_2	2514,1
Oxt 9a	MW679718	FRRWPRGPRIKNWTARYHWIGGIPRPWRNKFKAVKKHNH	
Oxt 10a	MW679719	FWGLHKIRSHRRWPIGIITVYKPRRLKYLRKKHY	
Oxt 10b	MW679720	FWGLHKIRSHRRWPIGVVHHYKPRRLKDYRRKHH	
		Спайдерины	
OtTx 1a	P86716	KFK-----WGKLFSTAKKLYKKGKKLSKNKNFKKALKFGKQLAKNLQAGEEHEPGTPVGNNKCWAIGTTCSDDCDCCPEHHCHCPAGKWLPGLFRCTCQVTESDKVNKCPPAE	12 030
OtTx 1b	P86717	KFK-----WGKLFSAAKKLYKKGKKLSKNKNFKKALKFGKQLAKNLQAGEEHEPGTPVGNNKCWAIGTTCSDDCDCCPEHHCHCPAGKWLPGLFRCTCQVTESDKVNKCPPAE	
OtTx 2a	P86718	KFKLPKINWGKLASKAKDVYKKGQKLAKNKNVKKALKYGKQLAENLAAGEVHEPGTPVGNNKCWAIGTRCTDDCDCCPEHHCHCPAKSWTFGLIPCSCQVTESDKVNKCPPAE	12 415
OtTx 2b	P86719	KFKFPKINWGKLASKAKDVYKKGQKLAKNKNVKKALKYGKQLAENLAAGEVHEPGTPVGNNKCWAIGTRCTDDCDCCPEHHCHCPAKSWTFGLIPCSCQVTESDKVNKCPPAE	

Остатки, отличающиеся у полипептидов из одного и того же семейства, отмечены затемнением. Для удобства сравнения в последовательности внесены разрывы и/или добавлены прочерки. Остатки цистеина выделены желтым фоном. Измеренные средние Мм представлены в правой колонке.

Таблица 52. Антимикробная активность пептидов из яда *O. takobius*. Представлены значения МИК (мкМ) против бактерий.

Штамм	Oxt 3b	Oxt 4a	OtTx 1a	OtTx 1a-AMP	OtTx 1a-ICK
A. globiformis ВКМ Ac-1112			0,6–1,25	0,6–1,25	>25
B. subtilis ВКМ B-501		0,25–0,5	0,12–0,25	0,12–0,25	>25
E. faecalis ATCC 29212	5–10			5–10	
S. aureus ATCC 29213/209-P	>20 (ATCC 29213)	5–10 (209-P)		0,6–1,25 (209-P)	
E. coli ATCC 25922/DH5α	1,25–2,5 (ATCC 25922)	0,25–0,5 (DH5α)	0,12–0,25 (DH5α)	0,12–0,25 (DH5α)	>25 (DH5α)
P. aeruginosa ATCC 27853/PAO1	>20 ($МИК_{50}$ ≈ 20; ATCC 27853)		6–12 (PAO1)	0,37–0,75 (PAO1)	>25 (PAO1)
P. fluorescens ВКМ B-894		0,5–1			

3.11.2.4. Уникальная структура оксиопинина 4a

Oxt 4a может рассматриваться как состоящий из двух сегментов: N-концевой дисульфид-содержащей части (с петлей из 7 а.о., стабилизированной S-S-связью) и более протяженного линейного фрагмента. Применение алгоритмов предсказания вторичной структуры (например, JPred) приводит к прогнозированию формирования α-спирали в области а.о. 12–25. По данным спектроскопии КД и ЯМР Oxt 4a в основном разупорядочен в водном растворе, однако приобретает конформацию α-спирали в присутствии ТФЭ, мицелл ДСН или ДФХ и липосом из ДОФХ или ДОФГ (рисунок 110; таблица 53). Этим он похож на линейные цитолитические пептиды, например латарцины из яда паука *L. tarabaevi*, см. выше (99).

Структуру Oxt 4a, связанного с мицеллами ДФХ, мы исследовали методами спектроскопии ЯМР (рисунок 111). В соответствии с предсказаниями, для а.о. 12–25 была показана α-спиральная конформация. Амфифильность молекулы Oxt 4a хорошо видна при раскраске поверхности (рисунок 111Б, Г; ср.: рисунок 3). Гидрофобный кластер образован остатками F13, V17, L18, L21, L22, M24 и L25 и покрывает ≈30% поверхности пептида. Такая структура обеспечивает эффективное взаимодействие Oxt 4a с областью интерфейса мембраны-мишени, как и в случае других амфифильных цитолитических и антимикробных пептидов (см. обсуждение в соответствующем разделе Обзора литературы) (277).

Остатки 4–10 пептида собраны в петлю и сближены с N-концевой частью α-спирали. В результате вблизи N-конца Oxt 4a образуется кластер положительно заряженных боковых цепей R3, K6, K9 и K11 (рисунок 111В). Конформация петли стабилизирована благодаря пролину (пептидная связь C4–P5 в *транс*-конфигурации), дисульфидной связи, объемному гидрофобному W8 и водородной связи между амидной группой K9 и карбонильной группой S7.

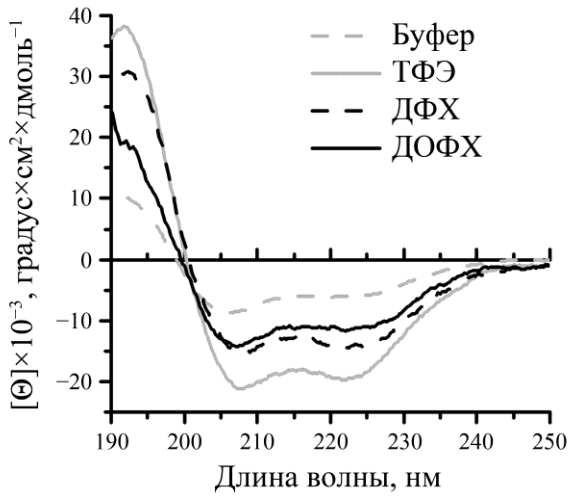


Рисунок 110. Спектры КД Oxt 4a в фосфатном буфере (pH 7,4), 50% ТФЭ, суспензии мицелл ДФХ и липосом из ДОФХ. Мицеллы ДФХ (7,5 мМ; молярное соотношение детергента и пептида 150 : 1) и липосомы (100 нм), образованные из ДОФХ (3,5 мМ, молярное соотношение липида и пептида 100 : 1), были приготовлены в фосфатном буфере (pH 7,4).

Таблица 53. Содержание элементов вторичной структуры у Oxt 4a согласно данным КД.

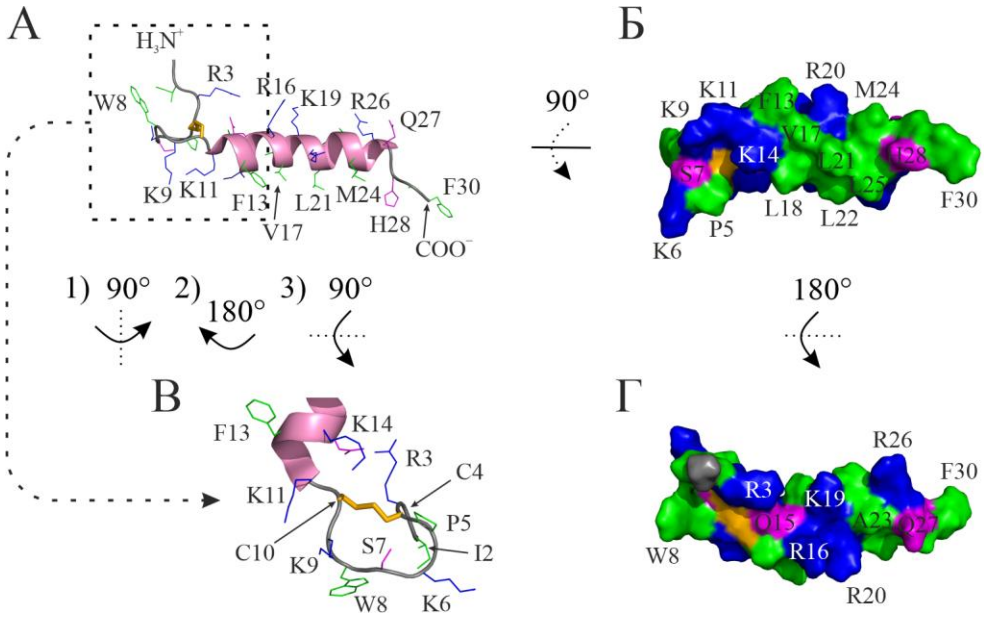
Раствор	Содержание вторичной структуры, %			
	α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Клубок
Фосфатный буфер (pH 7,4)	23	24	21	22
50% ТФЭ	57	5	13	25
ДСН	46	9	17	28
ДФХ	51	5	17	27
ДОФХ	39	10	19	32
ДОФГ	32	15	21	32

Мицеллы ДСН (12,5 мМ; молярное соотношение детергента и пептида 150 : 1) и липосомы (100 нм) из ДОФГ (3,5 мМ, молярное соотношение липида и пептида 100 : 1), были приготовлены в фосфатном буфере (pH 7,4). Другие условия см. в подписи к рисунку 110.

Таким образом, в мицеллах детергента Oxt 4a формирует торпедообразную структуру с C-концевым амфифильным α-спиральным сегментом («тело»; a.o. 12–25) и N-концевым дисульфид-содержащим циклом («голова»; a.o. 1–11) с необычно высокой концентрацией положительного заряда. Такая структура уникальна среди пептидов из яда паукообразных. Нельзя исключить, что «голова» Oxt 4a с индольной группой триптофана, окруженной положительно заряженными остатками лизина и аргинина, является мотивом, необходимым для взаимодействия со специфическим рецептором в организме жертвы или агрессора. Однако липидный бислой, на наш взгляд, служит более вероятной мишенью Oxt 4a, что подтверждается рядом наблюдений: (а) пептид эффективно взаимодействует с мембранами; (б) он образует амфифильную α-спираль, отличительную черту многих мембрано-активных пептидов (α-спиральных АМП); и (в) Oxt 4a разрушает клеточные мембраны.

Структурное и функциональное сходство Oxt 4a с α-спиральными АМП предполагает общий механизм действия. Помимо обсужденных в Обзоре литературы (раздел «Цитолитические и антимикробные пептиды») и наиболее принятых механизмов (доска-бочка, тороидальная пора и ковровый) возможны и другие варианты. Так называемый «механизм кластеризации заряда» (от англ. charge cluster) предполагает, что положительно заряженный пептид может увеличивать локальную концентрацию анионных липидов в бактериальной мембране-мишени, т.е. кластеризовать их (1180). Способность катионных АМП секвестрировать анионные липиды из смеси с цвиттерионными липидами связывают с достаточной плотностью положительного заряда в их структуре. Возможно, N-концевая голова Oxt 4a (заряд +5 вместе с N-концевой аминогруппой) усиливает эффект кластеризации анионных липидов вокруг пептида, связанного с бактериальной плазматической мембраной. Таким образом, наличие дисульфидного мостика в линейном пептиде создает высокую локальную плотность заряда, обеспечивая каркас, который усиливает взаимодействия с анионными липидами.

Рисунок 111. Пространственная структура Oxt 4a в суспензии мицелл ДФХ (PDB ID: 2L3I). (А) Ленточное представление, указаны N- и С-концы цепи. Окраска и обозначения как на рисунке 3, дисульфидный мостик окрашен желтым. (Б, Г) Показана молекулярная поверхность пептида, раскрашенная в соответствии со свойствами а.о. (В) Увеличенный фрагмент структуры с дисульфидной связью.



Любопытно, что Oxt 4a демонстрирует структурное сходство с некоторыми ЗП из кожи лягушек семейства Ranidae (таблица 54). У них тоже одна дисульфидная связь, а остатки цистеина так же обычно разделены пятью другими а.о. — эта структура получила название «Rana-бокс» (1181); различие заключается в том, что у пептидов лягушек Rana-бокс расположен в С-концевой области. В мембраноподобных средах линейная часть этих АМП принимает α-спиральную конформацию аналогично Oxt 4a (1182, 1183). Конвергенция между Oxt 4a и пептидами кожи лягушек прослеживается на разных уровнях: (а) все они проявляют антимикробную и цитолитическую активность; (б) структура пептидов описывается двумя мотивами — одной дисульфидной связью, охватывающей петлю из семи а.о. (N-концевой фрагмент в Oxt 4a и С-концевой Rana-бокс в пептидах лягушек), и протяженным линейным α-спиральным сегментом; и (в) биосинтез пептидов характеризуется общей схемой, подразумевающей продукцию в виде канонических препропептидов (таблица 55) с положительным зарядом зрелой цепи, компенсируемым отрицательным зарядом пропоследовательности. Можно предположить защитную роль этой части предшественника: компенсация заряда предотвращает нежелательную ассоциацию АМП с мембранами клетки-хозяина во время биосинтеза. Расщепление пропоследовательности опосредуется специфическими протеолитическими ферментами, распознающими мотивы процессинга. У амфибий это обычный двухосновный сайт кексин-фуриновых протеаз (1184), тогда как у пауков присутствует PQM.

Результаты исследований Oxt 4a опубликованы (1185).

Таблица 54. Сравнение Oxt 4a с пептидами, содержащими Rana-бокс, и Ltc 3a.

Источник	Название пептида	UniProt ID	Последовательность	Длина, а.о.	Заряд при pH 7	Литература
Oxyopes takobius	Oxt 4a	P86350	--GIRCPKSWKCKAFK-QRV-LKRLLAMLRQHAF	30	+9	(1185)
Lachesana tarabaevi	Ltc 3a*	Q1ELU3	--------SWKSMAKKL-KEYMEKLKQRA-----	20	+6	(107)
Rana catesbeiana	Ранатуерин-1	P82741	--------SMLSVLKNLGKVGLGFVACKINKQC-	25	+4	(1186)
Rana rugosa	Ругозин-A	P80954	GLLNTFKDWAISIAKGAGKGVLTTLSCKLDKSC-	31	+4	(1187)
Rana dybowskii	Японицин-1CDYa	B3VZU2	------------------FFPLALLCKVFKKC-	14	+3	(1188)
			← →			

Остатки окрашены в соответствии с их свойствами как в таблице 8. *Пептид с С-концевым амидированием. Стрелки внизу указывают приблизительное положение α-спирали, образующейся при контакте пептидов с мембранами.

Таблица 55. Аминокислотные последовательности предшественников Oxt 4a и ранатуерина-1.

Источник	Название пептида	UniProt ID	Сигнальный пептид	Пропоследовательность	Заряд (про-) при pH 7	Длина, а.о.
Oxyopes takobius	Oxt 4a	F8J4S0	-MKISQVFIFVFLL-MISVAWA	NEAYEEESNYLSERFDADVEEITPEFR	−8	47
Rana catesbeiana	Ранатуерин-1	C5IBS0	MFTMKKSLLLLFFLGTITLSLC	EQERGAD-----EEEGSGEKEIKR---	−4	41

Зрелые пептиды представлены в таблице 54.

3.11.3. Мембрано-активные токсины из яда пауков подавляют развитие хламидий

Интенсивное использование антибиотиков в медицинской практике приводит к неизбежному появлению устойчивых бактериальных штаммов (1189). Чтобы преодолеть эту проблему, необходимы регулярная разработка и ввод в клинику новых антибиотиков. Среди кандидатов в новые противомикробные агенты часто называют АМП. Считается, что механизм действия АМП, подразумевающий непосредственное связывание с мембранами клеток-мишеней и их нарушение, обусловливает низкую вероятность приобретения бактериями устойчивости к этим агентам (270). При этом важно помнить и существенные недостатки АМП с точки зрения их разработки в качестве лекарственных средств, а именно: (1) сравнительно высокую токсичность — а она обусловлена теми же аспектами механизма действия, ведь мишенью служит биомембрана, — и (2) дороговизну производства, связанную со сравнительно высокими терапевтическими дозами и тем, что обычные АМП содержат свыше 10 а.о. В результате складывается ситуация, что одни и те же аргументы в пользу разработки АМП как антибиотиков приводятся, по крайней мере, с середины 1990-х гг. (1190), а при этом ни один препарат такого типа так и не был введен в клинику, хотя клинические исследования ведутся. Это вынуждает научные коллективы, занимающиеся исследованиями АМП, искать альтернативы. Одну из таких альтернатив мы попытались рассмотреть в рамках данной работы. Эксперименты выполнены на базе лаборатории генной инженерии ФНКЦ физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА.

Внутриклеточные паразитарные бактерии родов *Mycoplasma* и *Chlamydia* вызывают инфекционные заболевания, которые в различной степени восприимчивы к лечению антибиотиками и приобретают все большее медицинское значение (1191-1194). АМП способны подавлять развитие микоплазмы *in vitro* (1195). Однако концентрации активного пептида обычно составляют от 0,1 до 10 мкМ, что соответствует довольно высоким терапевтическим дозам. Одной из возможностей служит генная терапия, которая может заменить прямое применение пептидов (1196). Мы предложили новый метод применения АМП — как агентов генной терапии, ориентированной на борьбу с внутриклеточной инфекцией. Во избежание биоэтических проблем, необходимо указать, что на данном этапе генная терапия людей не рассматривается.

Антимикробная активность против хламидий и микоплазмы была ранее продемонстрирована для мелиттина на клеточных культурах и лабораторных животных (мыши и цыплята) (1197-1199). Тем не менее, сильная гемолитическая активность и аллергические реакции у людей делают мелиттин малопригодным для разработки лекарств. Как уже упоминалось выше, яд пауков служит богатым источником АМП с различными свойствами. Например, некоторые латарцины (Ltc 1, 3a и 4b) имеют ограниченный профиль активности, будучи вы-

сокоэффективными против бактерий, тогда как другие латарцины (Ltc 2a и 5) (107) и цитоинсектотоксин CIT 1a (281) обладают цитолитической активностью широкого спектра действия, напоминающей мелиттин. Мы решили проверить эффективность АМП пауков против хламидий с целью найти пептиды, которые были бы как высокоэффективными против внутриклеточных паразитов, так и не токсичными для клеток-хозяев.

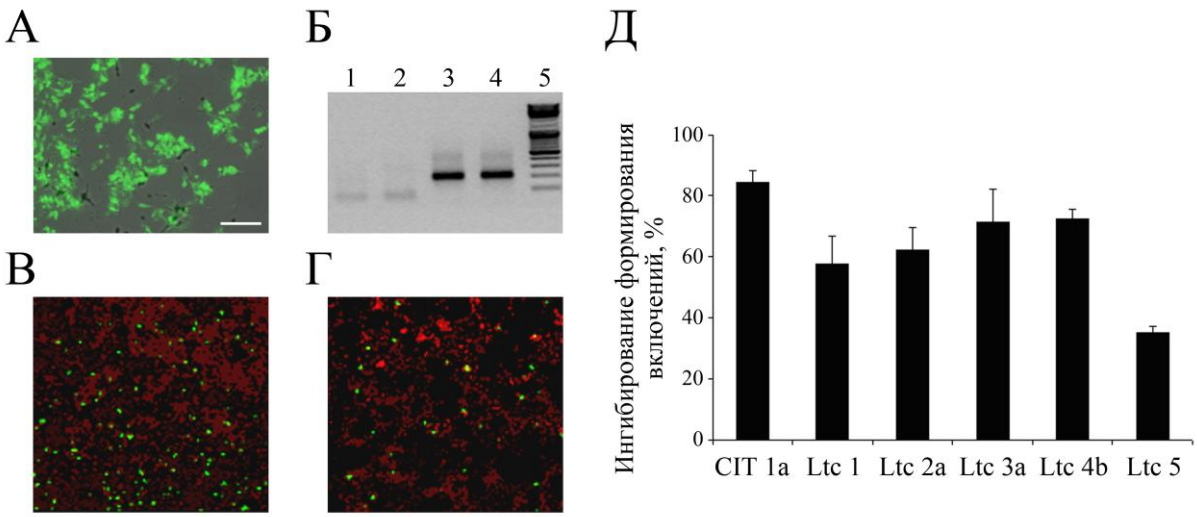
Синтетические гены, кодирующие шесть АМП (Ltc 1, 2a, 3a, 4b, 5 и CIT 1a), субклонировали в вектор pBI-EGFP. Ген тетрациклин-зависимого белка-трансактиватора (rtTA) амплифицировали с использованием вектора pTet-On и субклонировали в тот же pBI-EGFP. Полученные векторы pBI/rtTA/EGFP/AMP использовали для трансфекции клеток HEK293, восприимчивых к хламидийной инфекции. Визуализация экспрессии генов АМП была возможной благодаря сопутствующей экспрессии репортерного гена *egfp*. Все полученные векторы демонстрировали высокие уровни экспрессии генов; даже при низкой концентрации индуцирующего агента доксициклина (2 нг/мл) мы наблюдали характерную флуоресценцию. Для дополнительного подтверждения экспрессии генов АМП из индуцированных клеток выделяли суммарную РНК и анализировали ее с помощью ПЦР, сопряженной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР; на рисунке 112А, Б представлены данные для CIT 1a). Токсичность рекомбинантных eGFP и АМП для клеток была минимальной; даже когда концентрацию доксициклина увеличили до 2 мкг/мл, доля живых клеток не опускалась ниже 95% и существенно не отличалась от доли живых контрольных нетрансфицированных клеток HEK293.

Рекомбинантные конструкции, содержащие гены АМП, затем тестировали на их способность подавлять хламидийную инфекцию в клеточной линии HEK293. В этих экспериментах мы использовали плазмиды с удаленным геном eGFP для выявления включений хламидий путем прямой иммунофлуоресценции с антителами к белковому антигену внешней мембраны *Ch. trachomatis*, меченными флуоресцеином. Через 5 ч после трансфекции клеток HEK293 добавляли доксициклин, через 20 ч клетки инфицировали *Ch. trachomatis*. Контрольные клетки трансфицировали теми же векторами, но экспрессию генов не индуцировали. Расчет включений хламидий проводили через 24 ч после заражения с использованием конфокального микроскопа. Ингибирование образования включений хламидий определяли как соотношение между количеством включений в клетках, индуцированных доксициклином, и количеством в контрольных клетках; результаты показаны на рисунке 112В–Д. Наиболее эффективный ген *cit 1a* (кодирующий CIT 1a) продемонстрировал выраженный ингибирующий эффект (≈85%; $p < 0,05$), который был больше, чем у мелиттина (≈60%) (1197). Гены других пептидов, кроме Ltc 5, также продемонстрировали высокую эффективность (ингибирование от ≈60 до 70%; $p < 0,05$).

Таким образом, мы показали, что контролируемая экспрессия генов АМП из яда паука может быть использована для борьбы с хламидийной инфекцией. Терапевтические векторы, содержащие гены АМП, могут быть использованы для профилактики заболеваний, вызванных хламидиозом. Мы полагаем, что векторы, разработанные в нашем исследовании, могут найти применение для борьбы с внутриклеточными паразитами в животноводстве и для защиты клеточных линий в лабораторной практике.

Дальнейшее изучение механизма антихламидийной активности CIT 1a, включавшие индукцию экспрессии гена *cit 1a* на разных этапах заражения, показало наибольшую эффективность его действия на стадию образования незрелого включения. Результаты исследований активности АМП из яда паука *L. tarabaevi* против хламидий опубликованы (1200-1203).

Рисунок 112. Экспрессия гена, кодирующего CIT 1a, в клетках HEK293 и антихламидийная активность АМП из яда *L. tarabaevi*. (А) Наложение оптического и флуоресцентного изображения клеток после индукции доксициклином (20 нг/мл) через 24 ч после трансфекции плазмидным вектором pBI/rtTA/EGFP/CIT 1a. Зеленая флуоресценция указывает на экспрессию гена *egfp*. Масштабная линейка, 100 мкм. (Б) ОТ-ПЦР анализ экспрессии гена *cit 1a*. РНК выделяли из клеток через 12 ч после добавления доксициклина. На дорожку 1 нанесен продукт ОТ-ПЦР для нетрансфицированных клеток HEK293; 2, отрицательный контроль (обратная транскриптаза не добавлялась в ПЦР-смесь); 3, продукт ОТ-ПЦР для трансфицированных клеток HEK293; 4, положительный контроль (в качестве матрицы для ПЦР использовался вектор pBI/rtTA/EGFP/CIT 1a); 5, молекулярные стандарты (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Fisher Scientific). (В, Г) Визуализация включений хламидий в контроле, без индукции экспрессии гена *cit 1a* (В) и в условиях его экспрессии (Г). Клетки инфицировали *Ch. trachomatis* через 20 ч после индукции экспрессии генов. Иммунофлуоресцентное окрашивание включений хламидий (зеленый цвет) проводили через 24 ч после заражения. Клетки также окрашивали голубым Эванса (красный цвет). (Д) Процент ингибирования образования включений хламидий в клетках, экспрессирующих различные гены АМП. Данные представлены как средние значения ± SE.



3.11.4. Значение исследования цитолитических пептидов

Благодаря нашим работам становится всё более очевидным, что некоторые пауки не просто производят цитотоксины, а что их разнообразие может быть сопоставимо с разнообразием нейротоксинов и что они могут использоваться в качестве основного компонента яда — как у перепончатокрылых (240, 1204). Действительно, мембрано-активные полипептиды составляют ~30% сухого яда *O. takobius*, а у *L. tarabaevi* их содержание достигает рекордных 80%. Что касается численного состава, то здесь похожая ситуация. Если говорить о транскриптомных данных, то из 87 предсказанных токсинов *L. tarabaevi* 61 относится к мембрано-активным полипептидам, и лишь 26 — к «обычным» дисульфид-богатым. Аналогичное соотношения получается, если вести речь об идентифицированных компонентах яда.

Удивительно, но именно в случае цитотоксинов наблюдается существенное разнообразие биосинтеза — с точки зрения организации белков-предшественников. Если предшественники нейротоксинов «простые» препропептиды, то цитотоксины могут процессироваться из белков разнообразной организации. Здесь мы находим и «двойные», и «тройные», и более сложные, причем зрелые цепи из них могут образовываться и одинаковые, и гомологичные, и совершенно непохожие. Почему дисульфид-богатые токсины не синтезируются в виде сложных белков-предшественников? По-видимому, отчасти дело в топологических трудностях, связанных с необходимостью формирования дисульфидных мостиков и плотной упаковки таких пептидов. Тем не менее, существуют двудоменные токсины с двумя ноттиновыми модулями (см. следующий раздел), так что это не единственная причина. Вторая возможная причина — пространственные затруднения для эффективного действия процессирующих ферментов. Однако известны примеры, когда эти ферменты успешно разрезают внутри модулей (см. ниже).

Для зрелых последовательностей исследованных АМП характерно высокое содержание остатков лизина и сравнительно малое — аргинина. Аналогичную ситуацию мы наблюдаем в случае АМП, изученных другими исследователями (см. таблицу 3). Мы предполагаем, что такое предпочтение связано с особенностью процессинга предшественников этих полипептидов: в составе PQM и iPQM содержится инвариантный остаток аргинина, и его наличие в составе зрелых цепей нежелательно ввиду возможного узнавания процессирующим ферментом. По-видимому, именно такая ситуация привела к возникновению двуцепочечных токсинов, таких как ω-агатоксин IA (1205) и CSTX-13 (634), в которых цепи образуются из единого предшественника и удерживаются дисульфидными связями (рисунок 34).

Что касается практического значения, то мы остановились на этом в предыдущем разделе. Насколько будет востребован подход к контролю внутриклеточных паразитов, покажет время.

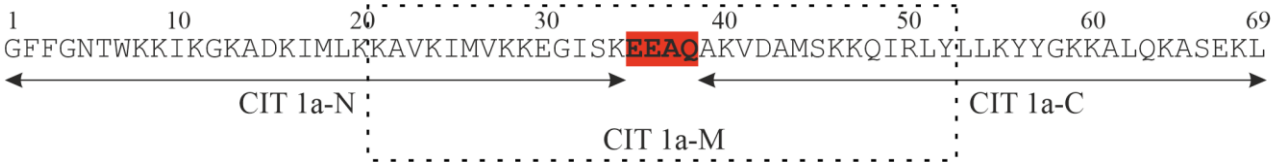
3.12. Модульные токсины из яда паукообразных

В нашей предыдущей работе в яде паука-муравьеда *L. tarabaevi* были обнаружены любопытные по строению токсины, названные нами цитоинсектотоксинами (CIT) и представляющие собой как будто два «обычных» цитолитических пептида, соединенные в одну длинную полипептидную цепь (99, 281). Всего ранее была установлена структура 12 CIT, объединенных по сходству последовательностей в четыре семейства (таблица 49). Их необычное строение мы предложили описывать в терминах «модульных» или «двудоменных» токсинов.

3.12.1. Модульное строение цитоинсектотоксинов

Интересно, что в случае CIT 1 и 2 два модуля соединены коротким линкером, напоминающим PQM, в котором ключевой аргинин оказался заменен на другой а.о.: ^{35}EEAQ^{38} у CIT 1a и ^{34}EEVQ^{37} у CIT 2a. Мы предположили, что CIT эволюционировали из двойных предшественников коротких цитотоксинов в результате мутации сайта процессинга. Используя твердофазный пептидный синтез, мы получили три производных CIT 1a, которые соответствуют N-концевому модулю (CIT 1a-N, а.о. 1–34), С-концевому модулю (CIT 1a-C, а.о. 39–69) и средней части CIT 1a (CIT 1a-M, а.о. 21–52), в которую был включен линкер ^{35}EEAQ^{38} (рисунок 113).

Рисунок 113. Аминокислотная последовательность CIT 1a и его фрагментов. CIT 1a-N и CIT 1a-C указаны стрелками, CIT 1a-M выделен прямоугольником. Мотив, напоминающий PQM, отмечен красным.



3.12.1.1. Вторичная структура модулей CIT 1a

CIT 1a-N и CIT 1a-C склонны к образованию α-спиралей с гидрофобными кластерами на поверхности. По данным спектроскопии КД оба модуля в водном растворе не формируют упорядоченной структуры, тогда как в среде, имитирующей мембрану (50% ТФЭ; суспензия липосом из ДОФХ или ДОФЭ / ДОФГ), у них доминирует α-спиральная конформация (таблица 56). Оба фрагмента положительно заряжены при нейтральном pH: +9 и +7 для CIT 1a-N и CIT 1a-C соответственно.

Таблица 56. Содержание элементов вторичной структуры у CIT 1a-N и CIT 1a-C согласно данным КД.

Пептид	Раствор	Содержание вторичной структуры, %			
		α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Клубок
CIT 1a-N	Вода	7	14	26	54
	ДОФХ	41	17	21	22
	ДОФЭ / ДОФГ	20	28	24	29
	50% ТФЭ	78	2	2	18
CIT 1a-C	Вода	8	11	26	56
	ДОФХ	42	4	22	32
	ДОФЭ / ДОФГ	45	7	20	28
	50% ТФЭ	74	1	6	19

Липосомы (100 нм), образованные из ДОФХ или ДОФЭ / ДОФГ (5 мМ, молярное соотношение липида и пептида 20 : 1), были приготовлены в фосфатном буфере (pH 7,5).

3.12.1.2. Биологическая активность модулей CIT 1a

Антимикробную активность трех производных тестировали в сравнении с полноразмерным CIT 1a (таблица 57). Значения МИК для CIT 1a-N оказались значительно ниже, чем для CIT 1a-C, а МИК полноразмерного CIT 1a ниже, чем МИК обоих производных и их смеси. В инсектицидных тестах на *D. melanogaster* оба модуля показали довольно низкую активность по сравнению с полноразмерным CIT 1a (таблица 57). Таким образом, разделенные модули ведут себя аналогично «обычным» коротким α-спиральным АМП; при этом CIT 1a-M оказался неактивен в обоих тестах.

Таблица 57. Инсектицидная и антимикробная активность производных CIT 1a.

	CIT 1a	CIT 1a-N	CIT 1a-C	CIT 1a-N + CIT 1a-C	CIT 1a-M
Инсектицидная активность ($ЛД_{50}$, мкг/г)					
D. melanogaster	12,3	96,3	144,6	224,0	>250
Антимикробная активность (МИК, мкМ)					
B. subtilis ВКМ B-501	0,9	1,3–2,5	20–40	1,3–2,5	>100
E. coli DH5α	0,6	5–10	40–80	2,5–5	>100

Представлены значения $ЛД_{50}$ при введении дрозофилам и МИК против бактерий.

3.12.1.3. Цитоинсектотоксины — уникальные модульные цитолитики

Мы предполагаем, что CIT 1 и 2 эволюционировали в результате мутации мотива процессинга, который когда-то разделял два коротких α-спиральных мембрано-активных пептида в двойном предшественнике. В результате два пептида стали модулями гигантского

линейного CIT. Эта мутация оказалась полезной, поскольку CIT проявляют необычайно высокую инсектицидную активность ($ЛД_{50}$ ~ 10 мкг/г), сравнимую с активностью нейротоксинов, и высокую цитолитическую активность широкого спектра действия (таблица 50) (99, 281).

Модули CIT 1a (рисунок 113) похожи на короткие α-спиральные мембрано-активные пептиды: это катионные линейные пептиды с мембранной активностью и высокой склонностью к образованию спиралей (таблица 56). Оба модуля, действующие синергически, необходимы для высокой активности CIT 1a. Разделенные модули демонстрируют очень слабую инсектицидную активность (таблица 57), сравнимую с активностью коротких α-спиральных мембрано-активных пептидов из яда паука, таких как латарцины ($ЛД_{50}$ ~ 100–150 мкг/г; таблицы 49 и 50). Антибактериальная активность разделенных доменов значительно ниже, чем у полноразмерного токсина (таблица 50). CIT 1a-N заметно более активен, чем CIT 1a-C, что, возможно, объясняется его большей амфифильностью. Активность эквимолярной смеси находится на том же уровне, что и активность N-концевого домена. CIT 1a-M, центральный фрагмент CIT 1a, не проявляет активности. Это свидетельствует в пользу того, что CIT 1a-N и CIT 1a-C следует рассматривать как функциональные модули, и указывает на отсутствие специфической функции у последовательности линкера, разделяющей домены.

Таким образом, механизм действия CIT 1a основан на синергизме между двумя ковалентно связанными модулями. Поскольку CIT 1a-N демонстрирует более высокую активность, мы предполагаем, что N-концевой домен отвечает за цитолитическую активность CIT 1a, тогда как C-концевой домен играет роль энхансера. Аналогичный синергический механизм действия был показан для нейротоксина CSTX-1 из *C. salei* с архитектурой ICK-АМП (таблица 20; см. раздел «Токсины, содержащие линейный и ICK-домен» Обзора литературы). В этом случае линейный C-концевой домен действует как энхансер для N-концевого ICK-домена (659).

Результаты исследования модулей CIT 1a опубликованы (1179).

3.12.2. Латартоксины, модульные токсины из яда паука L. tarabaevi

Более внимательное изучение состава яда *L. tarabaevi* показало, что разнообразие модульных токсинов шире, нежели предполагалось нами ранее. На рисунке 108А показан профиль хроматографического разделения яда этого паука с помощью гель-фильтрации; наблюдаются три грубые фракции (I–III), высокая инсектицидная активность отмечена во фракции II, которую мы подвергли дальнейшему разделению с помощью ОФ-ВЭЖХ (рисунок 108Б). Ранее мы исследовали CIT, которые ввиду выраженных амфифильных свойств элюируются поздно (≈35–40% ацетонитрила). А в области ≈25–35% по ацетонитрилу элюируются другие

полипептиды, проявляющие инсектицидную активность, Мм которых составляет 6,5–8,5 кДа и которые получили название латартоксинов. Эти новые активные полипептидные соединения с паралитическим и летальным эффектом против насекомых дополнительно очищали до гомогенности с помощью еще одного раунда ОФ-ВЭЖХ; все соединения анализировали МАЛДИ МС (таблица 49). В результате мы выделили пять новых токсинов: LtTx 1a/b и 2a–c.

3.12.2.1. Аминокислотная последовательность LtTx

Алкилирование невосстановленных LtTx 4-винилпиридином не выявило свободных тиольных групп в нативных пептидах. Однако различия между Мм нативных и восстановленных-алкилированных пептидов показали, что LtTx 1a, 1b и 2c содержат восемь остатков полуцистина, тогда как LtTx 2a/b имеют еще один дополнительный S-S-мостик. Полную аминокислотную последовательность LtTx мы установили с использованием комбинации методов N-концевого секвенирования по Эдману, МС и сайт-специфического протеолиза (рисунок 43). Деградация по Эдману позволила установить частичные N-концевые последовательности из 39 а.о. LtTx 1a и 1b затем гидролизовали по остаткам глутаминовой кислоты с помощью эндопротеиназы Glu-C, а LtTx 2c расщепили по остаткам аспарагиновой кислоты эндопротеиназой Asp-N. В случае LtTx 2a и 2b фрагментацию полипептидной цепи провели по связям Asp-Pro путем мягкого кислотного гидролиза на первой стадии и по остаткам метионина бромцианом на второй стадии. Все фрагменты отделяли с использованием ОФ-ВЭЖХ и идентифицировали МАЛДИ МС. Очищенные фрагменты с неизвестными последовательностями подвергали секвенированию по Эдману и таким образом установили первичную структуру латартоксинов.

LtTx 1a/b содержат по 60 а.о. (UniProt IDs: B3EWF2 и B3EWF3), тогда как LtTx 2a, 2b и 2c состоят из 71, 67 и 65 а.о., соответственно (B3EWF4–6). Измеренные Мм LtTx 2a–c и их С-концевых фрагментов отличались от вычисленных значений на ≈1 Да. Был сделан вывод, что эти полипептиды посттрансляционно модифицированы и содержат амидированные С-концевые а.о. Основываясь на сходстве последовательностей, латартоксины могут быть объединены в два семейства: LtTx 1 (два члена) и LtTx 2 (три члена). Внутри семейств полипептиды очень похожи: LtTx 1a/b имеют 51% идентичных а.о., тогда как LtTx 2a–c показывают 63–88% идентичности. Между семействами, однако, сходство довольно низкое: у LtTx 1a и 2a только 37% идентичных а.о. Между LtTx и другими токсинами пауков наблюдается незначительное сходство, поэтому мы заключаем, что латартоксины образуют два новых семейства токсинов из яда пауков.

3.12.2.2. Белки-предшественники LtTx

LtTx сравнивали с последовательностями из базы данных кДНК яда *L. tarabaevi*. В результате идентифицировали кДНК, кодирующие латароксины, а также определили структуру их белков-предшественников (pLtTx; таблица 58). Предполагаемые типичные N-концевые сигнальные (пре-) пептиды из 19 а.о. идентифицировали с использованием программы SignalP. Сигнальные пептиды очень похожи как внутри, так и между семействами LtTx (58–74% и 47–58% идентичности, соответственно). Последовательности, которые удаляются посттрансляционно, следуют за сигнальными пептидами. В предшественниках pLtTx 1 эти последовательности очень короткие (6–7 а.о.), тогда как в pLtTx 2 они значительно длиннее (18–24 а.о.). Расщепление пропептида происходит по мотиву PQM (124), а зрелые полипептиды соответствуют С-концевой части предшественников. pLtTx 2 имеет дополнительный С-концевой глицин, этот а.о. служит сигналом для С-концевого амидирования, и его наличие подтверждает предполагаемую модификацию зрелых токсинов.

Таблица 58. Последовательности белков-предшественников LtTx (pLtTx), выведенные из кДНК ядовитых желез *L. tarabaevi*.

Название	Аминокислотная последовательность		
	Сигнальный пептид	Пропоследовательность	Зрелая цепь
pLtTx-1a	MKVLVFAIVCSVLLQVVLS	AD-**EEAR**	LtTx-1a
pLtTx-1b	MKILVLAVVCTVLLQVALS	ADS**EEVR**	LtTx-1b
pLtTx-2a	MKVLVIIALCLVAFQSALS	-KKIENFESYIEDLK**S**-----**EAR**	LtTx-2a*
pLtTx-2b	MKVLVIIALCFFILQTALS	EDKYESFESYVEDLKSGNMK**GEAR**	LtTx-2b*
pLtTx-2c	MKVLVITALCFILLQNVLG	EDTYEDLQNYIENLINEN-Q**DEAR**	LtTx-2c*

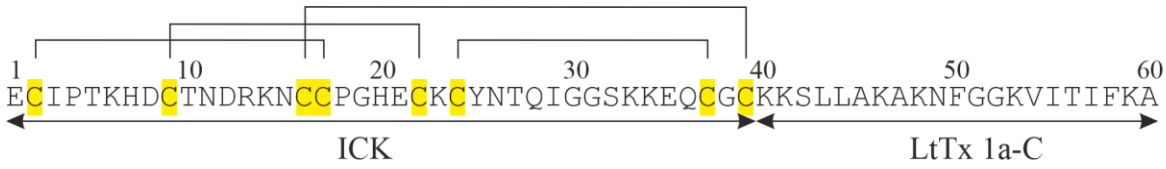
Различающиеся остатки отмечены затемнением. Последовательности сравниваются внутри семейств pLtTx. PQM выделен жирным шрифтом. Три pLtTx (2a–c) имеют дополнительный С-концевой остаток глицина, который служит сигналом С-концевого амидирования зрелых полипептидов (*).

3.12.2.3. Модульное строение латартоксинов

Два семейства латартоксинов имеют общий мотив первичной структуры $CX_6CX_nCCX_nCXCX_nCXC$, который содержит PSM (CX_6CX_nCC) и ESM ($CXCX_nCXC$), характерные для нейротоксинов пауков, и соответствует мотиву ICK. Мы полагаем, что LtTx принимают обычную ноттиновую укладку, наиболее распространенную для токсинов пауков. Однако мы отмечаем, что последний остаток цистеина мотива ICK находится в позиции 39 у LtTx 1 и 42–44 у LtTx-2, что оставляет удлиненные С-концевые «хвосты» из 21 а.о. у LtTx 1 и 23–27 а.о. у LtTx 2. Эти хвосты лишены остатков цистеина (за исключением одиночных цистеинов у LtTx 2a и b, см. обсуждение ниже) и содержат избыток положительного заряда (от +3 до +6 при pH 7). Согласно легкодоступным инструментам предсказания вторичной

структуры, эти хвосты принимают преимущественно α-спиральную конформацию у всех латартоксинов. Словом, С-концевые фрагменты латартоксинов обладают свойствами, типичными для α-спиральных мембрано-активных пептидов, включая большое количество хорошо изученных АМП и цитолитических пептидов, таких как мелиттин или латарцины. LtTx можно приписать модульное строение: к ноттиновому домену присоединен модуль АМП. На рисунке 114 показана аминокислотная последовательность LtTx 1a, отмечены его модули.

Рисунок 114. Аминокислотная последовательность LtTx 1a и его фрагмента LtTx 1a-C. Модули указаны стрелками снизу, остатки цистина выделены желтым, сверху показано предполагаемое расположение дисульфидных мостиков.



3.12.2.4. Биологическая активность LtTx и LtTx 1a-C

Инсектицидную активность LtTx испытывали на личинках мясной мухи (*S. carnaria*) и домашних сверчках (*A. domesticus*). Значения $ЛД_{50}$ составили ≈50 мкг/г (таблица 50). В более высоких дозах (≈100 мкг/г) токсины вызывали мгновенный паралич и смерть. Многие другие токсины пауков обладают подобной активностью, по крайней мере, в сходных дозах (245, 673, 1206). Паралитическая активность латартоксинов исследовалась на нервно-мышечном соединении личинок *C. vicina*. В концентрации 1 мкМ как LtTx 1a, так и LtTx 2a вызывали уменьшение мембранного потенциала (деполяризацию), что в конечном итоге приводило к сокращению мышц, заметному увеличению тока утечки и уменьшению сопротивления мембраны, указывая на цитолитическую активность токсинов. Амплитуда и частота спонтанных ВПСТ не изменялись, однако оба токсина уменьшали амплитуду вызванных ВПСТ, что указывает на возможную активность в отношении ионных каналов, при этом их молекулярная мишень остается неизвестной.

Мы также изучили активность С-концевого фрагмента LtTx 1a, одного из мажорных токсинов яда *L. tarabaevi*. Синтетический пептид LtTx 1a-C, который соответствует 21 С-концевым а.о. LtTx 1a (рисунок 114), получили с использованием традиционного твердофазного синтеза. Он не проявлял токсичности в отношении насекомых вплоть до дозы 200 мкг/г. Кроме того, LtTx 1a-C тестировали на ряде грамположительных (*A. globiformis, B. subtilis*) и грамотрицательных (*E. coli, P. aeruginosa*) бактерий. Использовали два положительных контроля: Ltc 2a из яда того же паука, изученный нами подробно ранее (99, 107), и мелиттин из яда *A. mellifera* (254). Значения МИК приведены в таблице 50; LtTx 1a-C активен в микромо-

лярных концентрациях только на грамположительных бактериях (МИК ≈ 3–6 мкМ), а полноразмерный токсин LtTx 1a не проявлял антимикробной активности вплоть до концентрации 20 мкМ.

3.12.2.5. Мембранная активность LtTx 1a и LtTx 1a-C

Мембранную активность полноразмерного LtTx 1a и LtTx 1a-C мы исследовали с использованием различных методов. Данные спектроскопии КД показали, что LtTx 1a-C принимает в значительной степени неупорядоченную структуру в фосфатном буфере и α-спиральную конформацию в среде, имитирующей мембрану, такой как мицеллы ДСН (таблица 59). Соответствующее увеличение содержания α-спирали наблюдали для полноразмерного токсина LtTx 1a при переносе из фосфатного буфера в суспензию мицелл ДСН. Липосомы (100 нм), состоящие из ДОФЭ и ДОФГ, агрегировали при добавлении синтетического пептида, исключая возможность получения спектров КД, но также свидетельствуя в пользу мембранной активности LtTx 1a-C. Для изучения взаимодействия полипептидов с гигантскими липосомами (1000 нм), образованными ДОФЭ и ДОФГ, мы использовали простой анализ с помощью осаждения (как при анализе цельных ядов, см. раздел «Яд паука *Lachesana tarabaevi* — уникальный источник мембрано-активных токсинов»). Ltc 2a использовался как положительный контроль, PT1 был отрицательным контролем. LtTx 1a, LtTx 1a-C и Ltc 2a пропадали из раствора после центрифугирования суспензий липосом, что прямо указывает на их мембранную активность. Напротив, PT1 не связывался с везикулами и оставался в супернатанте.

Результаты исследования латартоксинов опубликованы (657).

Таблица 59. Содержание элементов вторичной структуры у LtTx 1a и LtTx 1a-C согласно данным КД.

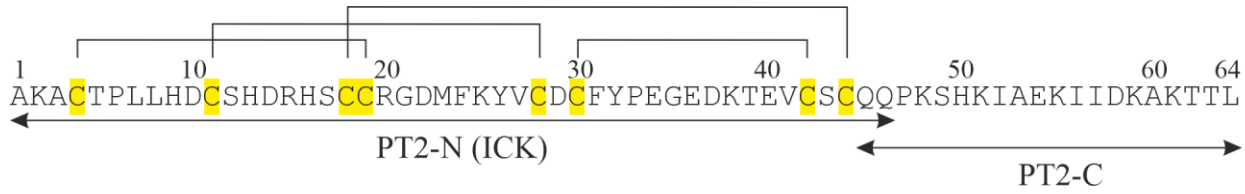
Образец	Раствор	Содержание вторичной структуры, %			
		α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Клубок
LtTx 1a	Фосфатный буфер (pH 7,4)	4	38	22	36
	ДСН	17	30	21	32
LtTx 1a-C	Фосфатный буфер (pH 7,4)	6	26	24	44
	50% ТФЭ	43	11	18	28
	ДСН	59	6	14	21

Мицеллы ДСН (25 мМ; молярное соотношение детергента и пептида 60–150 : 1) были приготовлены в фосфатном буфере (pH 7,4).

3.12.3. Пуротоксин-2 из яда A. marikovskyi

Выделение, секвенирование и биологическая активность PT2 описаны выше в разделе «Пуротоксины — компоненты яда пауков, воздействующие на P2X рецепторы». На рисунке 115 показана аминокислотная последовательность PT2. В ее отношении можно сделать те же замечания, что подробно рассмотрены для латартоксинов в предыдущем разделе (ср.: рисунок 114). По всей видимости, PT2 — еще один пример модульного токсина, содержащего ноттиновый домен и С-концевой АМП-модуль.

Рисунок 115. Аминокислотная последовательность PT2 и его фрагментов PT2-N и PT2-C. Обозначения как на рисунке 114, расположение дисульфидных мостиков установлено экспериментально.



3.12.3.1. Синтез PT2, PT2-N и PT2-C

Мы получили немеченый PT2, ^{15}N-меченый PT2 и дисульфид-богатый N-концевой модуль PT2 (PT2-N, а.о. 1–46; рисунок 115) в бактериальной системе экспрессии [использовали штамм *E. coli* Origami B(DE3)] в виде химеры с белком-помощником Trx. Слитный белок Trx-PT2 расщепляли энтеропептидазой по специфическому сайту, расположенному в линкере перед последовательностью PT2, и затем рекомбинантный продукт очищали с использованием ОФ-ВЭЖХ. Чистоту полученных рекомбинантных полипептидов подтверждали с помощью секвенирования по Эдману, аналитической ОФ-ВЭЖХ и МАЛДИ МС. Выход немеченого PT2, ^{15}N-PT2 и PT2-N составил ≈9,25, 3 и 5,6 мг с 1 л питательной среды, соответственно. Сравнение измеренных средних Мм немеченого PT2 (7256 Да) и ^{15}N-PT2 (7344 Да) выявило разницу Мм, соответствующую числу атомов азота, что свидетельствует в пользу того, что все они были успешно заменены на изотоп ^{15}N. Мы отмечаем, что рекомбинантный PT2 не амидирован по С-концу, в отличие от нативного полипептида, однако биологическая активность против P2X3 рецепторов не зависит от этой модификации. Измеренная средняя Мм PT2-N (5253 Да) была идентична расчетному значению.

Для исследования С-концевого линейного модуля PT2 (PT2-C, а.о. 45–64; рисунок 115) в среде, имитирующей мембрану, его получили с помощью твердофазного пептидного синтеза. Синтетический PT2-C очищали с использованием ОФ-ВЭЖХ, и его средняя Мм (2259 Да), измеренная с помощью МАЛДИ МС, соответствовала расчетному значению.

Чистота всех полученных полипептидов была проверена с использованием аналитической ОФ-ВЭЖХ и составила >95%.

3.12.3.2. Вторичная структура PT2 и PT2-C

Мембранную активность полноразмерного PT2 и его АМП-модуля PT2-C мы исследовали, используя различные методы. Первым шагом мы решили выяснить, как они структурированы в разных средах. Для этого мы получили спектры КД PT2 и PT2-C в фосфатном буфере, а также в растворе с добавлением ДСН или ДФХ. PT2-C имел преимущественно неупорядоченную структуру в воде, тогда как в мицеллах он приобретал α-спиральную конформацию (таблица 60). Для полноразмерного PT2 также наблюдалось значительное увеличение процентного содержания α-спирали при добавлении детергентов. Таким образом, в среде, имитирующей мембрану, С-концевой модуль PT2 претерпевает существенные изменения, как это обычно происходит у мембрано-активных пептидов, в частности линейных АМП (1207). Сравнение вторичной структуры PT2 в буферах с различным pH не показало каких-либо значимых отличий (таблица 60). Это позволило нам использовать низкий pH (3,3) в исследованиях ЯМР (см. ниже), что значительно упростило решение пространственной структуры.

Таблица 60. Содержание элементов вторичной структуры у PT2 и его производных согласно данным КД.

Соединение	Раствор	Содержание вторичной структуры, %			
		α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Клубок
PT2	Глицин-HCl (pH 3)	5	38	22	36
	Глицин-HCl (pH 3), ДФХ	16	30	22	32
	Фосфатный буфер (pH 7)	5	37	22	36
	Фосфатный буфер (pH 7), ДФХ	20	25	23	32
	Фосфатный буфер (pH 7), ДСН	39	21	21	19
PT2-C	Глицин-HCl (pH 3)	6	17	24	53
	Глицин-HCl (pH 3), ДФХ	50	5	16	29
	Фосфатный буфер (pH 7)	7	26	23	44
	Фосфатный буфер (pH 7), ДФХ	42	9	18	30
	Фосфатный буфер (pH 7), ДСН	63	4	6	27
PT2-N	Глицин-HCl (pH 3)	4	40	22	34
	Глицин-HCl (pH 3), ДФХ	4	42	21	33
	Фосфатный буфер (pH 7)	4	40	22	34
	Фосфатный буфер (pH 7), ДФХ	4	41	22	33

Мицеллы ДФХ и ДСН (15 мМ; молярное соотношение детергента и пептида 35–100 : 1) были приготовлены в указанных буферных растворах.

3.12.3.3. Пространственная структура PT2

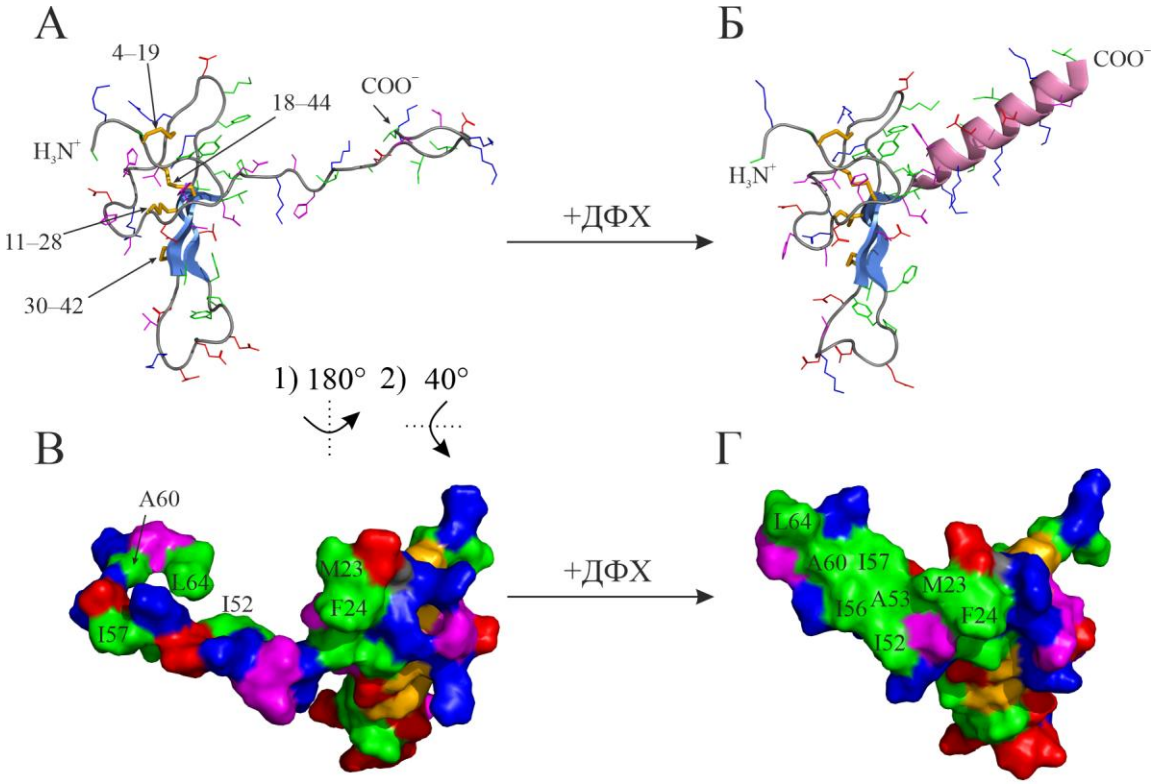
Структуру PT2 в воде (PDB ID: 2MZF; рисунок 116A, B) мы изучили с использованием спектроскопии ЯМР. Пространственная структура N-концевого модуля (a.o. 1–46) представляет собой классическую укладку ICK (134, 135). Небольшой β-лист сформирован двумя антипараллельными β-тяжами (V27–F31 и V41–E45). Жесткое ядро молекулы стабилизировано четырьмя S-S-мостиками и 11 водородными связями. Удлиненная петля β-шпильки обогащена гидрофильными a.o. с заряженными боковыми группами (E34, E36, E37, K38 и D40). C-Концевая часть молекулы (a.o. 48–64) не образует устойчивой вторичной структуры, будучи неупорядоченной.

Спектры ЯМР заметно изменяются при добавлении среды, имитирующей мембрану (мицеллы ДФХ; рисунок 117A). Взаимодействие PT2 с детергентом приводит к изменениям химических сдвигов (рисунок 117Б) из-за изменения локальной среды полипептида и вызывает уширение линий в спектрах ЯМР (рисунок 117A) из-за большей массы комплекса полипептида с мицеллой по сравнению с несвязанным PT2. Добавление ДФХ не изменяет структуру ядра молекулы (a.o. 3–45), но влияет на C-концевой модуль (PDB ID: 2MZG; рисунок 116Б, Г). RMSD между координатами атомов основной цепи PT2 в воде и суспензии мицелл ДФХ составляет ≈1,5 Å для области A3–Q46, что указывает на почти идентичные структуры. При этом в мицеллах ДФХ C-концевая часть молекулы (K48–L64) образует α-спираль.

3.12.3.4. Взаимодействие PT2 и PT2-C с липидными мембранами

Мы использовали липосомы (100 нм) различного состава, чтобы исследовать склонность PT2 к связыванию с мембранами. ДОФХ был выбран в качестве основного компонента для моделирования наружного монослоя эукариотической плазматической мембраны. Чтобы повысить сходство с нативными биологическими мембранами, мы добавили к смеси 20% Хол и 10% сфингомиелина (СМ), а также 30% ДОФГ для увеличения отрицательного заряда и имитации повышенного содержания ганглиозидов в мембранах нейронов. Ни PT2, ни его производные не взаимодействовали с липосомами из ДОФХ или ДОФХ / Хол / СМ (7 : 2 : 1). Мы титровали образцы полноразмерного PT2, PT2-N и PT2-C суспензией липосом из ДОФХ / Хол / СМ / ДОФГ (4 : 2 : 1 : 3) и наблюдали постепенное уменьшение интенсивности сигналов ЯМР для PT2 и PT2-C. Для PT2-N не наблюдалось никаких изменений, что указывает на отсутствие у этого модуля мембранной активности, только C-концевой модуль PT2 способен связываться с мембранами.

Рисунок 116. Пространственная структура PT2 в воде (A, B; PDB ID: 2MZF) и суспензии мицелл ДФХ (Б, Г; 2MZG). (А, Б) Ленточное представление, указаны N- и C-концы цепи. Окраска и обозначения как на рисунке 3, дисульфидные мостики указаны и окрашены желтым. (В, Г) Показана молекулярная поверхность полипептида, раскрашенная в соответствии со свойствами а.о. как на рисунке 10.



Затем по экспериментальным данным мы построили изотермы Ленгмюра, чтобы получить параметры связывания PT2 и PT2-C с липосомами (рисунок 118). Интересно, что константа диссоциации (K_l) меньше для PT2-C (12,3 ± 2,7 мкМ), чем для полноразмерного PT2 (22,9 ± 4,1 мкМ). Эти наблюдения указывают на то, что только C-концевая часть PT2 способна связываться с мембранами. Количество липидов (N), образующих сайт связывания полипептида, составляет 9,9 ± 0,5 для PT2-C и 22,4 ± 1,5 для полноразмерного PT2, т.е. полноразмерный полипептид занимает вдвое бóльшую площадь на поверхности везикулы.

Эти результаты хорошо согласуются с изменениями химических сдвигов ^{1}H и ^{15}N амидов остова в C-концевой части PT2 при взаимодействии с мицеллами ДФХ (рисунок 117Б). Кроме того, мы обнаружили изменения химических сдвигов для атомов в петле между C19 и C28 полноразмерного токсина. По-видимому, эта петля не способствует, а скорее препятствует связыванию PT2 с мембраной.

Из-за сходства между PT2-C и линейными АМП мы провели тестирование антимикробной активности PT2, PT2-N и PT2-C против ряда бактериальных штаммов. PT2 и оба его производных были неактивны в концентрации ≤ 200 мкМ.

Результаты исследований PT2 опубликованы (658, 1162).

Рисунок 117. Взаимодействие PT2 с мицеллами ДФХ по данным спектроскопии ЯМР. (А) Наложенные друг на друга спектры ^{15}N HSQC для PT2 в воде (черный) и в суспензии мицелл ДФХ (красный; молярное соотношение детергента и пептида 100 : 1, 40 °C, pH 3,3). (Б) Изменения химических сдвигов амидных ^{1}H и ^{15}N после добавления ДФХ к образцу.

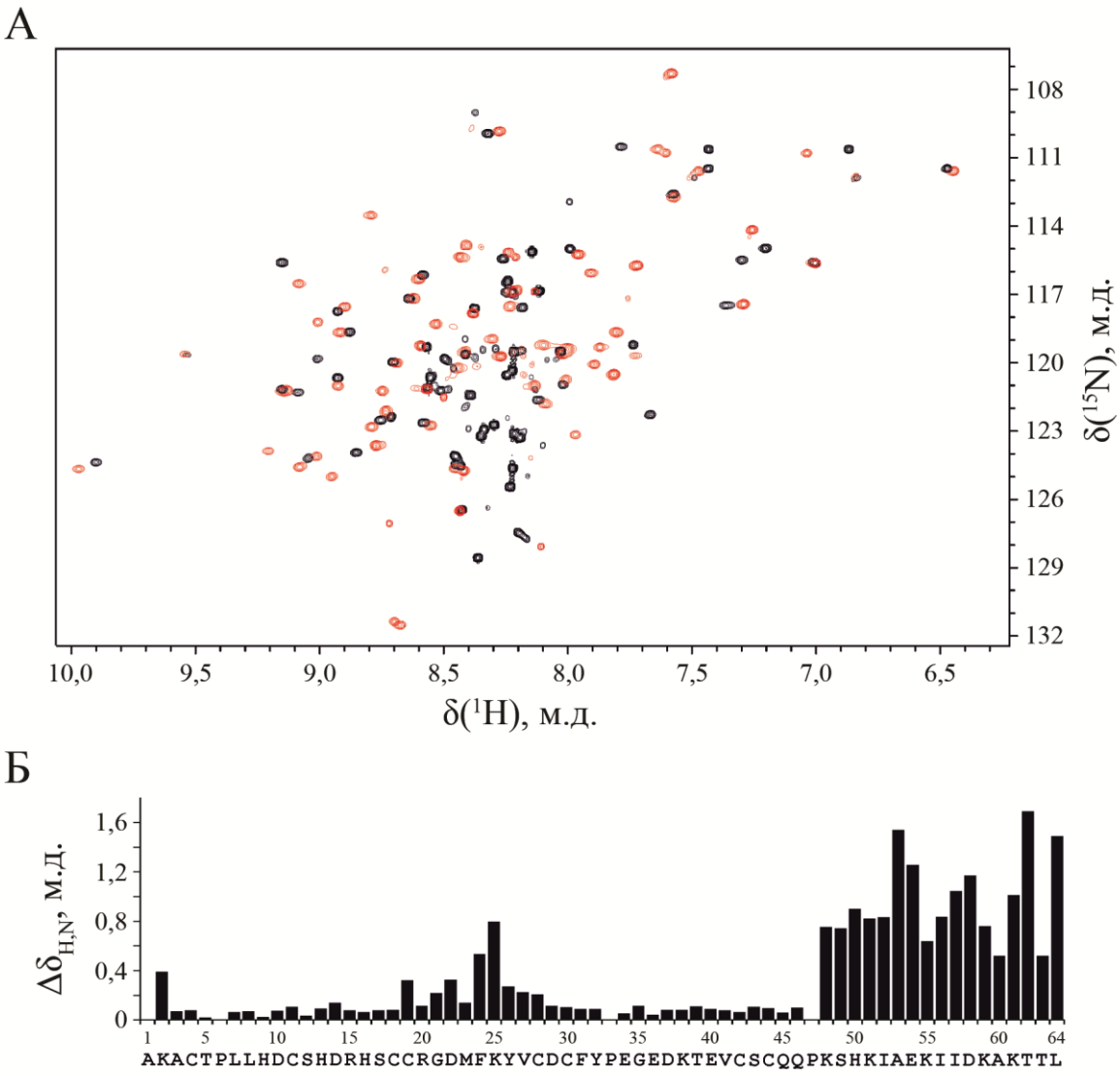
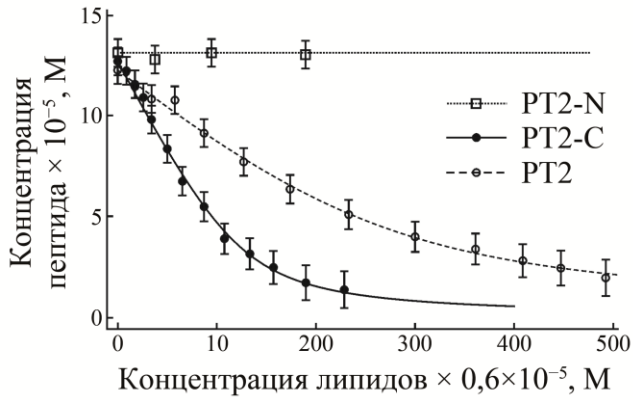


Рисунок 118. Связывание PT2 и его фрагментов с липидными везикулами. Использовали липосомы (100 нм) из ДОФХ / Хол / СМ / ДОФГ (4 : 2 : 1 : 3). Данные для PT2 и PT2-C аппроксимированы изотермами Ленгмюра.



3.12.4. Спайдерины, модульные токсины из яда O. takobius

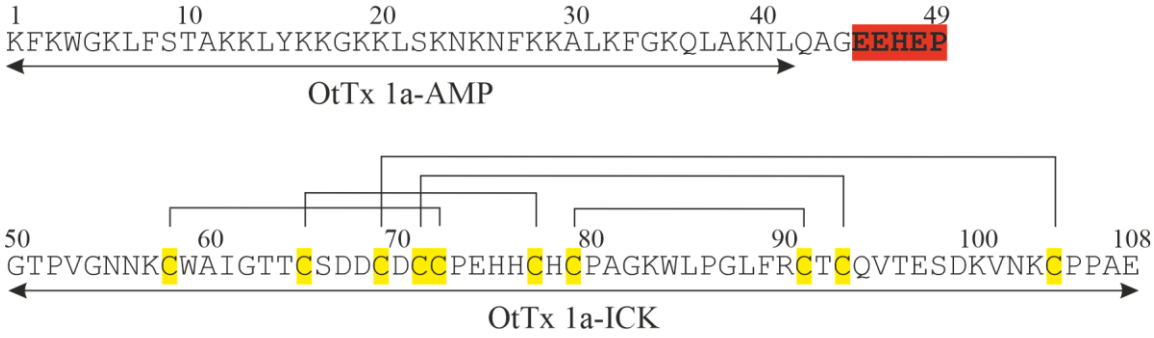
Выше (см. «Мембрано-активные токсины из яда паука *Oxyopes takobius*») мы описали сравнительно короткие цитолитические и антимикробные пептиды (<50 а.о.; см. таблицу 51). Любопытно, что мы также обнаружили сравнительно высокомолекулярные компоненты (12–12,5 кДа), которые элюировались при ≈35–45% ацетонитрила с обращенной фазы C_4–C_5 (рисунок 109Б, В). Эти компоненты проявляли инсектицидную активность против личинок мухи, а также цитолитические эффекты против клеток различного происхождения (см. ниже). Два компонента подвергли повторной хроматографии для достижения чистоты ≈ 95%, их назвали OtTx 1 (токсин *O. takobius* 1; измеренная Мм 12 030 Да) и OtTx 2 (12 415 Да).

3.12.4.1. Первичная структура OtTx

N-Концевое секвенирование по Эдману очищенных токсинов OtTx 1 и 2 позволило установить частичные последовательности длиной 35 а.о. (см. таблицу 51). Поиск в библиотеке кДНК ядовитых желез *O. takobius* последовательностей, кодирующих OtTx, помог установить структуру их белков-предшественников. В дополнение к последовательностям, которые точно совпали с установленными методом Эдмана, мы также нашли близкие гомологи OtTx 1 и 2, отличающиеся единичными заменами. Поэтому изоформы, идентифицированные в яде, были названы OtTx 1a и 2a (UniProt IDs: P86716 и P86718), тогда как гомологичные им токсины получили имена OtTx 1b и 2b (таблица 51). Расчетные Мм OtTx 1a (12 031,0 Да) и 2a (12 416,4 Да) совпали с измеренными значениями (см. выше). OtTx 1 (108 а.о.) и OtTx 2 (113 а.о.) гомологичны и содержат ≈80% идентичных а.о. (см. сравнение в таблице 51); основным отличием является N-концевая вставка пяти а.о. в OtTx 2. У токсинов OtTx 1a и 2a обнаружено десять остатков цистеина. Попытки алкилировать нативные OtTx с помощью 4-винилпиридина не дали результатов, в то время как алкилирование токсинов после восстановления дисульфидных связей ДТТ увеличило измеренные Мм до 13 090 Да (OtTx 1a) и 13 475 Да (OtTx 2a), что указывает на то, что все десять остатков цистеина вовлечены в образование пяти внутримолекулярных S-S-мостиков.

Внимательный анализ установленных последовательностей приводит к идентификации двух частей (модулей) или доменов (см. рисунок 119 для OtTx 1a). N-Концевая часть (а.о. 1–44 в OtTx 1 и 1–49 в OtTx 2) не содержит остатков цистеина, тогда как С-концевой домен (а.о. 50–108 в OtTx 1 и 55–113 в OtTx 2) богат цистеином: десять остатков цистеина составляют 17% всех а.о. (другой особенностью С-концевого домена OtTx является высокое содержание остатков пролина, ≈10%). Короткий линкер, соединяющий два модуля (^{45}EEHEP^{50} у OtTx 1; ^{50}EVHEP^{55} у OtTx 2), очень похож на мутированный PQM: ключевой аргинин заменен на пролин.

Рисунок 119. Аминокислотная последовательность OtTx 1a и его фрагментов OtTx 1a-AMP и OtTx 1a-ICK. Обозначения как на рисунке 115. Мотив, напоминающий PQM, отмечен красным.



Поиск сходных белков в базе данных UniProt выявил два токсина, имеющих значительное сходство с С-концевым модулем OtTx. Оба являются нейротоксинами, блокирующими Ca_v и описанными ранее Ж. Корзо и др.: окситоксин 1 (OxyTx 1) из яда *O. takobius* (этот токсин также был позже обнаружен в *Oxyopes lineatus*) (245), и окситоксин 2 (OxyTx 2) из *O. lineatus* (1208). OxyTx 1 и 2 на ≈40% и 45% идентичны, соответственно, С-концевому домену OtTx 1. Важно, что все эти токсины имеют одинаковый цистеиновый мотив, указывающий на общую укладку: $C^1X_6C^2X_3C^3XC^4C^5X_4C^6XC^7X_mC^8XC^9X_nC^{10}$, где m = 11 у OtTx и OxyTx 2, 24 у OxyTx 1, а n = 9 в OxyTx 2, 10 у OxyTx 1 и 11 у OtTx. Этот мотив является частным случаем более общих PSM (CX_6CX_nCC; $C^1X_6C^2X_5C^4C^5$ в нашем случае) и ESM ($CXCX_nCXC$; $C^6XC^7X_mC^8XC^9$ в нашем случае) (124), которые в свою очередь соответствуют более общему мотиву ICK. Мы можем заключить, что в OtTx, а также в OxyTx, три основных дисульфида ICK (C^1–C^5, C^2–C^6 и C^4–C^9) дополнены двумя дополнительными S-S-связями (C^3–C^{10} и C^7–C^8; последняя фактически является частью ESM и обнаружена у большинства токсинов пауков, содержащих восемь остатков цистеина). Более низкое сходство (≈38% идентичных а.о.) отмечено с токсинами Tx3-6 (1209) и PRTx23C2 (1210) из бразильских пауков *Ph. nigriventer* и *Phoneutria reidyi* (семейство Ctenidae), которые, как полагают, воздействуют на Ca_v; интересно, что у этих токсинов обнаружен шестой дисульфидный мостик.

Напротив, для N-концевого линейного домена OtTx значимо сходных последовательностей мы не обнаружили. Этот домен является катионным (заряд +16 и +13 при pH 7 у OtTx 1 и 2, соответственно; pI ≈ 11) и имеет высокую склонность к образованию α-спирали, как предсказывают различные алгоритмы, например JPred. Положительно заряженные и гидрофобные а.о. расположены в последовательности так, что они формируют кластеры в α-спиральной конформации. Как уже отмечалось, эти свойства являются общими для АМП, например обнаруженных в яде пауков, включая *O. takobius* (см. выше раздел «Мембрано-

активные токсины из яда паука *Oxyopes takobius*»). Интересно отметить дифференциальное содержание некоторых а.о. в N-концевом домене OtTx, например, у OtTx 1a: Lys составляет ≈36% всех а.о., в то время как другие заряженные а.о. (Arg, Asp и Glu) не содержатся вовсе; Leu составляет ≈14%, а Phe ≈9%, при этом Ile, Met и Val отсутствуют.

Мы заключаем, что OtTx представляют собой новое уникальное семейство токсинов пауков, включающее N-концевой линейный домен и C-концевой ICK-домен. Удивительно сходство OtTx с модульными токсинами скорпионов, а именно β-KTx (см. Обзор литературы, раздел «Двудоменные токсины скорпионов»), в частности скорпинами: у последних N-концевой домен тоже проявляет цитолитические свойства, а C-концевой является S-S-богатым (334). По аналогии мы назвали OtTx «спайдеринами».

3.12.4.2. Последовательности кДНК и белков-предшественников OtTx

Как упоминалось выше, анализ базы данных кДНК ядовитых желез *O. takobius* позволил идентифицировать последовательности, кодирующие OtTx (GenBank IDs: JX134894–7). Помимо обнаруженных в яде OtTx 1a и 2a и их ближайших гомологов OtTx 1b и 2b, в базе данных кДНК мы обнаружили еще девять последовательностей (GenBank IDs: KF766543–51), кодирующих близкие по строению токсины, которые по сходству объединили в три группы (OtTx 1c–e, 2c–f, 3a/b).

Как и большинство известных токсинов пауков (см. Обзор литературы, раздел «Биосинтез токсинов паукообразных»), OtTx синтезируются в форме обычных препропептидов (предшественники OtTx 1, pOtTx 1, содержат 166 а.о.), которые состоят из трех частей: N-концевого сигнального (пре-)пептида (18 а.о., идентифицирован программой SignalP), пропоследовательности (40 а.о.) и зрелого токсина в C-концевой части. Препрочасть предшественников консервативна (только одно отличие между pOtTx 1a и 2a). Пропоследовательность анионная (заряд −14 при pH 7, pI ≈ 3), эффективно компенсирует катионность зрелой цепи (заряд полноразмерного пропептида pOtTx 1 составляет −3 при pH 7) и заканчивается PQM: ^{37}EEAR^{40}.

3.12.4.3. Спайдерины *Oxyopes lineatus* и их сравнение с OtTx

Паук-рысь *O. lineatus* (NCBI/UniProt taxon identifier: 366495; семейство Oxyopidae) — это близкородственный вид *O. takobius*. Интересно, что оба паука продуцируют один и тот же мажорный однодоменный нейротоксин OxyTx 1 (245, 1208). Мы решили исследовать *O. lineatus* на наличие спайдеринов. Для этого мы выделили мРНК из ядовитых желез этого паука, получили кДНК, которую затем использовали как матрицу в ПЦР со специфическими праймерами (таблица 61), последовательности которых были основаны на структуре кДНК

OtTx. Продукты ПЦР клонировали в вектор и секвенировали, в результате получили шесть последовательностей (GenBank IDs: KF766552–7), кодирующих близкие по строению с OtTx токсины, которые по сходству объединили в две группы: OlTx 1a–c и 2a–c.

Таблица 61. Синтетические олигонуклеотиды, использованные для амплификации кДНК и фрагментов геномной ДНК (гДНК), кодирующих двудоменные токсины *O. lineatus* и *Ch. punctorium*.

Ген	Матрица	Направление праймера	Последовательность
OlTx 1	гДНК	Прямой	CGATTTCAAAATGAAGTTCTCTTTGG
		Обратный	TTGAGCAAGAATTCTATACAACTG
	кДНК	Прямой	AAGGGTCTAGAGAAAGCAACACC
		Обратный	ATACAACTGGGAGGTCACAGGTG
OlTx 2	гДНК, кДНК	Прямой	AACATCGTTTTCAAAATGAAGATCG
		Обратный	AGTCTACTCAGCCGCAGGTTCCT
OlTx 1, OlTx 2	кДНК	Универсальный праймер T7cap	GTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTA ACAACGCAGAGT
CpTx 1c	гДНК	Прямой	CGATGAAGTTTTCGTTGTTCTTCAG
		Обратный	GATCATCTATCTCCAAACCAGCG
CpTx 3a		Прямой	GATTCCATAGCTGTTAATCTAGG
		Обратный	ATCGGAAGCTGAGTTAAGTTGAG

Всего мы нашли 20 последовательностей, кодирующих двудоменные токсины *Oxyopes*, принадлежащих семейству спайдеринов: 13 у *O. takobius* и семь у *O. lineatus* (вдобавок к шести кДНК была получена новая последовательность геномной ДНК, см. ниже). Как и в случае многих других токсинов (151), для спайдеринов характерны различные уровни вариации сигнальных, про- и зрелых последовательностей. Сигнальные пептиды и пропептиды идентичны друг другу или демонстрируют высокий уровень сходства (>74% и >62% идентичных а.о., соответственно), в то время как зрелые токсины более вариабельны (>42% идентичности).

Зрелые полипептиды можно разделить на два подсемейства, различающихся по длине: Ox-I (109–114 а.о.) и Ox-II (135–142 а.о.). К подсемейству Ox-I относятся OtTx 1a–e, 2a–f и OlTx 1a–c, в то время как подсемейство Ox-II объединяет OtTx 3a/b и OlTx 2a–c. Внутри каждого подсемейства идентичность между токсинами превышает 68%, тогда как между подсемействами она лежит в диапазоне 42–50%. Интересно, что все полипептиды Ox-I напоминают двойные или сложные предшественники с мутированными сайтами процессинга (см. выше пояснения для OtTx 1 и 2), но ни один из полипептидов Ox-II не содержит последовательности, похожей на сайт PQM. Разница в длине токсинов из подсемейств Ox-I и Ox-II обусловлена их N-концевыми доменами: они состоят из 47–55 и 69–73 а.о., соответственно, при этом у обоих подсемейств можно выделить «основные» последовательности, которые

демонстрируют умеренное, но значительное сходство друг с другом (идентичность ≥30%). N-Концевые домены Ox-II вдобавок обладают «дополнительными» последовательностями, которые увеличивают их длину и содержат несколько повторов Gly-Lys-Ser. ICK-домены более консервативны (≥59% идентичных а.о.), а у некоторых токсинов они даже совпадают (как на уровне белка, так и на уровне кДНК).

3.12.4.4. Структура генов OlTx

На основе проанализированных последовательностей кДНК мы сконструировали специфические праймеры, которые использовали для амплификации фрагментов геномной ДНК, полученной из ядовитых желез *O. lineatus*, с помощью ПЦР. Эти фрагменты затем субклонировали в плазмидный вектор и секвенировали; в результате мы идентифицировали гены, кодирующие предшественники pOlTx 1a/b и 2a (GenBank IDs: KF766558, KF766559 и KF766561). Последовательность, кодирующую pOlTx 1d (KF766560), обнаружили на уровне геномной ДНК, но не кДНК.

Сравнение кДНК и полученных геномных последовательностей показало, что гены *oltx* не содержат интронов. Ранее полагали, что это свойственно генам пептидных токсинов пауков (110, 1211, 1212); исключением считали примитивного аранеоморфного паука *D. canities*, у которого был обнаружен интрон-содержащий ген пептидного токсина (1213). Недавние успехи в секвенировании геномов пауков ставят под сомнение всеобщую безынтронность генов пептидных токсинов. К примеру, у *Hadronyche cerberea* (Atracidae) гены ноттинов состоят из трех экзонов, соответствующих сигнальному пептиду, пропоследовательности и зрелому токсину (1214). Что касается генов белковых токсинов, то здесь наблюдается разнообразие: гены латротоксинов безынтронные (1215), в то время как гены PLD у *Loxosceles* и *Sicarius* содержат интроны (307). Возможно несколько причин отсутствия интронов в генах пептидных токсинов пауков. Во-первых, геномам беспозвоночных более свойственна утрата интронов в сравнении с позвоночными (1216). Во-вторых, утрата интронов более характерна для генов с высоким уровнем экспрессии (1217), и это может служить оптимизации энергетических затрат при синтезе токсинов в ядовитых железах. Наконец, согласно модели Л.И. Патрушева, скорость накопления мутаций в кодирующих областях генома зависит от соотношения их длины с некодирующими областями. В таком случае безынтронность обусловливает ускоренный мутагенез генов токсинов и тем самым обсуждавшиеся в Обзоре литературы их ускоренную эволюцию и возникновение комбинаторных библиотек.

3.12.4.5. Получение полноразмерного OtTx 1a и его модулей

Чтобы обеспечить достаточное количество материала для функциональных исследований, мы получили рекомбинантный OtTx 1a. Аналогично другим дисульфид-содержащим полипептидам (см. выше, например, раздел «Синтез PT2, PT2-N и PT2-C»), мы решили производить его в виде химеры с белком-помощником Trx. Зрелый OtTx 1a не содержит остатков метионина, это свойство позволяет использовать бромциан для расщепления слитного белка, и поэтому между Trx и OtTx 1a вставили Met. Чтобы замаскировать мембранноповреждающую активность N-концевого домена токсина, мы использовали природную пропоследовательность из pOtTx 1a. Такой подход оказался эффективным в случае ряда АМП и позволил получить рекомбинантные цитолитические пептиды (915, 1218). Слитный белок Trx-OtTx 1a также содержал His-таг для аффинной очистки с помощью IMAC. После расщепления химерного белка бромцианом целевой полипептид очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ. Рекомбинантный OtTx 1a сравнивали с нативным токсином и обнаружили, что он обладает такой же Мм, инсектицидной активностью в отношении личинок мухи, антимикробной активностью в отношении кишечной палочки (см. ниже) и временем удерживания при ОФ-ВЭЖХ. Таким образом, мы успешно получили рекомбинантный OtTx 1a; конечный выход составил ≈0,5 мг с 1 л питательной среды. Дальнейшие исследования проводили с использованием рекомбинантного OtTx 1a.

Мы также получили отдельные домены OtTx 1a, чтобы сравнить их активность с полноразмерным токсином. В линкерной последовательности, помимо мутантной версии PQM, мы также обнаружили мутантную версию iPQM — другого мотива процессинга, который имеется в двойных и сложных предшественниках, содержащих более одной зрелой цепи (см. Обзор литературы, раздел «Биосинтез токсинов паукообразных»). Этот мотив ограничивает C-конец зрелой цепи, точно так же, как обычный PQM ограничивает N-конец (1219). В нашем случае Q42, по-видимому, заменяет ключевой аргинин. Поэтому мы решили синтезировать «неизмененные процессированные» версии N- и C-концевых доменов OtTx 1a (а.о. 1–41 и 50–108). Ввиду предсказанной мембранной активности мы назвали N-концевой домен OtTx 1a-AMP; C-концевой домен получил название OtTx 1a-ICK.

OtTx 1a-AMP синтезировали с помощью стандартных методов пептидной химии (экспериментальная средняя Мм: 4816,3 Да; расчетное значение: 4815,9 Да), тогда как OtTx 1a-ICK получили в бактериальной системе экспрессии. Во втором случае мы не включили пропоследовательность в экспрессионный вектор, поскольку потенциально токсичный N-концевой цитолитический домен был удален; кодон метионина ввели непосредственно перед OtTx 1a-ICK. После аффинной очистки слитный белок подвергали окислению на воздухе, а свернутый C-концевой домен OtTx 1a очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ после расщепления

химеры бромцианом. Фракция, соответствующая OtTx 1a-ICK, давала на хроматограмме симметричный пик, что указывает на однозначное образование S-S-связей. Выход составлял ≈5 мг с 1 л питательной среды, что значительно превышало выход полноразмерного токсина. Чистота как OtTx 1a-AMP, так и OtTx 1a-ICK была проверена с помощью МАЛДИ МС и аналитической хроматографии и оказалась >98%. Стоит оговориться, что поскольку расположение S-S-мостиков не было определено, мы не можем однозначно исключить неправильное сворачивание рекомбинантных полипептидов.

3.12.4.6. Вторичная структура OtTx 1a

Применение алгоритмов предсказания вторичной структуры, например JPred, приводит к идентификации модулей OtTx 1a. Дело в том, что первые ~45 а.о. (OtTx 1a-AMP) предсказываются как α-спираль, тогда как С-концевая часть (OtTx 1a-ICK) демонстрирует высокую склонность к формированию β-изгибов. А.о. в области линкера (46–55) имеют наибольшую склонность к образованию случайного клубка.

Измерения спектров КД подтвердили эти расчеты. Они указали на высокое содержание β-тяжей и β-изгибов в OtTx 1a (таблица 62), что согласуется с предположением, что этот токсин формирует укладку типа ICK. То же самое верно для изолированного домена OtTx 1a-ICK. Более того, конформация OtTx 1a-ICK не претерпевает изменений при переносе пептида из водного раствора в среду, имитирующую мембранное окружение. Напротив, конформация линейного домена OtTx 1a-AMP заметно зависит от среды: содержание α-спирали составляло <10% в фосфатном буфере и изменилось до >70% после добавления ТФЭ или ДСН (таблица 62). Важно, что пропорциональные изменения были обнаружены и в полноразмерном токсине.

3.12.4.7. Пространственная структура модулей OtTx 1a

Для исследования пространственной организации OtTx 1a в растворе и мембранном окружении мы использовали методы ЯМР-спектроскопии. Полноразмерный токсин оказался слишком сложным объектом: его структуру не удалось разрешить ввиду сильного перекрывания сигналов в спектрах ЯМР. Поскольку для OtTx 1a характерна доменная организация, альтернативным подходом может быть исследование структуры отдельных модулей (OtTx 1a-AMP и OtTx 1a-ICK). При этом теряется информация о возможном взаимодействии доменов, однако такой подход является общепринятым при исследовании многодоменных белков, когда не удается разрешить структуру полностью (1220).

Таблица 62. Содержание элементов вторичной структуры у OtTx 1a и его производных согласно данным КД.

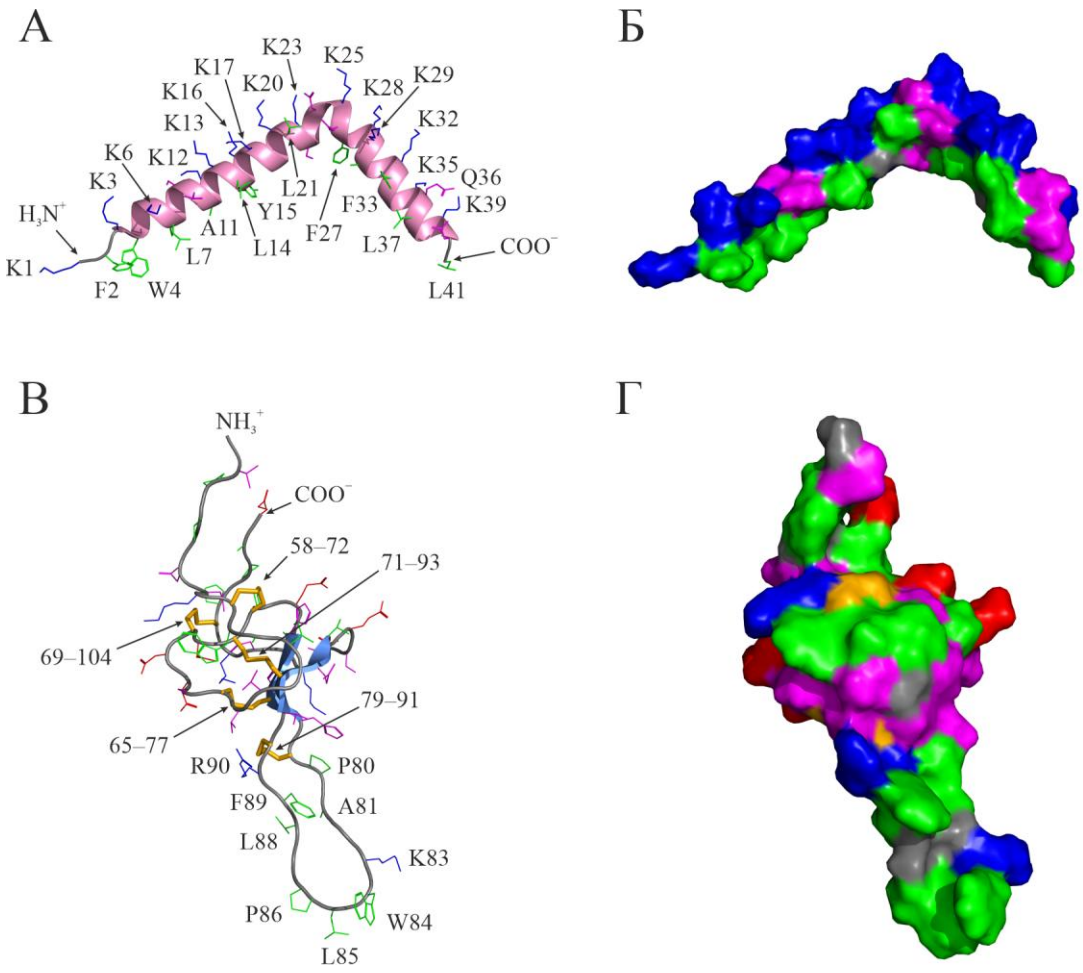
Соединение	Раствор	Содержание вторичной структуры, %			
		α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Клубок
OtTx 1a	Фосфатный буфер (pH 7,2)	9	30	24	37
	ДСН	48	7	15	30
	50% ТФЭ	48	18	20	14
OtTx 1a-AMP	Фосфатный буфер (pH 7,2)	7	34	24	36
	ДСН	81	2	1	16
	50% ТФЭ	73	2	6	19
OtTx 1a-ICK	Фосфатный буфер (pH 7,2)	19	31	22	29
	ДСН	21	25	23	31
	50% ТФЭ	18	42	17	23

Мицеллы ДСН (20 мМ; молярное соотношение детергента и полипептида 100–240 : 1) были приготовлены в фосфатном буфере.

Как было сказано выше, OtTx 1a-AMP мы получили химическим синтезом, тогда как рекомбинантный OtTx 1a-ICK продуцировали в бактериях. Для структурных исследований мы также приготовили ^{15}N-меченый OtTx 1a-ICK (для этого использовали «минимальную» ростовую среду M9 с добавлением $^{15}NH_4Cl$ и среды ISOGRO-^{15}N в качестве источника азота; см. Методы), его выход составил ≈2 мг с 1 л питательной среды. Сравнение средних Мм ^{15}N-OtTx 1a-ICK (экспериментальная: 6433,2 Да; теоретическая: 6433,1 Да) и немеченого полипептида (экспериментальная: 6355,1 Да; теоретическая: 6355,1 Да) показало, что все атомы азота были заменены на изотоп ^{15}N.

Структуру модулей OtTx 1a мы изучили с использованием спектроскопии ЯМР. OtTx 1a-AMP неупорядочен в воде, но в мицеллах ДФХ он приобретает α-спиральную конформацию и содержит два α-спиральных сегмента (W4–S22 и N26–K39), соединенные коротким неупорядоченным линкером (PDB ID: 2N85; рисунок 120A, Б). Наблюдаемый уровень спирализации (≈80%) хорошо согласуется с данными КД (см. выше, таблица 62). Обе спирали амфифильные: гидрофобные а.о. располагаются с одной стороны и, по-видимому, взаимодействуют с хвостами ДФХ, тогда как гидрофильные боковые цепи, включая многочисленные положительно заряженные а.о., локализованы с противоположной стороны и предположительно взаимодействуют с фосфатными группами детергента и растворителем. Отметим, что такой структурный мотив спираль-шарнир-спираль довольно широко распространен среди цитотоксинов (1221), например, он характерен для структуры Ltc 2a (рисунок 3) (267); OtTx 1a-AMP выделяется благодаря своей исключительной длине.

Рисунок 120. Пространственная структура модулей OtTx 1a. (А, Б) Структура OtTx 1a-AMP в суспензии мицелл ДФХ (PDB ID: 2N85). (В, Г) Структура OtTx 1a-ICK в воде (2N86). (А, В) Ленточное представление, указаны N- и С-концы цепи, окраска и обозначения как на рисунке 3. Для OtTx 1a-ICK указаны дисульфидные мостики, они окрашены желтым; подписаны а.о. длинной петли β-шпильки (Б, Г) Показана молекулярная поверхность полипептидов, раскрашенная в соответствии со свойствами а.о. как на рисунке 10.



OtTx 1a-ICK (PDB ID: 2N86; рисунок 120В, Г) представляет собой ноттин (134, 135), что, как много раз отмечалось, характерно для нейротоксинов пауков (793), при этом имеют место некоторые важные модификации. Молекула стабилизирована пятью дисульфидами (первый пример изученной структуры такого типа среди ICK-токсинов) и 13 водородными связями. Небольшой β-лист образован двумя антипараллельными β-тяжами (H75–H78 и T92–V95, нумерация полноразмерного OtTx 1a), кроме того, в N-концевой части домена имеются два β-изгиба (A60–T63 и D67–D70). Дисульфиды C58–C72, C65–C77 и C71–C93 формируют мотив ICK, тогда как C79–C91 стабилизирует протяженную петлю β-шпильки и является частью мотива ESM. Наконец, C69–C104 скрепляет длинную С-концевую область пептида с его ядром. Как отмечалось выше, OtTx 1a-ICK показывает значительное сходство с однодоменными токсинами OxyTx 1 и 2 (245, 1208) и потому может служить шаблоном для моделирования их пространственной структуры.

Изученная нами модульная двудоменная организация OtTx 1a уникальна среди белков с известной пространственной структурой. Примечательно, что, как показано в недавнем исследовании (666), некоторые токсины скорпионов (β-KTx и, в частности скорпины) организованы аналогично спайдеринам. В обоих случаях С-концевой домен нейротоксина следует за N-концевым линейным АМП-модулем. В β-KTx, однако, С-концевой домен имеет укладку типа CSα/β, обычную для токсинов скорпионов, а не ICK (662).

3.12.4.8. Биологическая активность OtTx 1a и его модулей

OtTx 1a обладает инсектицидной и цитолитической активностью широкого спектра действия: $ЛД_{50}$ против личинок мясной мухи *S. carnaria* составляет ≈75 мкг/г, а значения МИК против различных штаммов грамположительных и грамотрицательных бактерий лежат в области порядка 0,1–10 мкМ (таблица 52). Чтобы локализовать функционально важную часть токсина, мы исследовали активность обоих доменов OtTx 1a. OtTx 1a-AMP сохранил активность полноразмерного токсина: $ЛД_{50}$ против личинок мясной мухи составила 50 мкг/г, а значения МИК против различных бактерий попали в низкий микромолярный диапазон (таблица 52). Напротив, OtTx 1a-ICK оказался неактивным: в дозах до 200 мкг/г он был безвреден для личинок насекомых и в концентрациях до 25 мкМ оказался неэффективным в анализах антибактериальной активности.

Похоже, что линейный модуль OtTx 1a-AMP служит функциональным «ядром» молекулы OtTx 1a. Однако возможно, что нам не удалось обнаружить природную мишень спайдеринов (их инсектицидная активность в наших тестах на мухах была весьма умеренной, по-видимому, они нацелены на других насекомых) и, соответственно, молекулярную мишень дисульфид-богатого модуля OtTx 1a-ICK. Стоит отметить, что в этом тоже проявляется сходство спайдеринов со скорпинами: у дисульфид-богатого модуля последних так же не удалось обнаружить значимой биологической активности (см. Обзор литературы, раздел «Двудоменные токсины скорпионов»).

Помимо антибактериальной активности, OtTx 1a-AMP индуцирует лизис эритроцитов человека; его эффективная концентрация, провоцирующая высвобождение гемоглобина на 50%, составляет 8 мкМ. Пептид проявлял цитотоксическую активность: 50% гибели клеток A549 и HeLa наблюдали при концентрациях ≈ 15 мкМ. OtTx 1a-AMP, таким образом, является эффективным неселективным цитолитическим пептидом (одним из наиболее эффективных из всех известных), похожим по биологической активности на мелиттин (254) или латарцины (1178).

3.12.4.9. Механизм антибактериальной активности OtTx 1a-AMP

OtTx 1a и OtTx 1a-AMP проявляют мембранную активность и осаждаются из раствора вместе с липосомами (1000 нм). OtTx 1a-AMP ингибирует рост бактерий и обладает бактерицидной активностью. Для *S. aureus* и *E. faecalis* минимальные бактерицидные концентрации (МБК) были равны значениям МИК (таблица 52). Бактерицидный эффект OtTx 1a-AMP развивался быстро. Так, 15-минутное воздействие пептида при 2×МБК приводило к полной гибели *S. aureus*. Не более 2–3 колоний на чашку с агаром образовывалось после 15–30 мин предварительной инкубации *S. aureus* с пептидом в концентрации 1,25 мкМ, а более длительная инкубация (>1 ч) полностью уничтожала бактерии.

Использование КЛСМ показало, что бактерицидный эффект OtTx 1a-AMP связан с проницаемостью бактериальной мембраны. Короткое воздействие OtTx 1a-AMP на *S. aureus* приводило к одновременной утечке BCECF из цитоплазмы и проникновению внутрь клетки PI (рисунок 121В, Г); интактная бактериальная мембрана сохраняет BCECF в цитоплазме и исключает вход PI (рисунок 121А, Б).

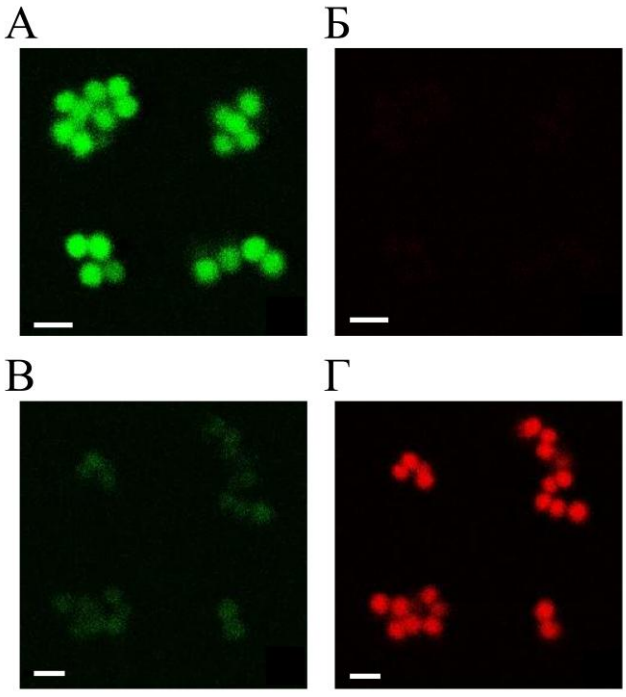


Рисунок 121. Изображения клеток *S. aureus*, обработанных PI и ацетоксиметиловым эфиром BCECF, полученные с помощью КЛСМ. (А, Б) Интактные бактерии; (В, Г) клетки, подвергнутые воздействию 1,25 мкМ OtTx1a-AMP в течение 10 мин. (А, В) Распределение BCECF в цитоплазме. (Б, Г) Распределение PI в комплексе с ДНК. Масштабная линейка, 2 мкм.

3.12.4.10. Взаимодействие модулей OtTx 1a с липидными мембранами

Итак, мы показали, что OtTx 1a и OtTx 1a-AMP эффективно подавляют рост бактерий путем образования дефектов в клеточных мембранах. Мы использовали отрицательно заряженные липосомы (ДОФЭ / ДОФГ; 100 нм) для моделирования мембран бактерий и исследования склонности к связыванию с ними доменов OtTx 1a. Мы титровали растворы пептидов суспензией липосом и регистрировали интегральную интенсивность сигналов в амидной

области ^{1}H-ЯМР спектра. Постепенное снижение интенсивности сигналов ЯМР для OtTx 1a-AMP наблюдалось из-за уменьшения концентрации свободного пептида в результате связывания с липосомами. Никаких изменений не наблюдалось для OtTx 1a-ICK, что указывает на отсутствие у него мембранной активности; таким образом, только N-концевой домен спайдеринов способен взаимодействовать с мембранами.

Затем по экспериментальным данным построили изотерму Ленгмюра, чтобы получить параметры связывания OtTx 1a-AMP с липосомами: константу диссоциации (K_l = 0,11 ± 0,06 мкМ) и количество липидов, составляющих сайт связывания пептида (N = 10,7 ± 0,6). Этот результат согласуется с исследованиями других мембрано-активных пептидов. Например, для мелиттина из яда пчелы получена $K_l \approx 20$ мкМ, измеренная с использованием везикул из ПОФХ и 1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфоглицерина (ПОФХ / ПОФГ, 9 : 1) (1222), а для магайнина-2 из кожи лягушки получена $K_l \approx 50$ мкМ (ПОФХ / ПОФГ, 3 : 1) (1223). Наблюдаемое нами более высокое сродство OtTx 1a-AMP к мембране частично обусловлено различиями в липидном составе использованных липосом.

Различия в мембранной активности двух доменов OtTx 1a коррелируют с нашими результатами, указывающими на то, что OtTx 1a-AMP ответственен за биологическую активность полноразмерного токсина. Таким образом, мы приписываем наблюдаемую токсичность OtTx 1a для насекомых его цитолитической активности, которая в свою очередь основана на его способности разрушать мембрану, а OtTx 1a-AMP выступает при этом в роли эффективного мембранного якоря.

3.12.4.11. Эволюция OtTx

Мы проанализировали скорость эволюции фрагментов генов, кодирующих сигнальные пептиды, пропептиды, а также линейные и ICK-домены спайдеринов (всего 20 последовательностей). Z-тест селекции проводили по методу Нэя-Годжобори (968). Нуклеотидные последовательности, кодирующие фрагменты белка-предшественника, выравнивали, все положения, содержащие пробелы, устраняли. Поскольку последовательности линейных модулей существенно различаются по длине, в анализе использовали только их «коровые» части. Неожиданно обнаружили, что отрицательный отбор воздействует не только на сигнальные пептиды и пропептиды, но также на зрелые линейные и ICK-домены (таблица 63). При парном сравнении последовательностей можно предположить воздействие положительного отбора только на N-концевые домены, причем только в парах OtTx 2a–e и OtTx 2b–e; этот вывод однако не проходит коррекцию Бонферрони для множественного сравнения. Использование метода максимального правдоподобия подтверждает эти наблюдения: для подавляющего большинства пар N-концевых доменов предполагается отрицательный отбор (d_N/d_S <

0,9 для >90% пар), только для пар последовательностей OtTx 2a–e и OtTx 2b–e значение d_N/d_S достигало 15,3, а еще для четырех пар было >2, что можно интерпретировать как положительный отбор.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что гены, кодирующие двудоменные токсины OtTx и OlTx, консервативны, но положительный отбор может действовать на их N-концевой домен. Это предположение мы исследовали дополнительно и подтвердили тестами отношения правдоподобия. Оба использованных теста показали, что последовательности, кодирующие зрелые полипептиды, подвергаются положительному отбору. Модели M2a и M8, допускающие положительный отбор, указывали только один сайт L14 (нумерация по OlTx 1a) как подверженный такому отбору (апостериорная вероятность $P > 0,95$), этот сайт локализован в N-концевом домене.

Таблица 63. Результаты кодон-ориентированного Z-теста на отрицательный отбор для сигнальных пептидов, пропоследовательностей, а также линейных и ноттиновых доменов зрелых спайдеринов.

	p	$d_S - d_N$	Число сайтов
Сигнальные пептиды	0,039	1,783	18
Пропоследовательности	0,017	2,149	39
Линейные домены	0,0001	3,951	46
ICK-домены	0,001	3,216	58

Наконец, мы дополнительно скринировали библиотеку кДНК *O. takobius* на последовательности, сходные со спайдеринами. В результате мы обнаружили последовательности, кодирующие белковые предшественники однодоменных токсинов с 10 остатками цистеина, включая OxyTx 1 и 3 (GenBank IDs: KF766562 и KF766563). Препропоследовательности предшественников и C-концевые модули двудоменных токсинов демонстрируют значительное сходство с соответствующими последовательностями предшественников однодоменных ICK-токсинов (идентичность ≈ 40%).

Выше мы отмечали, что N-концевой домен OtTx (OtTx-AMP) уникален, его последовательность не обнаруживает сходства с другими белками; напротив, C-концевой домен (OtTx-ICK) очень похож на однодоменные токсины OxyTx 1 и 2 из яда того же паука. Таким образом, по всей видимости, эти токсины родственны, и OtTx произошли от OxyTx-подобного токсина вследствие включения АМП-модуля. Вероятно, произошла вставка фрагмента ДНК, кодирующего линейный домен, в ген однодоменного ICK-токсина между частями, кодирующими препропоследовательность и зрелую цепь. Однако мы не можем предполагать, что N-концевой линейный домен происходит из линейных токсинов, поскольку его гомологи не были обнаружены ни в библиотеке кДНК ядовитых желез *O. takobius*, ни в от-

крытых базах данных. Представляется возможным возникновение последовательности N-концевого домена *de novo*, ведь такой сценарий довольно широко распространен (1224).

Другой возможный сценарий — происхождение N-концевого домена из интрона. Многие гены токсинов скорпионов содержат интроны, место соединения которых находится на границе сигнального и зрелого пептидов (1225, 1226). У генов пептидных токсинов пауков, которые содержат интроны, сайты сплайсинга расположены на границах сигнальный пептид / пропептид и пропептид / зрелый пептид (1213, 1214). Мы можем предположить, что N-концевой домен происходит из интрона, локализованного между экзонами, кодирующими пропептид и зрелый токсин. В пользу этой гипотезы говорит то, что донорный сайт сплайсинга обнаруживается на 5'-конце некоторых нуклеотидных последовательностей, кодирующих линейные домены Ox-II. Предположительно, мутация, которая затронула акцепторный сайт, привела к нарушению сплайсинга и превращению интрона в кодирующую последовательность. Многие интроны генов токсинов скорпионов A/T-богатые (1225, 1226). Если преобразовать их в кодирующую последовательность, она будут иметь высокое содержание кодонов Lys (AA[ag]), Phe (TT[tc]), Leu (CT[agtc] и TT[ag]) и Asp (AA[tc]). Фактически, фрагмент гена, кодирующий N-концевой домен спайдеринов, является A/T-богатым (A + T ≈ 60%), а последовательность N-концевого домена OtTx 1a, например, содержит 39% Lys, 15% Leu, 10% Phe и 7% Asp (всего 71%). Очевидно, что для разработки более реалистичной гипотезы о происхождении спайдеринов наши знания в области геномики пауков должны быть значительно расширены.

Результаты исследований спайдеринов опубликованы (656, 1227, 1228).

3.12.5. Модульные токсины Cheiracanthium punctorium

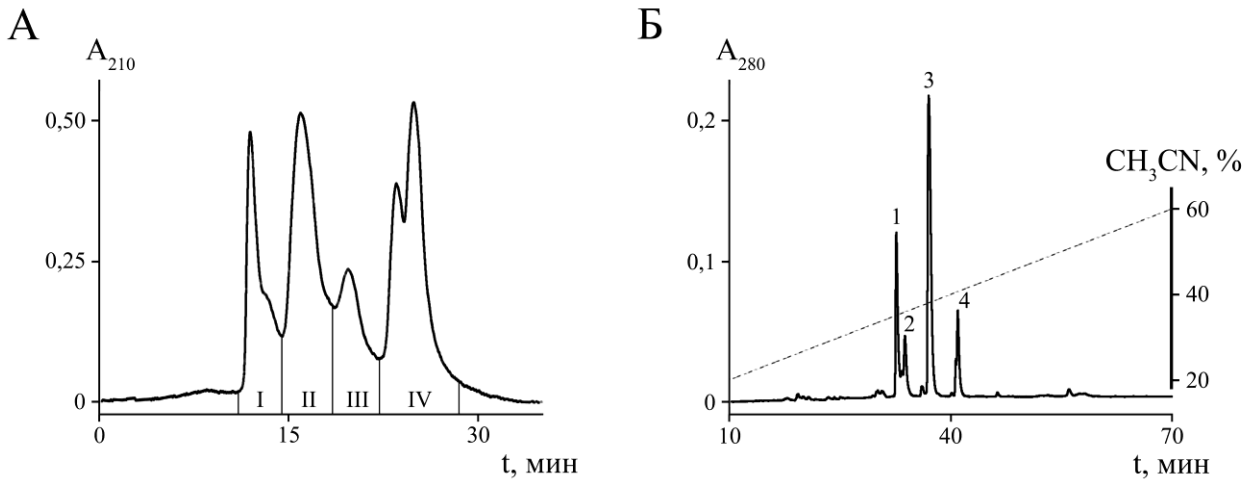
Выше при обсуждении результатов электрофоретического разделения яда различных паукообразных (рисунок 40) мы отмечали, что яд желтосумного колющего паука (англ. yellow sac spider) *Ch. punctorium* (NCBI/UniProt taxon identifier: 682790; семейство Eutichuridae) по своему составу отличается от большинства других пауков и содержит сравнительно высокомолекулярные компоненты. На роль белкового компонента яда была предложена PLA_2 (683, 1229), однако убедительных данных по молекулярной характеристике представлено не было.

Мы обнаружили, что цельный яд *Ch. punctorium* обладает инсектицидной ($ЛД_{50}$ для личинок мясной мухи *S. carnaria* ≈ 3 мкг/г), гемолитической, цитотоксической и мембранолитической активностью. Наши результаты подтверждают предыдущие исследования этого и других видов *Cheiracanthium* (683).

3.12.5.1. Разделение яда *Ch. punctorium* и первичная структура двудоменных токсинов

Чтобы выделить активный компонент яда *Ch. punctorium*, мы использовали наш обычный подход, описанный выше и сочетающий два метода жидкостной хроматографии, а именно: гель-фильтрацию и ОФ-ВЭЖХ (рисунок 122). После гель-фильтрации высокую токсичность для насекомых наблюдали в двух фракциях с малым временем удерживания (I, с компонентами предполагаемой Мм >30 кДа, и II, ~7–30 кДа). Фракция I с наиболее высокомолекулярными компонентами может содержать предполагаемую PLA_2 (683). Во фракции II имеются несколько полипептидов с Мм ≈ 15 кДа. Разделение этой фракции с помощью ОФ-ВЭЖХ дало ряд субфракций (рисунок 122Б), большинство из которых оказались токсичны. Согласно аналитической ВЭЖХ и МАЛДИ МС, преобладающая субфракция (≈10% тотального белка яда) представлена одним компонентом (содержание >95%) с Мм ≈ 15 100 Да, который мы назвали CpTx 1.

Рисунок 122. Разделение яда *Ch. punctorium*. (А) Эксклюзионная хроматография цельного яда на колонке TSK 2000SW (7,5×600 мм). Скорость потока 1 мл/мин. Фракции обозначены римскими цифрами. (Б) ОФ-ВЭЖХ фракции II из (А) на колонке Jupiter C_5 (4,6×150 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Субфракции обозначены цифрами.



Полную аминокислотную последовательность CpTx 1 (UniProt IDs: C0HKG7–9) мы установили с использованием комбинации методов N-концевого секвенирования по Эдману, МС и сайт-специфического протеолиза (рисунок 123). Наличие и число дисульфидных связей оценивали как описано выше для LtTx. CpTx 1 восстанавливали ДТТ, а тиольные группы затем алкилировали 4-винилпиридином. Мм токсина увеличилась до 16800 Да, что свидетельствует о наличии 16 остатков цистеина. Поскольку попытка модификации невосстановленного CpTx 1 не приводила к увеличению его Мм, все остатки цистеина вовлечены в образование внутримолекулярных дисульфидных мостиков.

Рисунок 123. Установление полной аминокислотной последовательности CpTx 1. Последовательности, установленные методом Эдмана и/или МС/МС, представлены стрелками, выровненными по результирующей полной последовательности CpTx 1. Пунктирные линии обозначают частичные последовательности больших фрагментов, полученных при гидролизе с помощью BrCN и Glu-C, которые не были установлены непосредственно.



Секвенирование восстановленного и алкилированного CpTx 1 по Эдману позволило определить 40 первых N-концевых а.о. Затем мы провели следующие реакции селективного протеолиза: (а) расщепление восстановленного алкилированного CpTx 1 бромцианом, (б) эндопротеиназой Glu-C, (в) эндопротеиназой Arg-C, а также (г) «ограниченный» протеолиз эндопротеиназой Glu-C невосстановленного токсина. В каждом случае протеолитические фрагменты разделяли с помощью ОФ-ВЭЖХ, их Мм измеряли с помощью МАЛДИ МС, а последовательности определяли по Эдману (альтернативно секвенирование выполняли с помощью МС/МС). В результате мы получили пептидную карту полной аминокислотной последовательности CpTx 1 (134 а.о.; рисунок 123). В частности, расщепление токсина бромцианом привело к образованию двух фрагментов: бóльший фрагмент (≈12,5 кДа) соответствует N-концевой части CpTx 1, а меньший фрагмент (4312 Да) — его С-концевой части, которую полностью секвенировали по Эдману (37 а.о.). Ограниченный протеолиз невосстановленного токсина эндопротеиназой Glu-C дало четыре фрагмента: N-концевой (≈5,9 кДа), С-концевой (1596 Да; 14 определенных а.о.), а также полная и укороченная с С-конца формы центрального фрагмента (≈7,7 кДа и ≈7,1 кДа соответственно; определено 39 N-концевых а.о.). Расщепление восстановленного и алкилированного CpTx 1 тем же ферментом Glu-C дало набор фрагментов, большинство из которых были полностью секвенированы. Мы отме-

чаем, что при щелочном pH, использованном в нашем эксперименте, эндопротеиназа Glu-C не была селективной по отношению к остаткам глутаминовой кислоты, но также катализировала гидролиз по остаткам аспарагиновой кислоты. Наконец, мы обнаружили, что эндопротеиназа Arg-C предпочтительно расщепляет CpTx 1 по остатку R124, гидролиз с меньшей эффективностью происходил по другим остаткам аргинина и лизина, и соответствующие фрагменты мы однозначно идентифицировали (рисунок 123).

CpTx 1 представляет собой катионный полипептид (заряд +8 при pH 7, pI ≈ 10). Он амидирован на C-конце: измеренные Мм C-концевых фрагментов отличаются на 1 Да от соответствующих расчетных значений. В ходе секвенирования выявлена микрогетерогенность CpTx 1 с незначительными заменами в двух положениях: N33S и D81E; на рисунке 124 показана последовательность мажорной формы CpTx 1a. В обоих случаях минорные формы составляли ≈30% общего белка. Мы не могли однозначно определить последовательности этих форм CpTx 1 (либо две дополнительные изоформы, которые несут по одной замене, либо только одна дополнительная изоформа с обеими заменами одновременно). Эта загадка была решена путем секвенирования кДНК (см. ниже).

16 остатков цистеина в составе CpTx 1 образуют два мотива первичной структуры общей формулы: $CX_6CX_6CCX_8CXCX_nCXC$. Эти мотивы содержат как PSM (CX_6CX_nCC), так и ESM ($CXCX_nCXC$), характерные для нейротоксинов пауков (124, 158). Более того, оба мотива полностью соответствуют более общему мотиву ICK: $CX_{2–7}CX_{3–11}CX_{0–7}CX_{1–17}CX_{1–19}C$. Как показано расщеплением Glu-C нативного токсина (см. выше), S-S-мостики образуются исключительно внутри двух мотивов. Следовательно, CpTx 1 может быть представлен в виде модульного полипептида, содержащего два дисульфид-богатых домена: CpTx 1-N и CpTx 1-C. Интересно, что модули имеют низкое, но значимое сходство последовательностей друг с другом (≈28% идентичных a.o.; рисунок 125).

Рисунок 124. Аминокислотная последовательность CpTx 1a и его доменов CpTx 1a-N и CpTx 1a-C, состоящих из ICK и AMP фрагментов. Модули указаны стрелками снизу, остатки цистина выделены желтым, сверху показано расположение дисульфидных мостиков. Мотив, при сдвиге рамки считывания напоминающий PQM, отмечен красным.

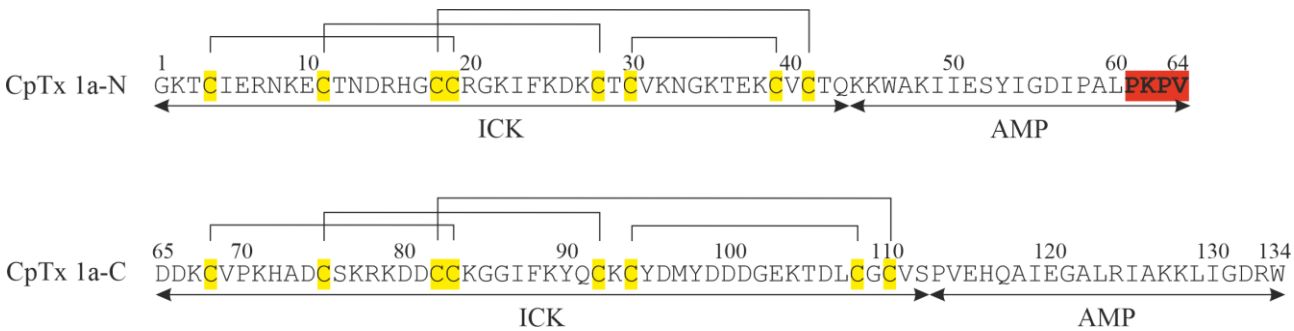
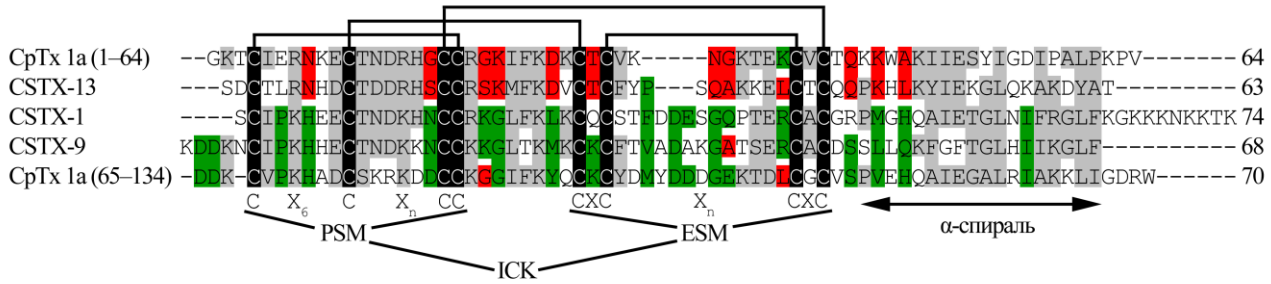


Рисунок 125. Сравнение аминокислотной последовательности CpTx 1a с токсинами *C. salei*. Два модуля (домена) CpTx 1-N (a.o. 1–64) и CpTx 1-C (65–134) сравниваются с последовательностями CSTX-1, 9 и 13; разрывы внесены для удобства. Длины полипептидных цепей указаны в правом столбце. CSTX-13 — двуцепочечный полипептид без ковалентной связи между Q34 и A35. Схожие a.o. выделены серым цветом. A.o., более характерные для CpTx 1a-N и CSTX-13, выделены красным; a.o., более характерные для CpTx 1a-C и токсинов CSTX-1 и 9, выделены зеленым. Инвариантные остатки цистеина выделены черным цветом, а расположение дисульфидных связей, установленное для CSTX, показано сверху. Ниже отмечены цистеиновые мотивы, указана предполагаемая область C-концевой α-спирали.



CpTx 1 мало похож на другие известные полипептиды, значимое сходство обнаружено с токсинами паука-волка *L. singoriensis*, идентифицированными по транслированным нуклеотидным последовательностям (1230), и токсинами CSTX из яда *C. salei* с идентичностью последовательностей ≈ 30–40% и строгой консервативностью остатков цистеина (рисунок 125; см. подробней об этих токсинах в Обзоре литературы). В частности, известно, что инсектицидный токсин CSTX-1 ингибирует Ca^{2+} каналы насекомых и млекопитающих (673); CSTX-9, вероятно, действует аналогично (1231), а CSTX-13 служит нейротоксическим энхансером (раздел «Компоненты, потенцирующие действие токсинов»), который обладает более низкой токсичностью по сравнению с другими упомянутыми токсинами CSTX, но синергетически увеличивает их эффективность (634). Расположение дисульфидных мостиков было определено для токсинов CSTX и соответствует мотиву ICK (634, 1231), поэтому для двух доменов CpTx 1 предложено такое же расположение S-S-связей.

Яд *Ch. punctorium* содержит не один двудоменный токсин. Хроматографический профиль разделения инсектицидной фракции показывает четыре отчетливых пика (рисунок 122). Пик 3 содержит токсины CpTx 1 (CpTx 1a–c). Мы обнаружили, что три других пика содержат компоненты с Мм ≈ 15 кДа, аналогично CpTx 1. Частичные N-концевые аминокислотные последовательности выделенных компонентов определили по Эдману (таблица 64). Полные аминокислотные последовательности полипептидов (UniProt IDs: A0A059T2H4 и W5U5X5) вывели путем сравнения частичных N-концевых последовательностей с транслированными последовательностями кДНК (см. ниже). Токсины из пиков 1, 2 и 4 получили названия CpTx 2a, 3a и 4a, соответственно. Подобно CpTx 1, эти токсины вызывали летальные

и паралитические эффекты на личинках мясной мухи *S. carnaria* ($ПД_{50}$ ≈ 25–50 мкг/г). Вместе токсины CpTx 1–4 составляют не менее 1/3 общего белка в яде *Ch. punctorium* и представляют его мажорные компоненты.

Таблица 64. Двудоменные токсины, обнаруженные в яде *Ch. punctorium*.

Пик на ВЭЖХ*	Название токсина	UniProt ID	Мм, Да	N-Концевая последовательность[$]
1	CpTx 2a	A0A059T2H4	14 970	GKKCIERNKECTNDRHGCCR
2	CpTx 3a	W5U5X5	14 980	--TCVPRDGDCTENRKACCRSK
3	CpTx 1a–c	C0HKG7–9	15 100	GKTCIERNKECTNDRHGCCR
4	CpTx 4a	C0HKG4	15 080	-ASCTERKHDCTKDRHSCCRG

*См. рисунок 122. [$]Прочерки добавлены для удобства сравнения.

3.12.5.2. Последовательности кДНК и белков-предшественников CpTx

Анализ библиотеки кДНК ядовитых желез *Ch. punctorium* мы проводили по процедуре, аналогичной описанной выше для *M. eupeus* (раздел «Анализ транскриптома ядовитых желез скорпиона *M. eupeus*»). В результате мы вывели предполагаемые последовательности токсинов. Последовательность CpTx 1, установленную с помощью белковой химии и МС, использовали затем для проведения поиска, в результате которого идентифицировали клоны, кодирующие три изоформы этого токсина. Основную изоформу мы назвали CpTx 1a (UniProt ID: C0HKG7), а две второстепенные изоформы с заменами D81E и N33S — CpTx 1b и c (C0HKG8 и C0HKG9) соответственно. Мы обнаружили, что CpTx 1a кодируется двумя типами мРНК (GenBank IDs: FN594513 и FN594514), соответствующими двум типам белка-предшественника (pCpTx 1a-1 и 1a-2), которые отличаются двумя аминокислотными заменами (в таблицах 65 и 66 приводится pCpTx 1a-1). Кроме того, мы обнаружили два типа предшественника CpTx 1b (pCpTx 1b-1 и 1b-2; GenBank IDs: FN594515 и FN594516) и предшественник для CpTx 1c (pCpTx 1c; GenBank ID: FN594517). Последовательности, содержащей обе замены, мы не обнаружили; следовательно, полагаем, что токсин CpTx 1 представлен тремя близкими изоформами, отличающимися точечными аминокислотными заменами.

Использование для поиска частичных N-концевых последовательностей (таблица 64) позволил идентифицировать в библиотеке еще 12 кДНК (GenBank IDs: KF155268–71 и KF155273–80), которые кодируют CpTx 1-подобные полипептиды; среди них обнаружены предшественники CpTx 2a и 3a (pCpTx 2a и 3a; таблицы 65 и 66). По сходству последовательностей 15 pCpTx формируют три группы (pCpTx 1a–g, 2a/b и 3a–f). Интересно, что сходство между группами различается: так, pCpTx 1a и pCpTx 2a больше похожи друг на друга (≈75% идентичных а.о.), чем на pCpTx 3a (≈40%).

Таблица 65. Последовательности белков-предшественников CpTx (pCpTx), выведенные из кДНК ядовитых желез *Ch. punctorium*.

Название	Аминокислотная последовательность		
	Сигнальный пептид	Пропоследовательность	Зрелая цепь
pCpTx 1a-1	MKFSLFFSVFFLAVLHACLS	ESEIDLEDEEHFMSS-DSFLSEIQ**DESR**	CpTx 1a*
pCpTx 2a	MKFSLFFGVLFLAILHSCLS	ESEKDLTDEDHFRSS-DSFLSEIQ**EESR**	CpTx 2a*
pCpTx 3a	MK--ALYLLGLLAFLYSCSS	ENVDDLQPESSEEENPGTFLEAIQ**EQSR**	CpTx 3a

Различающиеся остатки отмечены затемнением. PQM выделен жирным шрифтом.

Таблица 66. Аминокислотные последовательности зрелых токсинов CpTx из яда *Ch. punctorium*.

Название	Аминокислотная последовательность
CpTx 1a-N	GKTCIERNKECTNDRHGCCRGKIFKDKCTCVK-NGKTEKCVCTQKKWAKIIESYIGDIPALPKPV
CpTx 2a-N	GKKCIERNKECTNDRHGCCRGKIFKDKCECVG-SGGKERCVCKQKKWAKIIESYIGDIPTLPKPE
CpTx 3a-N	--TCVPRDGDCTENRKACCRSKIFQDRCQCRKVSQDKVACSCKQPYWLMKIEEILGDIPEKPKPV
CpTx 1a-C	DDKCVPKHADCSKRKDDCCKGGIFKYQCKCYDMYDD-DGEKTDLCGCVSPVEHQAIEGALRIAKKLIGDRW**GR**
CpTx 2a-C	DDKCVPKHEDCSERKNDCCKSGLFTLKCKCYDMQDDEDGKKTELCGCVQPFEHKAIEQALRFGKWMV**G**-----
CpTx 3a-C	EGKCVKKHHDCSQRKNDCCPGSMENYTCKCYNTLEEGAKE-SEICGCVSKADHQILAQGFRYVKRLHDL**R**---

Последовательности разделены на N и C-концевые домены. Различия отмечены затемнением. С-Концевые остатки глицина и аргинина, которые служат сигналом С-концевого амидирования или удаляются карбоксипептидазами, выделены жирным шрифтом.

Белки-предшественники pCpTx состоят из трех частей и относятся к простым предшественникам токсинов пауков, структуру которых мы подробно обсуждали выше для токсинов *L. tarabaevi* и *O. takobius*. Все они содержат типичные сигнальные пептиды и мотивы PQM (DESR, EESR или EQSR). Предшественники pCpTx 1 несут дополнительный С-концевой дипептид -GR, служащий сигналом С-концевого амидирования, что подтверждает данные секвенирования. pCpTx 2a содержит С-концевой остаток глицина, так же служащий сигналом амидирования, а pCpTx 3a имеет С-концевой остаток аргинина, по-видимому, удаляемый в ходе созревания белка карбоксипептидазой. Расчетные Мм процессированных зрелых токсинов соответствуют измеренным экспериментально (таблица 64), указывая на правильность установления структуры CpTx, выделенных из яда. Если сравнивать сегменты предшественников, то оказывается, что препропоследовательности pCpTx 1a и pCpTx 2a очень сходны (≈85% идентичных а.о.), в то время как зрелые цепи более вариабельны (≈70%); обратная ситуация наблюдается при сравнении pCpTx 1a и pCpTx 3a: их препропоследовательности различаются сильнее (≈35% идентичных а.о.), чем зрелые токсины (≈45%).

3.12.5.3. Структура генов CpTx

На основе проанализированных последовательностей кДНК мы сконструировали специфические праймеры, которые использовали для амплификации фрагментов геномной ДНК, полученной из ядовитых желез *Ch. punctorium,* с помощью ПЦР. Эти фрагменты затем клонировали в плазмидный вектор и секвенировали; в результате мы идентифицировали гены, кодирующие предшественники pCpTx 1c, 3a и 3g (GenBank IDs: KF255415–7). Сравнение последовательностей кДНК и полученных геномных последовательностей показало, что гены *cptx* не содержат интронов, аналогично обсуждавшимся выше генам других двудоменных токсинов *oltx*. Значение этого феномена также обсуждали выше (см. раздел «Структура генов OlTx»).

3.12.5.4. Вторичная структура CpTx

Пептиды с мотивом ICK обычно β-структурные с 2–3 антипараллельными β-тяжами, соединенными изгибами и петлями различной длины, стабилизированными дисульфидными мостиками. CpTx 1 преимущественно принимает конформацию β-листа и β-изгиба в водном растворе, как следует из анализа спектра КД (таблица 67). В присутствии бицелл, используемых для имитации фосфолипидных мембран, мы наблюдали изменения спектра, что указывает на молекулярные взаимодействия, которые приводят к структурным перестройкам токсина: отмечено значительное увеличение содержания α-спирали с одновременным уменьшением содержания клубка. Алгоритм JPred предсказывает два α-спиральных сегмента в ли-

нейных С-концевых областях обоих доменов CpTx 1 (а.о. ~44–54 и ~116–129; рисунок 124). Представленные в спиральной конформации, эти последовательности образуют амфифильные структуры с разделением гидрофильных и гидрофобных а.о., которые могут эффективно взаимодействовать с мембранами.

Таблица 67. Содержание элементов вторичной структуры у CpTx 1 согласно данным КД.

Раствор	Содержание вторичной структуры, %			
	α-Спираль	β-Структура	β-Изгиб	Клубок
Фосфатный буфер (pH 7,4)	20	27	22	30
Суспензия бицелл	40	25	16	19

Бицеллы из 1,2-дикапронил-sn-глицеро-3-фосфохолина и 1,2-димиристил-sn-глицеро-3-фосфохолина (1 : 2; общая концентрация 150 мМ; молярное соотношение липидов и белка 15 000 : 1) были приготовлены в фосфатном буфере (pH 7,4).

3.12.5.5. Биологическая активность и механизм действия CpTx

CpTx 1 токсичен в отношении личинок мясной мухи *S. carnaria* ($ЛД_{50}$ ≈ 10 мкг/г); дозы, вдвое превышающие значение $ЛД_{50}$ и выше, вызывают мгновенный паралич и смерть, а при дозах, близких к значению $ЛД_{50}$ и ниже его, возникает обратимый паралич. Токсин обладает цитолитической активностью в отношении клеток Sf9 насекомых: ≈5% клеток гибнет при концентрации токсина 0,5 мкМ и ≈20% при 10 мкМ. CpTx 1 вызывает приток органических катионов (PI) и анионов [5(6)-карбоксифлуоресцеин] в восприимчивые клетки. Для визуализации этого эффекта мы использовали КЛСМ, поскольку оптический срез должен быть тоньше, чем диаметр клетки, чтобы обнаружить различия между внутри- и внеклеточной концентрацией маркеров. Пептид-индуцированное повреждение мембраны сопровождается значительными изменениями морфологии клеток, включая образование пузырей на мембране. 10 мкМ CpTx 1 влияет на 20% клеточной популяции и вызывает токсичность через 30 мин.

Паралитические эффекты токсина мы дополнительно изучили на нервно-мышечных препаратах мух. При 50–200 нМ CpTx 1 вызывал стабильную и необратимую деполяризацию мышечных волокон, что в итоге приводило к сокращениям при более высоких концентрациях токсина. Тем не менее, токсин не влиял на спонтанные или вызванные нервной стимуляцией постсинаптические токи. Деполяризацию под действием CpTx 1 наблюдали и на нервно-мышечных препаратах лягушки, эти эксперименты выполняли в в сотрудничестве с лабораторией биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН. Средний уровень потенциала покоя в мышечных волокнах лягушки, измеренный в контрольных экспериментах, был ста-

бильным в течение более 1 ч (от −65 до −90 мВ в разных клетках). В присутствии 20 нМ СрТх 1 наблюдали умеренную, но статистически значимую деполяризацию (на ≈10–20 мВ через 30–60 мин). Увеличение концентрации токсина до 50 нМ вызывало гораздо более выраженный эффект, который не устранялся при отмывке; падение мембранного потенциала составило ≈50 мВ. Некоторые мышечные волокна демонстрировали кратковременное сокращение после 7–15 мин контакта с СрТх 1. Токсин вызывал повышение трансмембранного тока и соответствующее падение входного сопротивления клетки.

Удаление из физиологического раствора большей части NaCl и его замещение сахарозой не вызывало значительных изменений мембранного потенциала в контроле. Интересно, что в условиях низкого содержания Na^+ приложение СрТх 1 (50 нМ) в течение до 90 мин не деполяризовало мышечные волокна. Напротив, увеличение концентрации Na^+ в два раза (до 232 мМ) или добавление сахарозы, обеспечивающее одинаковое повышение тоничности, усиливали деполяризующее действие СрТх 1. Замена Na^+ ионами N-метил-D-глюкамина слабо влияла на деполяризующее действие токсина. Повышение концентрации Ca^{2+} с 0,6 до 3,6 мМ существенно ослабляло деполяризующее действие СрТх 1, аналогичный эффект наблюдался при добавлении ионов Co^{2+}: в концентрации 1 мМ наблюдали незначительное снижение деполяризующего действия токсина, а при 5 мМ деполяризация значительно уменьшалась. Предварительная 15-минутная обработка препаратов 1 мкМ ТТХ, 100 мкМ уабаина или 1 мМ амилорида не оказывала влияния на деполяризующее действие СрТх 1.

Мембранотропные эффекты СрТх 1 мы исследовали на БЛМ в сотрудничестве с лабораторией моделирования мембран и ионных каналов Института цитологии РАН. В контрольных экспериментах мембраны оставались неповрежденными в течение более 100 мин при ±100 мВ. Однако в присутствии 50 нМ СрТх 1 наблюдали ряд эффектов. В ≈40% случаев СрТх 1 вызывал нарушение БЛМ с или без предварительного появления флуктуаций проводимости. В других ≈40% случаев токсин не лизировал мембрану, но индуцировал проводимость в виде многочисленных временных флуктуаций переменной амплитуды тока (0,1–10 пА при ±100 мВ). Все эффекты были одинаково выражены при обеих полярностях. В оставшихся ≈20% экспериментов БЛМ оставались стабильными как в контроле. Увеличение концентрации СрТх 1 (≥150 нМ) приводило к более высокой вероятности как разрыва мембраны (≈60%), так и возникновения временных флуктуаций. Очень редко регистрировали одиночные каналы с амплитудой тока в диапазоне 0,2–2 пА.

Что касается механизма действия СрТх 1, то в настоящее время не удалось обнаружить его специфический рецептор. Показано, что токсин влияет на мембранный потенциал покоя мышечных волокон насекомых и позвоночных и этот эффект в итоге проявляется в значительной деполяризации, приводящей к мышечному сокращению и повреждению воло-

кон. Мы попытались охарактеризовать его возможную мишень, для чего использовали несколько подходов. (а) Поскольку замена ионов Na^+ на сахарозу подавляла эффект токсина, тогда как увеличение концентрации Na^+ усиливало его, CpTx 1 может открывать прямой вход Na^+ в мышечные клетки. Тот же эффект проявился, когда вместо увеличения Na^+ добавляли соответствующее количество сахарозы. Это может быть истолковано как результат повышения тоничности внешнего раствора, что так же может усиливать приток Na^+. (б) Замена Na^+ ионами N-метил-D-глюкамина, значительно менее проницаемыми через Na_v (1232) и эпителиальные Na^+ каналы (ENaC) (1233), не оказывала значительного влияния на деполяризацию, вызванную CpTx 1. Ни TTX, мощный блокатор Na^+ каналов (1056), ни Co^{2+}, неспецифический блокатор Ca^{2+} каналов (1234), ни амилорид, блокатор семейства ENaC и подмножества Ca_v (1235, 1236), не устраняли деполяризующий эффект CpTx 1. Поэтому активация Na_v, Ca_v или ENaC этим токсином кажется маловероятной. (в) Феноменологически эффекты CpTx 1 напоминают эффекты палитоксина, выделенного из кораллов, одного из самых сложных небелковых токсинов в природе (1237). Палитоксин нацелен на Na^+,K^+-АТФазу, переключая ее с активного на пассивный транспорт ионов, что в конечном итоге сбрасывает мембранный потенциал (1238). Ингибитор Na^+,K^+-АТФазы уабаин снижает активность палитоксина (1239), но не влиял на действие CpTx 1. Следовательно, Na^+,K^+-АТФаза, по-видимому, не служит основной мишенью CpTx 1. Подводя итог, мы исключили ряд мембранных транспортных систем как возможную мишень токсина в нервно-мышечных препаратах лягушки.

Значительный объем данных указывает на то, что сам липидный бислой цитоплазматической мембраны является основной мишенью CpTx 1. (а) Мембранное окружение индуцирует структурные изменения полипептида, по данным спектроскопии КД (таблица 67), что указывает на связывание токсина с мембраной. (б) CpTx 1 дестабилизирует искусственные мембраны, а наблюдаемые дефекты (многочисленные временные колебания тока переменной амплитуды) характерны для мембрано-активных пептидов (1240). (в) Токсин-индуцированная деполяризация не зависит от ряда мембранных транспортных систем и мало чувствительна к ионному составу внеклеточной среды (см. выше). (г) Увеличение концентрации двухвалентных катионов (3,6 мМ Ca^{2+} или 5 мМ Co^{2+}) ингибирует эффекты CpTx 1; аналогичный антагонизм отмечен в случае цитолитических пептидов, эти катионы конкурируют с мембрано-активными пептидами за связывание с фосфатными группами липидов (270). (д) Токсин проявляет цитолитическую активность, характерную для многих мембрано-активных пептидов. Эта активность была визуализирована непосредственно с помощью КЛСМ. PI и 5(6)-карбоксифлуоресцеин в ионизированной форме не способны проникать через неповрежденную плазматическую мембрану (1241); следовательно, их появление в клет-

ке указывает на формирование дефектов в мембранах. Использование двух красителей с зарядами противоположного знака свидетельствует о низкой селективности дефектов мембраны, вызванных CpTx 1.

Таким образом, липидный бислой представляет собой наиболее вероятную мишень CpTx 1. Большинство наблюдаемых эффектов могут быть связаны с цитолитической активностью токсина. Однако на данном этапе нельзя полностью исключать существование специфического рецептора (акцептора) CpTx 1. Более того, некоторые данные могут свидетельствовать в пользу такого сценария. К примеру, низкое значение $ЛД_{50}$, определенное для CpTx 1, типично для специфических нейротоксинов, тогда как цитолитические мембраноактивные пептиды обычно характеризуются на 1–2 порядка более высокими летальными дозами. Кроме того, наблюдается некоторое расхождение между концентрациями токсина, активными *ex vivo* на нервно-мышечных препаратах и *in vitro* на искусственных мембранах.

3.12.5.6. Эволюция CpTx

Мы проанализировали скорость эволюции генных фрагментов, кодирующих разные сегменты предшественников CpTx. Z-тест селекции выполнили по методу Нэя-Годжобори для каждой группы (CpTx 1–3) и между группами. В каждой группе токсинов фрагменты генов, кодирующие сигнальные пептиды и пропоследовательности, идентичны или отличаются только одной заменой. Фрагменты генов зрелых цепей более вариабельны, однако гипотеза о движущем отборе зрелых токсинов не проходит тест отношения правдоподобия. Отрицательный отбор действует на все сегменты предшественников CpTx, что подтверждается методом максимального правдоподобия. Таким образом, в отличие от многих других известных генов токсинов, положительный отбор и высокая скорость эволюции не характерны для CpTx.

В отличие от CIT (см. «Модульное строение цитоинсектотоксинов»), у CpTx в линкере между двумя доменами мы не обнаружили мутантного PQM. Однако последовательности, непосредственно предшествующие второму домену (^{61}PKPV^{64} у CpTx 1; рисунок 124), при сдвиге рамки в кодирующей последовательности ДНК превращаются в типичный PQM (AETR у CpTx 1 при сдвиге рамки −1). Поэтому мы предполагаем, что в случае CIT и CpTx различные мутации, а именно: замены или делеции / вставки — обеспечили слияние двух зрелых цепей двойных предшественников в единый модульный токсин с двумя доменами.

Наиболее очевидным возможным сценарием возникновения двудоменного токсина выступает дупликация предкового гена, кодирующего однодоменный токсин. В случае CpTx такой сценарий маловероятен, потому что их N-концевые и C-концевые домены демонстрируют лишь умеренное сходство (≈15–25% идентичных а.о.). Альтернативной гипотезой слу-

жит слияние двух генов однодоменных токсинов. Оказалось, что в библиотеке кДНК ядовитых желез *Ch. punctorium* имеются последовательности, кодирующие однодоменные токсины, похожие на модули CpTx. Однако они довольно сильно отличаются от CpTx (<25% идентичности), поэтому современные однодоменные токсины *Ch. punctorium* вряд ли являются предками CpTx.

Интересно, что мы наблюдаем гораздо большее сходство доменов CpTx с токсинами LSTX, кодируемыми кДНК из ядовитых желез паука *L. singoriensis* (1230). Например, ≈40% идентичных а.о. обнаружено между N- и C-концевыми доменами CpTx 2 и LSTXC1 и LSTXA1, соответственно. В то же время препропоследовательность pCpTx 2a на ≈30% идентична предшественнику LSTXC1 и только на ≈20% сходна с LSTXA1. Таким образом, можно предположить, что в геноме *Ch. punctorium* произошла миграция последовательности, кодирующей зрелый пептид гомолога LSTXA1, в ген гомолога LSTXC1, что привело к появлению химерных CpTx-подобных токсинов. Выше мы также отмечали сходство CpTx 1 с токсинами CSTX (244). Интересно, что C-концевой домен CpTx 1 более похож на ингибитор Ca^{2+} каналов CSTX-1, тогда как N-концевая часть демонстрирует большее сходство с энхансером CSTX-13. Таким образом, CpTx могут представлять собой самоусиливающиеся структуры с синергией действия их модулей. Если эта гипотеза подтвердится, CpTx можно будет считать результатом слияния генов, кодирующих функционально связанные продукты, а это частое событие в эволюции многоклеточных (1242). Отметим также, что у токсина DkTx из *C. schmidti* (подробно обсуждался в Обзоре литературы, раздел «Токсины с двумя ICK-доменами») (594) сходство модулей значительно выше (≈50%), и в этом случае именно дупликация предкового гена представляется возможным сценарием.

Отсутствие интронов в генах *cptx* ставит под сомнение сценарий их возникновения в результате перетасовки интронов. Более вероятным представляется возможность процесса, аналогичного описанному у млекопитающих, в частности у человека, слиянию генов, опосредованному транскрипцией. В результате него возникают химерные транскрипты, а если затем следует ретропозиция, это может привести к активному слитному гену (1243). Другая возможность — неаллельная гомологичная рекомбинация во время мейоза из-за неправильного позиционирования гомологичных хромосом; этот механизм рассматривается как основной авторами недавней работы, посвященной эволюции гомологов двудоменного токсина Hi1a (тоже обсуждался в Обзоре литературы) (1214).

Результаты исследований модульных токсинов *Ch. punctorium* опубликованы (661, 1244).

3.12.6. Разнообразие двудоменных токсинов паукообразных

Выше в Обзоре литературы (раздел «Двудоменные токсины из яда паукообразных»; таблица 20) мы уже касались данного вопроса. Здесь же стоит отметить, что мы не только впервые описали двудоменные токсины пауков (CIT), но также нашли примеры всех возможных комбинаций дисульфид-богатого (ICK) и линейного (АМП) доменов: АМП-АМП (CIT), АМП-ICK (спайдерины, OtTx), ICK-АМП (латартоксины, LtTx; PT2) и ICK-ICK (CpTx). Мы исследовали пространственную структуру токсинов типа АМП-ICK (OtTx 1a) и ICK-АМП (PT2). Мы обнаружили, что яд пауков может содержать двудоменные токсины в качестве основного компонента (*L. tarabaevi* и *Ch. punctorium*).

Возникновение модульных токсинов в эволюции совпадает с общим вектором «от простого к сложному». Мы пока не наблюдаем в составе яда паукообразных токсинов с тремя или более доменами, однако полагаем, что такие структуры будут обнаружены. В этой связи следует оговориться однако, что DkTx и CpTx, отнесенные нами в группу ICK-ICK, существенно различаются: если у DkTx (75 а.о.) типичные ICK-модули K1 и K2 содержат ≈30–35 а.о. и разделены коротким линкером (рисунок 27) (594), то модули CpTx значительно больше (у CpTx 1, например, при общей длине 134 а.о. модули содержат ≈65 а.о.; рисунок 124) и при этом сами могут быть представлены формулой ICK-АМП, т.е. несут протяженные линейные С-концевые участки, напоминающие АМП. Таким образом, CpTx, вообще говоря, можно отнести к токсинам с четырьмя модулями по формуле ICK-АМП-ICK-АМП.

Принцип модульности присущ не только пептидным токсинам паукообразных. Ацилполиамины тоже построены из модулей: остатков (амино)кислот и диаминных звеньев; при этом показано альтернативное включение модулей в структуру этих токсинов (см. Обзор литературы, раздел «Ацилполиамины»; рисунок 2). Латротоксины тоже состоят из модулей: N-концевых доменов уникальной структуры и различного числа анкириновых повторов (см. Обзор литературы, раздел «Латротоксины»; рисунок 32).

Представляется очевидным, что причина закрепления модульных токсинов в эволюции состоит в их уникальной функции, которая не может быть реализована отдельными доменами ("in *trans*") и возникает как раз в результате ковалентной сшивки доменов ("in *cis*"). Однако в настоящее время убедительные свидетельства в пользу наличия такой функции имеются для CIT (высокая инсектицидная активность; см. «Модульное строение цитоинсектотоксинов», таблицу 57), DkTx (необратимая активация TRPV1, см. Обзор литературы) (594) и Hi1a (длительная стабилизация закрытого состояния ASIC 1a, см. там же) (604), для других двудоменных токсинов ее можно лишь предполагать. При этом, по-видимому, в большинстве случаев модульность предоставляет токсинам возможность образования более

стабильного комплекса с мишенью — за счет увеличения авидности (для дисульфид-богатых модулей) или в результате заякоривания в мембране (для АМП-модулей).

Другое важное наблюдение касательно эволюции модульных токсинов — сходство их структуры с двойными или сложными предшественниками однодоменных токсинов (подробно обсуждалось для CIT, OtTx, CpTx). Обнаружение в последовательности модульных токсинов или их кДНК мутированных версий мотива процессинга PQM, с нашей точки зрения, убедительно свидетельствует в пользу родства. При этом мы полагаем, что не во всех случаях модульные токсины происходят от двойных предшественников; более того, нам представляется возможным и обратный сценарий.

В заключение хотелось бы вновь подчеркнуть широкое разнообразие и распространение двудоменных токсинов, составляющих важную часть структурного и функционального многообразия природных токсинов. По-видимому, дальнейшие исследования в данной области будут направлены не только на прояснение интригующих моментов, перечисленных выше, но также на использование подсказанного природой дизайна для создания искусственных лигандов ионных каналов и нейрорецепторов модульного строения; подобные попытки уже предпринимаются (604, 1245).

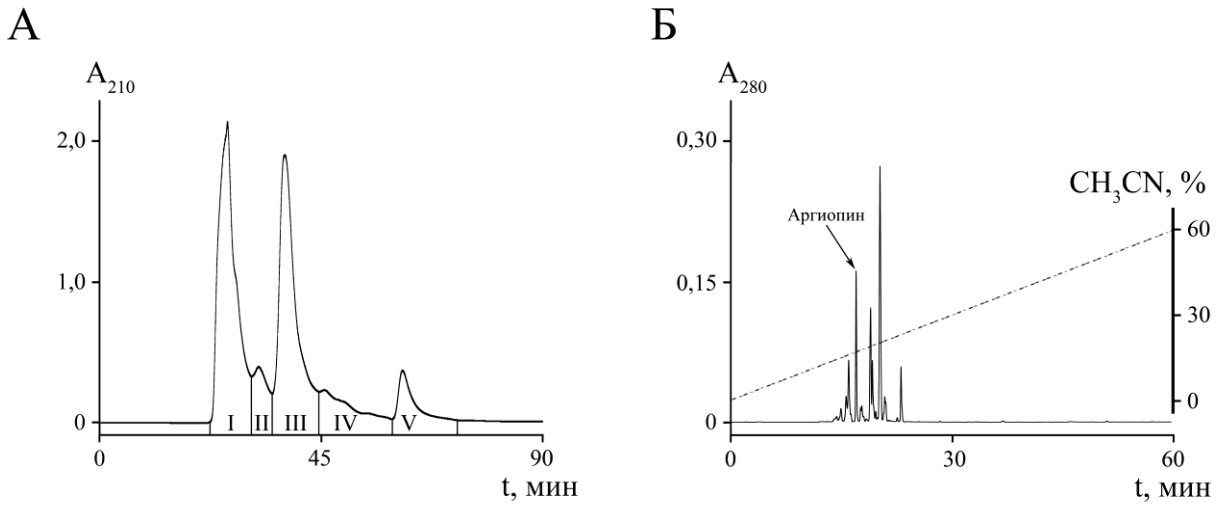
3.13. Ацилполиамины — инструменты изучения глутаматных рецепторов

Рассмотрение разнообразия токсинов паукообразных мы начинали с низкомолекулярных компонентов, наиболее важными из которых выступают ацилполиамины (см. соответствующий раздел Обзора литературы). Эти соединения, открытые Е.В. Гришиным (208, 212, 219), блокируют пору Ca^{2+}-проницаемых GluR с высокими селективностью и сродством (216, 217). Они послужили прообразом искусственных блокаторов GluR, таких как NASPM и IEM-1460 (рисунок 2), которые используются теперь повсеместно.

Несмотря на большой массив информации, касающейся механизма действия ацилполиаминов, детали лиганд-рецепторного взаимодействия оставались неясными, в частности, не был в точности картирован сайт связывания блокаторов в поре. В сотрудничестве с лабораторией А.И. Соболевского мы предприняли попытку прояснения этого вопроса. В результате мы изучили структуру комплексов GluR с аргиопином, NASPM и IEM-1460 с помощью крио-ЭМ.

Для этого мы использовали аргиопин, очищенный из яда *A. lobata* (NCBI/UniProt taxon identifier: 332533; семейство Araneidae). И если в классических работах для получения фракции ацилполиаминов Е.В. Гришин использовал осаждение этанолом и ионообменную хроматографию (208, 212), то мы применили гель-фильтрацию (рисунок 126А). Отметим, что полученный профиль разделения фракции III с помощью ОФ-ВЭЖХ (рисунок 126Б) очень напоминает опубликованный в 1988 г. (212). Субфракцию, содержащую аргиопин, определили с помощью МС высокого разрешения; чистота выделенного соединения составила >98% по данным аналитической ВЭЖХ.

Рисунок 126. Разделение яда *A. lobata*. (А) Эксклюзионная хроматография цельного яда на колонке TSK 2000SW (7,5×600 мм). Фракции обозначены римскими цифрами. (Б) ОФ-ВЭЖХ фракции III из (А) на колонке Luna C_{18} (4,6×250 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Отмечена субфракция, содержащая аргиопин.



3.13.1. Структура комплексов GluR с поровыми блокаторами

Для структурных работ использовали конструкцию GluA2Q-STZ, в которой субъединица GluA2 с остатком глутамина в Q/R-сайте (характерна для Ca^{2+}-проницаемых AMPA-рецепторов) слита в единую цепь с трансмембранным регуляторным белком AMPA-рецепторов (TARP-γ2 или старгазин, STZ), который положительно модулирует их активацию. Этот слитный белок имитирует нативные комплексы AMPA-рецепторов (1246).

3.13.1.1. Активность блокаторов на GluA2Q-STZ

Активность блокаторов на слитных GluA2Q-STZ в сравнении с индивидуальными GluA2Q проверяли электрофизиологически с помощью пэтч-клампа. Рецепторы активировали агонистом глутаматом в присутствии положительного аллостерического регулятора циклотиазида для предотвращения десенситизации. Построили кривые «доза–ответ» и определили значения IC_{50}, которые не сильно различались между GluA2Q и GluA2Q-STZ (таблица 68).

Таблица 68. Активность поровых блокаторов на GluR.

Блокатор	GluA2Q		GluA2Q-STZ	
	IC_{50}	*h*	IC_{50}	*h*
Аргиопин	19,0 ± 3,5 нМ	1,06 ± 0,09 (n = 7)	11,5 ± 2,1 нМ	0,75 ± 0,06 (n = 7)
NASPM	80,0 ± 1,9 нМ	0,83 ± 0,13 (n = 8)	170 ± 16 нМ	0,84 ± 0,03 (n = 6)
IEM-1460	1,15 ± 0,05 мкМ	0,89 ± 0,02 (n = 6)	3,54 ± 0,46 мкМ	1,06 ± 0,08 (n = 5)

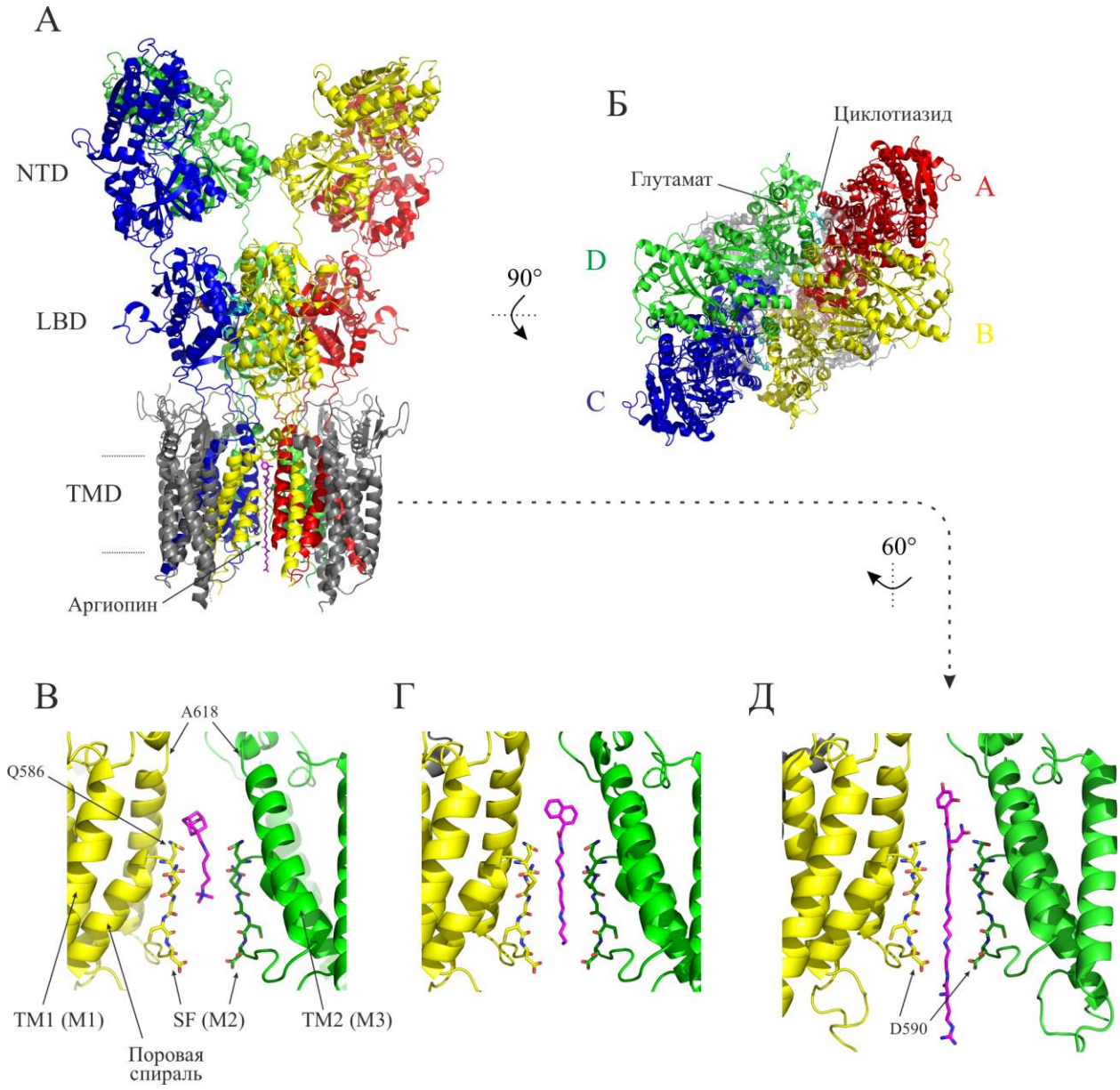
Данные получены при потенциале удерживания −60 мВ.

3.13.1.2. Общая структура комплексов

Структуру комплексов с GluA2Q-STZ определили в активированном и заблокированном состоянии, для чего образцы готовили в присутствии глутамата, циклотиазида и блокатора. Получены структуры: GluA2Q-STZ с аргиопином (PDB ID: 6O9G; разрешение 4,8 Å), NASPM (6DM1; 4,2 Å) и IEM-1460 (6DM0; 4,4 Å), а также апо-формы рецептора (без блокатора; 6DLZ; 3,9 Å). Общая топология полученных структур с блокаторами аналогична активированному состоянию комплекса GluA2Q-STZ (рисунок 127А, Б). Рецептор состоит из четырех субъединиц (A–D), в составе которых выделяют три «этажа». Верхний этаж, наиболее удаленный от мембраны, сформирован N-концевыми доменами, необходимыми для сборки, сортинга и регуляции рецептора. Средний этаж представлен лиганд-связывающими доменами, которые содержат сайты связывания агониста глутамата, а также положительного аллостерического модулятора циклотиазида — на интерфейсе двух субъединиц (A/D и B/C). Интересно, что несмотря на то, что рецептор построен из одинаковых субъединиц, на верхнем и

среднем этажах нет симметрии четвертого порядка, но сохраняется симметрия второго порядка — упаковка «димера димеров», субъединицы симметричны попарно. Кроме того, наблюдается явление «обмена доменами» (domain swapping): если на верхнем этаже сближены субъединицы A с B и C с D, то на среднем A с D и B с C.

Рисунок 127. Комплексы поровых блокаторов с GluR. (А) Ленточная модель комплекса аргиопина с GluA2Q-STZ (см. пояснение в тексте; PDB ID: 6O9G). Примерное положение полярных головок липидов обозначено пунктирными отрезками слева. Мономеры окрашены разными цветами. Указано положение N-концевых (NTD), лиганд-связывающих (LBD) и трансмембранного доменов (TMD). Области STZ окрашены серым. Аргиопин выделен малиновым и показан в виде стержневой модели; четыре молекулы глутамата показаны оранжевым, циклотиазида — голубым. (Б) Вид «сверху», т.е. на плоскость мембраны со внеклеточной стороны. Обозначены мономеры A–D. (В–Д) Увеличенное изображение области связывания блокаторов: IEM-1460 (PDB ID: 6DM0; В), NASPM (6DM1; Г) и аргиопина (Д). Показаны только два мономера. А.о. области селективного фильтра (SF) показаны линиями. Блокаторы представлены малиновыми стержневыми моделями.



Нижний этаж — это единый полностью C_4-симметричный трансмембранный домен, который образует катион-селективный ионный канал. В тетрамере слитного белка GluA2Q-STZ четыре псевдосубъединицы STZ окружают центральный GluR. Трансмембранные части субъединиц GluR содержат три трансмембранные спирали (M1, M2 и M4), а также P-петлю (M2), которая формирует селективный фильтр. Ионный канал в структуре комплексов находится в активированном, проводящем состоянии, которое характеризуется изгибом спиралей M3 в субъединицах B и D в области A618 («шарнира» ворот). Ниже уровня A618 внутри поры GluR располагаются блокаторы (рисунок 127В–Д).

Верхняя часть поры GluR характеризуется электронейтральной поверхностью, которая простирается до дна центральной полости и выстлана боковыми цепями I610, I613, S614, T617 и A618. В отличие от нее, нижняя часть поры несет повышенный отрицательный заряд, что, вероятно, способствует ее катионной селективности. Эта область начинается у дна центральной полости, включает селективный фильтр, в значительной степени образованный атомами кислорода карбонильных групп основной цепи Q586 (Q/R-сайт), G588 и C589, и завершается D590, образующими вход в фильтр со стороны цитоплазмы.

3.13.1.3. Детали взаимодействия поровых блокаторов с GluR

При ближайшем рассмотрении видно, что объемные головки блокаторов лежат в центральной полости канала, тогда как полиаминный хвост внедряется в селективный фильтр. Активированный ионный канал позволяет блокаторам проникать в пору через открытые ворота, но не проходить сквозь нее: селективный фильтр слишком узок для массивных головок. Блокаторы ингибируют проводимость GluR, не вмешиваясь в работу воротного механизма, а выступая в качестве пробки, перекрывающей ионный канал.

Несмотря на важную роль объемных головок, главное различие между аргиопином, NASPM и IEM-1460 заключается в длине полиаминного хвоста и числе аминогрупп (см. формулы на рисунке 2). Это сказывается на глубине проникновения блокатора в селективный фильтр рецептора: если IEM-1460 едва дотягивается до его середины (рисунок 127В), то NASPM погружается практически на всю длину (рисунок 127Г), а аргиопин и вовсе пронизывает фильтр насквозь, и его концевой а.о. высовывается в цитоплазму (рисунок 127Д). Аминогруппы блокаторов, по-видимому, взаимодействуют с селективным фильтром сродни проходящим катионам. Образно говоря, полиамины — это цепочка катионов, нанизанных на нитку. Чем длинне хвост, тем больше катионов, взаимодействующих с селективным фильтром, и тем больше точек взаимодействия блокатора с GluR. В соответствии с этим, IEM-1460 демонстрирует самую низкую аффинность, поскольку имеет только две аминогруппы, закрепленные в поре. NASPM, обладающий промежуточной аффинностью, содержит три амино-

группы и амидную связь. У аргиопина, блокатора с высокой аффинностью, самый длинный хвост.

3.13.2. Получение светопереключаемых блокаторов GluR

Оптофармакология — быстро развивающаяся область (1247). Особый интерес представляют соединения-фотопереключатели, изменяющие конформацию при освещении и воздействующие на свои мишени только в темноте или при активации светом. Для разработки фотопереключаемых соединений используются разные структурные каркасы, такие как азобензол, диарилацетилен, спиропиран. Ионные каналы служат одной из главных мишеней для разработки фотопереключаемых лигандов. Поскольку глутамат выступает основным возбуждающим нейромедиатором в головном мозге, оптический контроль GluR имеет большое значение. Ранее был предложен ряд фотопереключателей для NMDA-рецепторов (1248-1250), а для AMPA-рецепторов разработаны фотопереключатели, нацеленные на сайт связывания лиганда (1251-1253) и поэтому неспособные различать Ca^{2+}-проницаемые и Ca^{2+}-непроницаемые изоформы. Изучив структуру комплекса аргиопина и других поровых блокаторов с GluR, мы решили создать на их основе фотопереключатель, селективно действующий на Ca^{2+}-проницаемые AMPA-рецепторы. Эти работы мы выполняли в сотрудничестве с лабораторией биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН.

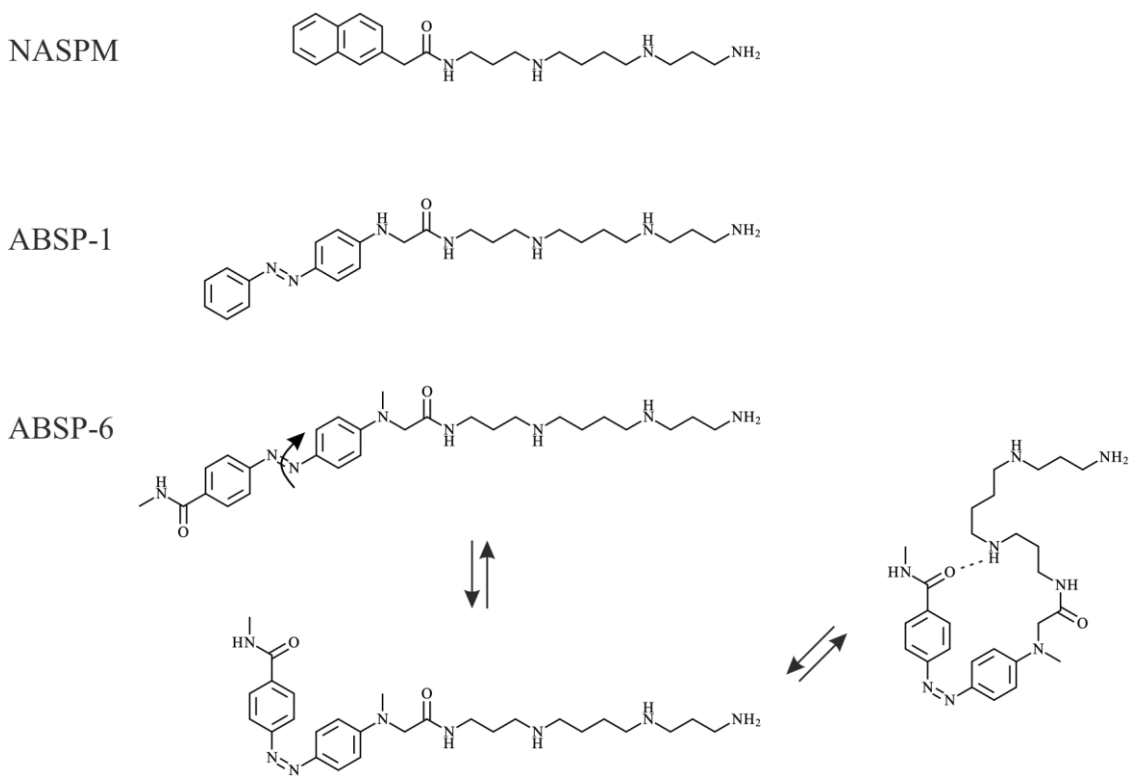
3.13.2.1. ABSP-1

Соединение ABSP-1 — простейший азобензольный аналог NASPM (вместо нафтилацетильной группы здесь глицилазобензол, а хвост так же представлен спермином; рисунок 128). Акроним ABSP мы выбрали как английское сокращение «азобензол-спермина».

Действие ABSP-1 в отношении нативных Ca^{2+}-непроницаемых AMPA-рецепторов и NMDA-рецепторов изучали на изолированных пирамидных нейронах гиппокампа, а по отношению к Ca^{2+}-проницаемым AMPA-рецепторам — на гигантских холинергических интернейронах полосатого тела. Сначала GluR активировали селективными агонистами (каинат или NMDA с глицином) для получения контрольного ответа, затем добавляли ABSP-1 в условиях дневного света. После установления блока включали и выключали монохроматический свет (410 нм) для регистрации фотоиндуцированных эффектов. Наиболее выраженным оказалось действие на Ca^{2+}-проницаемые AMPA-рецепторы: в концентрации 1 мкМ ABSP-1 вызывал сильное ингибирование (на 79 ± 7%, n = 5), тогда как для аналогичного эффекта на NMDA-рецепторах требовалась концентрация 10 мкМ (71 ± 8%, n = 7). В этой концентрации ABSP-1 проявлял значительно меньшую активность в отношении Ca^{2+}-непроницаемых AMPA-рецепторов (20 ± 7%, n = 5). Рекомбинантные Ca^{2+}-проницаемые AMPA-рецепторы

были наиболее чувствительны, сильное ингибирование наблюдалось при концентрации 50 нМ ABSP-1 (81 ± 3%, n = 6). Во всех случаях освещение при 410 нм значительно уменьшало уровень ингибирования.

Рисунок 128. Структурные формулы NASPM и ABSP. Двойная связь, по которой происходит фотозависимая *цис-транс* изомеризация у ABSP-6, указана изогнутой стрелкой. Внутримолекулярная водородная связь, которая может возникать в *цис*-форме, показана пунктиром. Ионизируемые группы представлены в незаряженном состоянии.



3.13.2.2. ABSP-6

Для повышения светочувствительности ABSP в структуру «головки» вносили различные модификации, всего получили 12 новых соединений (ABSP-2–13), синтез выполнен в лаборатории химии гетероциклических соединений ИБХ РАН. Все они продемонстрировали сдвиг спектра поглощения в красную сторону по сравнению с ABSP-1, поэтому для индукции *цис-транс*-изомеризации использовали свет с длиной волны 450 нм. Мы провели скрининг полученных соединений на GluR. Большинство вызывали >50% ингибирование NMDA-рецепторов в концентрации 10 мкМ.

Среди новых соединений оптимальные характеристики продемонстрировал ABSP-6 (см. структурную формулу на рисунке 128). Он сильно ингибировал нативные Ca^{2+}-проницаемые AMPA-рецепторы с выраженным эффектом фотопереключения и слабо влиял на Ca^{2+}-непроницаемые AMPA-рецепторы и NMDA-рецепторы (рисунок 129A, таблица 69).

При −70 мВ значения IC_{50} при дневном свете и действии монохроматора (450 нм) для нативных и рекомбинантных рецепторов различались примерно в 100 раз. При этом светочувствительность действия ABSP-6 может быть дополнительно увеличена за счет использования мощного освещения. Применение диодного лазера, который обеспечивает в 30 раз бóльшую интенсивность освещения по сравнению с монохроматором, увеличивало значение IC_{50} в отношении нативных рецепторов до 10 ± 2 мкМ. Таким образом, селективность и светочувствительность ABSP-6 позволяют использовать его в качестве специфического фотопереключаемого блокатора Ca^{2+}-проницаемых AMPA-рецепторов.

Рисунок 129. Действие ABSP-6 на GluR. (А) Зависимость действия ABSP-6 от мембранного потенциала (при концентрации 5 мкМ в случае нативных NMDA, 10 мкМ — Ca^{2+}-непроницаемых, 100 нМ — проницаемых, 1 нМ — рекомбинантных Ca^{2+}-проницаемых AMPA-рецепторов) и концентрации (при потенциале удерживания −70 мВ). Приведены средние значения ± SD (n = 5–8). (Б) Репрезентативная запись действия ABSP-6 на нативные Ca^{2+}-проницаемые AMPA-рецепторы, активируемые последовательными кратковременными аппликациями каината. (В) Воздействие ABSP-6 на эти же рецепторы в условиях длительного приложения агониста. Освещение при 450 нм отмечено голубыми полосами.

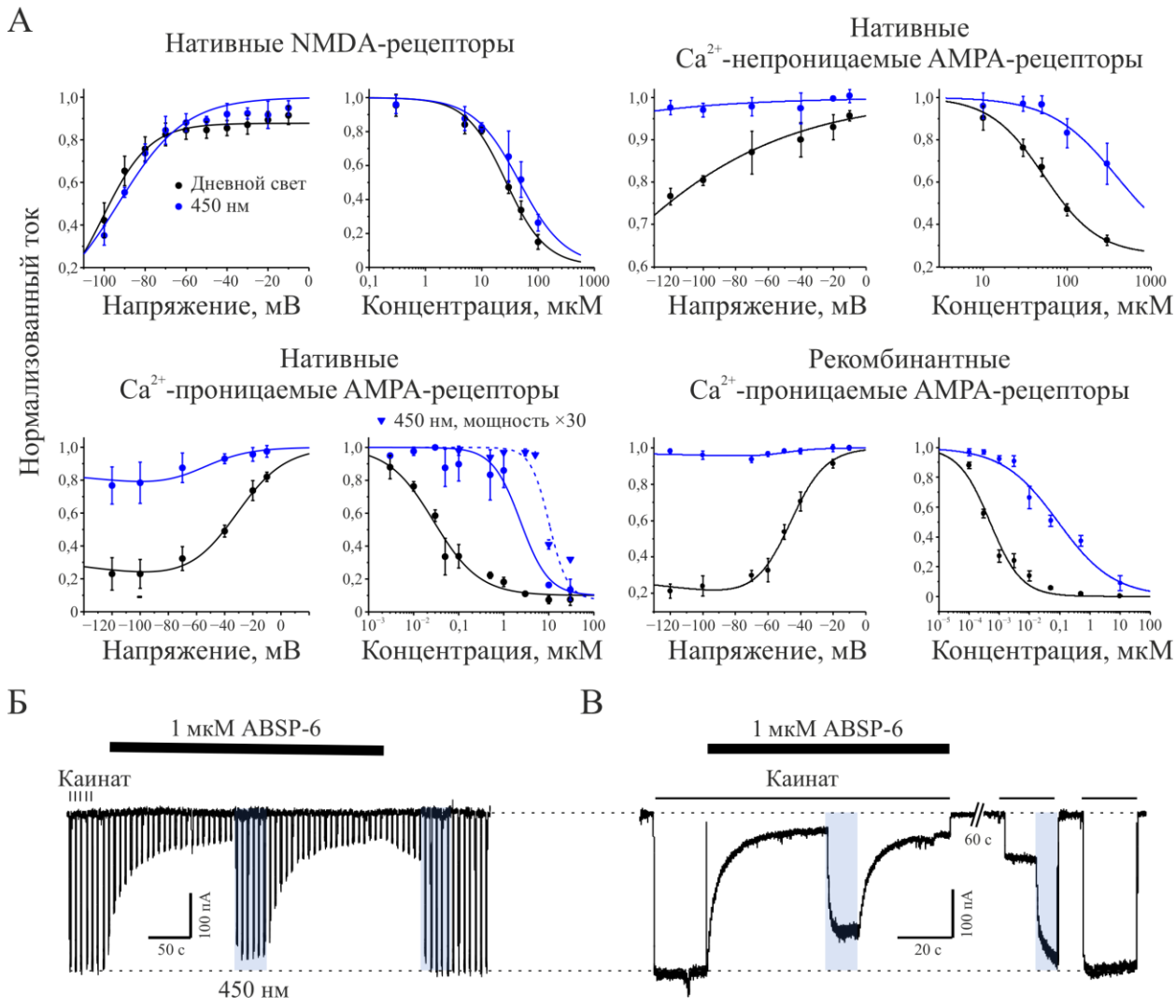


Таблица 69. Активность ABSP-6 на GluR.

GluR	*Транс*-форма		*Цис*-форма	
	IC_{50}	*h*	IC_{50}	*h*
NMDA-рецепторы (нативные)	27 ± 2 мкМ	1,20 ± 0,12	47 ± 5 мкМ	1,07 ± 0,13
Ca^{2+}-непроницаемые AMPA-рецепторы (нативные)	54 ± 6 мкМ	1,34 ± 0,19	390 ± 80 мкМ	1,10 ± 0,20
Ca^{2+}-проницаемые AMPA-рецепторы (нативные)	28 ± 5 нМ	0,85 ± 0,14	2,4 ± 0,7 мкМ	1,4 ± 0,3
Ca^{2+}-проницаемые AMPA-рецепторы (рекомбинантные)	0,48 ± 0,09 нМ	0,83 ± 0,13	80 ± 30 нМ	0,48 ± 0,06

Данные получены при потенциале удерживания −70 мВ.

Ингибирование Ca^{2+}-непроницаемых AMPA-рецепторов посредством ABSP-6 слабо зависело от мембранного потенциала (рисунок 129А). А вот его действие на нативные NMDA и нативные и рекомбинантные Ca^{2+}-проницаемые AMPA-рецепторы имело выраженную зависимость от напряжения. Эта зависимость была монотонной для NMDA-рецепторов и немонотонной для Ca^{2+}-проницаемых AMPA-рецепторов. В последнем случае зависимость от мембранного потенциала соответствовала модели с возможностью проникновения блокатора в цитоплазму через пору при больших потенциалах (1254, 1255).

Различие в чувствительности нативных и рекомбинантных Ca^{2+}-проницаемых AMPA-рецепторов требует пояснения. «Нативными» мы обозначили GluR в гигантских интернейронах из срезов мозга крысы. Не гарантируется, что форма субъединицы GluA2, содержащая остаток аргинина в Q/R-сайте, полностью отсутствует в этих нейронах. Приложение селективного порового блокатора IEM-1925 в концентрации 50 мкМ вызывало неполное (≈82%) ингибирование, что указывает на наличие некоторой доли нечувствительных, то есть Ca^{2+}-непроницаемых, рецепторов.

Описанные выше эксперименты мы проводили в условиях непрерывного присутствия агониста. Для тестирования ABSP-6 в более физиологически значимых условиях мы использовали импульсный протокол, в котором 100 мкМ каината прикладывали импульсами длительностью 2 с, интервал между импульсами 4 с (рисунок 129Б). ABSP-6 в концентрации 1 мкМ вызывал глубокое ингибирование (84 ± 3%, n = 5), которое практически полностью устранялось при освещении на длине волны 450 нм (6 ± 3%, n = 5). Таким образом, эффекты ABSP-6 на нативные AMPA-рецепторы схожи в обоих протоколах. Более того, кинетика наступления блока также была схожей в протоколах непрерывной и импульсной активации. Для развития блокирующего эффекта потребовалось 21–24 коротких аппликации каината, что соответствует 42–48 с общего времени присутствия агониста. При непрерывном присутствии каината блок развивался в течение того же времени. Таким образом, развитие блока

зависит от общего времени приложения каината, но не от общего времени присутствия ABSP-6 в растворе, которое в шесть раз больше в случае импульсного протокола.

Для изучения механизма блока, обеспечивающего такую кинетику, вслед за регистрацией контрольного ответа и светочувствительного блокирования каинат и ABSP-6 удаляли из раствора, а после перерыва длительностью 60 с снова добавляли каинат (рисунок 129В). Мы обнаружили лишь незначительное восстановление ответа, что убедительно свидетельствует о том, что ABSP-6 задерживается в закрытом канале AMPA-рецепторов. Таким образом, ABSP-6 может проникать в пору и блокировать ее только тогда, когда канал открыт в присутствии агониста, и остается «пойманным» в закрытых каналах между приложениями агониста. Этот механизм совпадает с описанным выше для аргиопина и объясняет эффекты ABSP-6 в протоколе импульсной активации.

Наконец, мы осуществили длительную запись продолжительностью 16 мин на рекомбинантных Ca^{2+}-проницаемых AMPA-рецепторах с использованием протокола импульсной активации. Приложение 10 нМ ABSP-6 в течение 6 мин в условиях освещения при 450 нм не влияло на параметры записи. Только после выключения света ABSP-6 вызывал глубокое ингибирование ответа. Включение света приводило к быстрому и полному восстановлению ответа. Этот эксперимент показывает отсутствие значимой фототоксичности и побочных эффектов ABSP-6. Кроме того, *цис*-конфигурация оставалась стабильной по меньшей мере в течение 6 мин, а фотоизомеризация была практически полной, о чем свидетельствует переход от нулевого ингибирования при освещении на длине волны 450 нм к почти полному блоку при дневном свете.

Данные молекулярного моделирования указывают на то, что в *транс*-конфигурации ABSP-6 связывается в поре GluR аналогично NASPM (см. рисунок 127Г). При переходе в *цис*-конфигурацию существенно изменяется структура ABSP-6 (рисунок 128): (а) головка «складывается», (б) появляется возможность образования внутримолекулярной водородной связи между головкой и хвостом. По всей видимости, эти изменения сказываются на связывании ABSP-6 в поре GluR. По сути, в *цис*-конфигурации эффективная длина полиаминного хвоста уменьшается, и происходит его «вытягивание» из селективного фильтра рецептора. В результате, как пояснялось выше в разделе «Детали взаимодействия поровых блокаторов с GluR», аффинность блокатора к GluR существенно падает.

3.13.3. Значение исследований блокаторов GluR

Определение структуры комплексов GluR с поровыми блокаторами вместе со структурами GluR в различных состояниях (1256) позволило обосновать механизм действия ацилполиаминов и их производных. В неактивированном состоянии ионный канал GluR закрыт;

он открывается после приложения глутамата за счет изгиба спиралей M3; открытие ворот позволяет Ca^{2+} и другим катионам проникать в канал. Блокаторы могут диффундировать в открытый канал и связываться таким образом, что их гидрофобная головка располагается в центральной полости, а полиаминный хвост застревает в селективном фильтре. Поскольку блокатор не мешает работе ворот, ионный канал может закрыться, и блокатор окажется захваченным внутри рецептора. Для того чтобы блокатор вышел из канала и освободился из ловушки, ионный канал должен вновь открыться. Кроме того, структуры с различными блокаторами поясняют их различающуюся аффинность, возрастающую с удлинением хвоста.

На основании полученных структурных данных о механизме действия поровых блокаторов GluR мы впервые создали селективный высокоаффинный светоуправляемый блокатор Ca^{2+}-проницаемых AMPA-рецепторов — ABSP-6. Это соединение продемонстрировало превосходные характеристики. Разница в значениях IC_{50} на два порядка в условиях дневного света и освещения монохроматором при 450 нм (таблица 69) обеспечивает полное фотопереключение. При этом значения IC_{50} для Ca^{2+}-непроницаемых AMPA-рецепторов и NMDA-рецепторов на три порядка выше по сравнению с Ca^{2+}-проницаемыми AMPA-рецепторами, то есть ABSP-6 показывает очень высокую селективность. Дополнительные эксперименты показали, что ABSP-6 не вызывает значительных неспецифических эффектов при длительном приложении. Недостатком высокоаффинных блокаторов служит медленная кинетика их действия. Кроме того, их эффект мало обратим, так как прочный комплекс очень медленно диссоциирует даже после удаления блокатора из раствора. Хотя развитие блока под действием ABSP-6 происходит медленно, фотопереключение приводит к быстрому восстановлению ответа даже без отмывки (рисунок 129Б, В). Такая способность особенно важна для экспериментов на срезах мозга.

Мы надеемся, что наши результаты помогут в разработке блокаторов, нацеленных на Ca^{2+}-проницаемые GluR, для лечения неврологических расстройств, а разработанный нами ABSP-6 будет использоваться в качестве молекулярного исследовательского инструмента. Результаты, представленные здесь, опубликованы (944, 1257).

Заключение

Диссертант писал текст этой работы около 10 лет, допустив непозволительную в наши дни роскошь. За время выполнения и оформления диссертации область изучения токсинов паукообразных разрослась настолько, что если 2000-е гг. можно было составить более-менее исчерпывающий обзор научных статей, относящихся к теме [наша попытка 2008 г. в «Успехах биологической химии» (793) на это вполне успешно претендовала], то 2020-е гг. это представляется решительно невозможным. Соискатель постарался «объять необъятное», что выразилось в Обзоре литературы, содержащем ссылки на свыше 900 источников из порядка 10 000, находимых по ключевым словам в PubMed. Представляется поэтому, что основные направления развития области раскрыты достаточно подробно, что, с одной стороны, делает этот труд уникальным по масштабам, с другой, позволяет с высокой долей объективности сравнить результаты диссертации с мировым уровнем, а с третьей, подсказывает направления исследований в будущем.

Разделы диссертации — как Обзора литературы, так и Результатов — диссертант решил выделить по молекулярной мишени, источнику и структурным особенностям изученных токсинов, что кажется вполне естественным и служит распространенным подходом. Последовательность и компановка разделов в Обзоре литературы и Результатах при этом различаются, что отражает специфику наших интересов по сравнению с мировой практикой. По количеству публикаций и объему накопленных знаний стоит выделить следующие основные группы токсинов паукообразных: ацилполиамины из кругопрядов, линейные цитолитические пептиды, поровые блокаторы K^+ каналов (KTx), два вида модуляторов Na^+ каналов (α-NaTx и β-NaTx) и короткие инсектотоксины из яда скорпионов, ингибиторы активации потенциалчувствительных каналов из яда пауков, ингибиторы инактивации Na_v из яда австралийских и бразильских пауков, ингибиторы Ca_v из *A. aperta* (ω-агатоксины), латротоксины, PLD из пауков-отшельников; этим группам посвящены специальные разделы Обзора литературы. Из перечисления хорошо видно, что в некоторых случаях речь идет о крупных группах токсинов, характерных для многих видов паукообразных, а в других — об очень малочисленных группах, изученных у только нескольких или даже просто одного вида.

В нашей работе мы практически не занимались низкомолекулярными или белковыми компонентами яда, сосредоточившись на пептидах. С точки зрения молекулярной мишени наши изыскания были главным образом посвящены K_v и Na_v, а также P2X рецепторам. K^+ и Na^+ каналы — наиболее «популярные» мишени токсинов из яда пауков и скорпионов, им посвящено огромное число публикаций. Напротив, только нам удалось обнаружить и изучить компоненты природных ядов, воздействующие на P2X рецепторы.

Создание и развитие нами базы данных Kalium упорядочило сведения о лигандах K^+ каналов, эта база служит признанным важнейшим источником информации для исследователей. Аналогичную работу мы провели и в отношении лигандов Na^+ каналов, но создание похожей общедоступной базы данных — дело будущего. Идеальным вектором развития нам видится создание всеобщей базы данных токсинов наподобие упомянутой Guide to PHARMACOLOGY.

Пептидомный анализ яда, даже похожий на наш, сопряженный с анализом транскриптома высокого качества, не уникальное мероприятие; первопроходцем в области была лаборатория Е.В. Гришина в 2005 г. (124), и с тех пор похожих работ разного уровня опубликовано много. При этом наши результаты существенно пополнили разнообразие известных токсинов (224 записи в UniProt), а поскольку область в настоящее время всё еще находится на стадии «географических открытий», такой «экстенсивный» вклад важен.

Как видно из Обзора литературы и в результате анализа базы данных Kalium, селективных и высокоаффинных лигандов Shaker-подобных K^+ каналов (K_v1) известно много. При этом только нам удалось получить такие соединения для всех четырех «стандартных» объектов ($K_v1.1$, 1.2, 1.3 и 1.6). В результате в наших руках оказался уникальный набор исследовательских инструментов, и в настоящее время мы переходим к следующему этапу — использованию этого инструментария для изучения структуры и функции K^+ каналов. В частности, мы планируем изучить субъединичный состав каналов в различных нейронах животных и человека. Отметим здесь же, что развитие области неминуемо связано с исследованием гетеромерных K^+ каналов (1258), которые, по всей видимости, наиболее распространены, однако в силу технических ограничений плохо изучены.

Что касается лигандов Na^+ каналов из яда скорпионов, мы сосредоточились на группе α-NaTx, характерной для видов Старого Света. Выдвинутая нами в 2013 г. концепция модульного строения α-NaTx подтвердилась спустя несколько лет, когда с помощью крио-ЭМ была изучена структура комплексов этих токсинов с Na_v (418, 451). Детальное изучение структурных особенностей α-NaTx позволило нам показать, что важную роль в их селективности играет сочетание особых белковых мотивов, таких как «гнездо» и «ниша» (предложенный нами ее особый случай «аргининовой руки») в т.н. «модуле специфичности». По сути, наши работы определили современные представления о структурно-функциональных отношениях в этой группе токсинов. Уровень техники в данном случае находится «на переломе», и мы ожидаем, что на основе α-NaTx будут получены не просто млеко- или инсектотоксины, а селективные лиганды отдельных изоформ Na_v.

Совершенно неожиданной оказалась активность α-NaTx в отношении внутриклеточных сигнальных каскадов. Дело в том, что Na_v представляются одними из самых узкоспе-

циализированных белков, необходимых почти исключительно для первоначальной деполяризации электровозбудимых клеток при генерации ими спайков. Мы же зарегистрировали влияние лигандов этих каналов на внутриклеточный сигналинг. В данном случае мы, по-видимому, имеем дело с общим механизмом, присущим нейронам, который позволяет им отслеживать свою электрическую активность, «переводя» ее на «язык» вторичных мессенджеров, «понятный» клеточной биологии в широком смысле. Наличие некого метаботропного компонента у ионотропных рецепторов и ионных каналов — зарождающаяся область, значение которой пока сложно оценить. Так или иначе, мы впервые показали, что токсины паукообразных, нацеленные на электрические свойства нейронов, могут служить инструментами манипуляции их внутриклеточными сигнальными системами.

Наши исследования ингибиторов активации Na_v, на первый взгляд, носят частный характер в длинном ряду публикаций, посвященных таким соединениям, и отличаются только тем, что охарактеризованный подробно токсин Hm-3 выделен из аранеоморфного, а не мигаломорфного паука. Однако в данном случае нам удалось получить два уникальных результата. Во-первых, мы впервые охарактеризовали лиганд Na_v, воздействующий на ПЧД-I. Наша работа по определению сайта связывания Hm-3, включавшая изучение активности токсина на гибридных каналах и ЯМР-спектроскопию, предоставила модель комплекса, превосходившую по детализации все предыдущие (1072), и опередила исследования с использованием крио-ЭМ (516, 518). Во-вторых, мы впервые продемонстрировали, как можно ингибировать т.н. «ω-токи» в мутантных Na_v, обнаруженных у пациентов с гипоПП. Фактически, наша работа с токсином паука позволила перевести заболевание человека из группы "undruggable" в "druggable". В дальнейшем было бы интересно проверить, насколько широко способность ингибировать ω-токи распространена среди токсинов, получить соединения, активные в отношении различных мутантных каналов, и изучить их действие на трансгенных мышах, моделирующих заболевания человека.

Наконец, мы также имели дело с токсинами пауков, потенцирующими Na_v. В данном случае наши исследования отличает то, что они впервые показали одновременное наличие у токсинов двух, как считалось ранее, строго раздельно проявляющихся эффекта — в отношении активации и инактивации каналов. Предложенный нами способ обозначения такой ситуации с двумя эффектами в названии β/δ-агатоксинов — двумя греческими буквами через дробь — стал с тех пор общепринятым.

Открытие полипептидов из яда пауков, селективно воздействующих на P2X рецепторы, претендует на важнейший результат всей диссертации. В данном случае наши исследования не просто уникальны, но определяют развитие всего направления, поскольку других примеров подобных работ не известно, несмотря на многочисленные попытки ведущих ла-

бораторий мира получить токсины, нацеленные на P2X рецепторы. Вдобавок к замечательным фармакологическим свойствам, описанным в соответствующем разделе, пуротоксины демонстрируют ряд других, включая низкую токсичность, высокую стабильность, долгое время жизни при введении в организм и низкие эффективные дозы в животных моделях заболеваний, для которых P2X3 рецепторы показаны как мишень. Всё это обусловило наш интерес к фармацевтической разработке, которая в настоящее время продолжается. Недавний успех низкомолекулярных ингибиторов P2X3 рецепторов (1142, 1144), одобренных к применению в качестве противокашлевых средств в Европе и Японии, подчеркивает перспективность наших результатов.

Кандидатская диссертация автора была посвящена цитолитическим токсинам, и эта работа получила продолжение в исследованиях в рамках докторской. Мы охарактеризовали наибольшее число известных в настоящее время цитолитических и антимикробных токсинов паукообразных. Более того, современные представления о структурном разнообразии этих полипептидов основаны главным образом на наших работах. Бытовавшее в 1990-х и 2000-х гг. мнение, что АМП станут новыми антибиотиками, по большому счету не подтвердилось ввиду двух главных причин: их низкой селективности и высокой стоимости в сравнении с низкомолекулярными соединениями. Оригинальный способ использования цитолитических пептидов — для борьбы с внутриклеточными паразитами — представляется нам интересным, но пока что практического развития он не получил.

Большая часть диссертации посвящена т.н. «модульным», или двудоменным, токсинам. Отметим, что, к немалому нашему удивлению, эти работы проводились в режиме острой конкуренции (594) с рядом ведущих лабораторий мира, в том числе будущего Нобелевского лауреата. Нам не только принадлежит приоритет в области, поскольку мы первыми охарактеризовали цитоинсектотоксины из яда пауков (281), но и первенство в смысле описания природного разнообразия, потому что именно мы обнаружили токсины со всеми возможными вариантами комбинации линейных и дисульфид-богатых модулей. Поскольку модульность придает токсинам свойство авидности, дальнейшие исследования могут быть направлены на получение искусственных модульных конструктов на основе известных селективных лигандов важных мишеней с целью улучшения их свойств с точки зрения практического использования. Другая возможность состоит в создании поливалентных конструкций, когда один полипептид может выполнять сразу две нужные функции.

Важная отличительная особенность диссертационной работы заключается в том, что мы не только разыскивали селективные и высокоаффинные лиганды выбранных мишеней в составе природных ядов, а применили подходы компьютерного моделирования для создания искусственных соединений с заданными свойствами. Примеры похожих работ известны, од-

нако впервые рациональное проектирование токсин-подобных пептидных молекул выполнено с таким масштабом и оказалось успешным в отношении такого разнообразия ионных каналов. Особого внимания заслуживает группа работ, посвященная α-гарпининам, поскольку в данном случае мы открыли целое семейство пептидов, после чего использовали их укладку для скаффолд-инженерии и получили лиганды K^+ каналов. При этом мы добились получения селективного и высокоаффинного лиганда K_v1.6, чего ранее исследователям не удавалось. Наши работы выделяются также тем, что мы впервые применили белковую топографию, чего в области никто не делал, и только вслед за нами появились статьи коллег из других лабораторий ИБХ РАН. Представляется очевидным, что следующий этап развития подходов компьютерного моделирования состоит в использовании нейросетевых моделей наподобие AlphaFold-Multimer (988) или AlphaFold 3 (931), и в наших будущих исследованиях мы постараемся «подружить» ставшие классическими докинг, МД и метод Монте-Карло с «новомодными» методами на основе искусственного интеллекта.

Подводя итог нашим исследованиям, сделаем акцент на том, что в результате арсенал доступных исследовательских инструментов для изучения структуры и функции ионных каналов и рецепторов расширился. В таблице 70 приведены пептиды, открытые и исследованные нами, представляющие наибольший интерес — ввиду их высокой специфичности и/или аффинности или же попросту из-за отсутствия альтернатив. Насколько широко эти соединения будут использоваться в реальной практике — покажет время; некоторые из них продаются (био)химическими компаниями, что подчеркивает потенциальный интерес специалистов в области.

Таблица 70. Разнообразие молекулярных мишеней токсинов паукообразных и искусственных соединений, изученных в рамках нашей работы.

Мишень	Токсин или искусственный пептид	Заболевания	Публикации
K_v1.1	MeKTx13-3_RMRH	Атаксия, эпилепсия	(1037)
K_v1.2	MeKTx11-1, CTX_M29I		(1023, 1038)
K_v1.3	MeKTx13-3_AAAR, Tk-hefu-10	Аутоиммунные заболевания	(1052)
K_v1.6	Tk-hefu-11	Эпилепсия	(1053)
Na_v1.4	Hm-3	Периодический паралич	(1072, 1083, 1084)
$DmNa_v$1	β/δ-Aga-1	—	(1088)
$BgNa_v$1	BeM9-13	—	(1120)
Ca_v2.1	ω-Lsp-IA	Атаксия, мигрень	(1133)
GluR	Аргиопин	Инсульт, эпилепсия	(944)
P2X3	PT1, PT6	Болевые синдромы, кашель	(1160, 1162, 1163)

Возможность использования токсинов как инструментов исследования ионных каналов подробно освещалась в Обзоре литературы. Крупный сегмент таких исследований посвящен разработке средств детекции и визуализации, когда токсин метят, чтобы его можно было обнаружить в изучаемом образце, например с помощью оптических методов. Наша работа привнесла в практику новый класс таких инструментов, представленный химерными конструктами FP-Tx. Использование их в мире пока достаточно ограниченное, главной проблемой большинства разработанных конструктов, на наш взгляд, служит высокая скорость диссоциации комплекса с мишенью (низкое значение k_{off}), поэтому вектор будущего развития направлен на получение химер с лигандами, которым свойственно близкое к необратимому связывание.

Другой важный пример нового исследовательского инструмента — светоуправляемый блокатор Ca^{2+}-проницаемых AMPA-рецепторов, структура которого основана на знании строения и механизма действия природных токсинов, а конкретнее — аргиопина, открытого Е.В. Гришиным в в 1986 г. Его ценность обусловлена колоссальной ролью глутаматных рецепторов в ЦНС. Принципиальное значение имеет также демонстрация применимости ABSP в экспериментах на срезах мозга. Будем надеяться, что с помощью нового инструмента удастся выяснить новые аспекты, связанные с функцией глутаматных рецепторов.

Напоследок хотелось бы вернуться к мысли, раскрытой во Введении. На глазах двух-трех поколений исследователей изучение природных токсинов превратилось из набора частных случаев биоорганической химии, молекулярной биологии или токсикологии в хорошо очерченную область. Более того, эта область успела пережить расцвет в «эпоху» новых молекулярных инструментов изучения ионных каналов и рецепторов, коими токсины стали рассматриваться во второй половине XX века, и переход в наши дни к новой «эпохе», когда на основе токсинов создаются лекарства. Некоторые из наиболее важных инструментов, полученных и изученных в рамках данной работы, представляются также кандидатами для разработки лекарственных средств (см. таблицу 70). Автору диссертации повезло принять участие в интереснейших исследованиях обеих эпох, и, пусть прозвучит самонадеянно, приложить руку к формированию токсинологии, какой она видится сегодня и какой станет в ближайшем будущем.

Выводы

1. С помощью комбинации методов протеомики (пептидомики) и транскриптомики проведены детальные исследования компонентного состава яда шести видов пауков (*Alopecosa marikovskyi*, *Agelena orientalis*, *Cheiracanthium punctorium*, *Heriaeus melloteei*, *Lachesana tarabaevi*, *Oxyopes takobius*) и двух видов скорпионов (*Mesobuthus eupeus*, *Orthochirus scrobiculosus*).
2. Из яда пауков и скорпионов получено несколько десятков индивидуальных токсинов, проявляющих высокую селективность в отношении целого ряда потенциал-чувствительных и лиганд-активируемых ионных каналов млекопитающих и насекомых.
3. В бактериальной системе экспрессии получено несколько десятков рекомбинантных (поли)пептидных токсинов, а также их аналогов.
4. Из яда паука *Alopecosa marikovskyi* выделен селективный модулятор кальциевых каналов P-типа ω-Lsp-IA, замедляющий процесс их активации, который может найти применение для создания лекарств от мигрени и эпилепсии.
5. В яде паука *Alopecosa marikovskyi* обнаружены селективные ингибиторы пуринергических рецепторов млекопитающих P2X3, получившие название пуротоксинов 1 и 2 (PT1 и 2). Анализ транскриптомов позволил идентифицировать родственные пептиды из семейства пуротоксина 1 у других пауков, включая пуротоксин 6 (PT6) у *Thomisus onustus*. В животных моделях PT1 и 6 показывают высокую антиноцицептивную активность и представляют собой привлекательную структурную основу для создания эффективных анальгетиков.
6. Из яда паука *Heriaeus melloteei* получены ингибиторы потенциал-чувствительных натриевых каналов Hm-1, 2 и 3. Показано, что Hm-3 является эффективным блокатором активации каналов и угнетает так называемые «ω-токи» в мутантных каналах млекопитающих $Na_v1.4$, что может быть использовано для создания лекарств от некоторых типов миотоний и параличей.
7. Охарактеризована новая группа селективных модуляторов потенциал-чувствительных натриевых каналов насекомых с уникальными фармакологическими свойствами — β/δ-агатоксины из яда паука *Agelena orientalis*. Эти токсины одновременно воздействуют на процессы активации и инактивации каналов, проявляют высокую избирательность в отношении насекомых и рассматриваются как основа для создания безопасных инсектицидов.
8. Проведен детальный анализ разнообразия лигандов потенциал-чувствительных калиевых и натриевых каналов из яда скорпионов. Создана специализированная база

данных Kalium, ведущая учет всех известных лигандов калиевых каналов (поли)пептидной природы. Разработаны подходы структурно-функционального анализа этих токсинов и рациональной модификации их свойств.

9. Из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* выделены пептидные токсины, селективно блокирующие потенциал-чувствительные калиевые каналы млекопитающих K_v1.1 и 1.2. Молекулярное моделирование комплексов блокаторов и калиевых каналов позволило получить модифицированные пептиды с увеличенной аффинностью и/или селективностью в отношении изоформ K_v1.1–1.3.
10. В яде паукообразных найдено большое разнообразие так называемых «модульных» или двудоменных токсинов. Они состоят из двух частей, каждая из которых соответствует обычному однодоменному токсину. Проведен анализ молекулярной эволюции генов двудоменных токсинов пауков *Cheiracanthium punctorium* и *Oxyopes takobius*, предложены механизмы их возникновения.
11. Охарактеризовано большое разнообразие мембрано-активных токсинов паукообразных, проявляющих цитолитическую и антимикробную активность. Показан потенциал использования цитолитических токсинов пауков *Lachesana tarabaevi* и *Oxyopes takobius* для борьбы с хламидиями.
12. Изучен молекулярный механизм действия ацилполиаминов — поровых блокаторов открытого состояния глутаматных рецепторов. Полученная информация использована для создания нового исследовательского инструмента — светоуправляемых блокаторов глутаматных рецепторов. Эти результаты помогут в изучении функции глутаматных рецепторов и разработке лекарств против заболеваний с симптомами эксайтотоксичности.
13. Отмечено сходство структурной организации токсинов животных и защитных пептидов растений. Описано новое семейство пептидов — α-гарпинины, выполняющие разнообразные защитные функции у цветковых растений и похожие по структуре на токсины скорпионов и морских улиток. На основе защитного пептида пшеницы Tk-AMP-X2 получены искусственные селективные блокаторы потенциал-чувствительных калиевых каналов млекопитающих K_v1.3 и 1.6, представляющие интерес для разработки лекарств против аутоиммунных заболеваний и эпилепсии.
14. Получен новый класс инструментов визуализации ионных каналов — химерные белки, содержащие два функциональных модуля: селективный нейротоксин и флуоресцентный белок. Продемонстрированы возможные области применения новых инструментов для локализации ионных каналов в клетках и тканях, получения новых систем скрининга лигандов ионных каналов и диагностики заболеваний.

Список сокращений

АИТЦ, аллилизотиоцианат
АМП, антимикробный пептид
а.о., аминокислотный остаток
БЛМ, бислойная липидная мембрана
БПП, брадикинин-потенцирующий пептид
БСА, бычий сывороточный альбумин
ВОЕ, единицы, образующие включения
ВПСТ, возбуждающий постсинаптический ток
ГАМК, γ-аминомасляная кислота
гипоПП, гипокалиемический периодический паралич
ДДАО, N,N-диметилдодециламин N-оксид (оксид лаурилдиметиламина)
ДМФ, N,N-диметилформамид
ДОФГ, 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфо-rac-(1-глицерин)
ДОФХ, 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфохолин
ДОФЭ, 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
ДСН, додецилсульфат натрия
ДТТ, дитиотреитол
ДФХ, додецилфосфохолин
ЗП, защитный пептид
ИПТГ, изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид
КД, круговой дихроизм
КЛСМ, конфокальная лазерная сканирующая микроскопия
крио-ЭМ, криоэлектронная микроскопия
$ЛД_{50}$, средняя летальная доза (приводит к гибели 50% испытуемых животных)
м.д., миллионная доля
МАЛДИ, матрично-активированная лазерная десорбция-ионизация
МГП, молекулярный гидрофобный потенциал
МД, молекулярная динамика
МИК, минимальная ингибирующая концентрация
Мм, молекулярная масса
МС, масс-спектрометрия
МС/МС, тандемная масс-спектрометрия
НПВС, нестероидное противовоспалительное средство
НТО, нетранслируемая область
ОТ-ПЦР, полимеразная цепная реакция, сопряженная с обратной транскрипцией
ПААГ, полиакриламидный гель
ПАФ, полный адъювант Фрейнда
ПД, поровый домен
$ПД_{50}$, доза, вызывающая паралич у 50% испытуемых животных
п.н., пара нуклеотидов
ПОФГ, 1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-(фосфо-rac-(1-глицерин))
ПОФХ, 1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин
ПОФЭ, 1-пальмитил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
ПЧД, потенциал-чувствительный домен
РСА, рентгеноструктурный анализ
ТЕМЕД, N,N,N′,N′-тетраметилэтилен-1,2-диамин
ТФУ, трифторуксусная кислота
ТФЭ, 2,2,2-трифторэтанол
ТЭА, тетраэтиламмоний
Хол, холестерин

ЦНС, центральная нервная система
экв., эквивалент
ЭГТА, этиленгликольтетрауксусная кислота
ЭДТА, этилендиаминтетрауксусная кислота
ЯМР, ядерный магнитный резонанс
ЯЭО, ядерный эффект Оверхаузера
3FTx, three-finger toxin, трехпетельный токсин
%MPE, процент максимально возможного эффекта
AChBP, ацетилхолинсвязывающий белок
AMPA, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота)
ASIC, кислоточувствительный ионный канал
BAPTA, бис-аминофенилоксиэтантетрауксусная кислота
BCECF, 2′,7′-бис(2-карбоксиэтил)-5(6)-карбоксифлуоресцеин
α-BgTx, α-бунгаротоксин
BMRB, Biological Magnetic Resonance Data Bank
Ca_v, потенциал-чувствительный кальциевый канал
CPP, cell-penetrating peptide, проникающий в клетки пептид
CSα/β, цистеин-стабилизированные α-спираль/β-слой
DAPI, 4',6-диамидино-2-фенилиндол
EC_{50}, полуэффективная концентрация (приводит к половине от максимально достижимого эффекта)
ERK1/2, extracellular signal-regulated kinases, киназы, регулируемые внеклеточными сигналами (классические MAP-киназы)
pERK1/2, фосфорилированные ERK1/2
FP, флуоресцентный белок
GluR, глутаматный рецептор
GPCR, рецептор, сопряженный с G-белком
HCS, high-content screening, одновременный многопараметрический анализ
p-HOBDI-BF_2, (5Z)-5-[(2-дифторборил-4-гидроксифенил)-метилиден]-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он
IC_{50}, концентрация полумаксимального ингибирования (приводит к подавлению регистрируемого параметра на 50%)
ICK, inhibitor cystine knot, мотив цистинового узла
i.c.v., внутримозговое (внутрижелудочковое) введение
IMAC, металл-хелатная аффинная хроматография
i.p., внутрибрюшинное введение
i.v., внутривенное введение
K_{Ca}, кальций-активируемый калиевый канал
KTx, поровые блокаторы калиевых каналов из яда скорпионов
K_v, потенциал-чувствительный калиевый канал
α-LTX, α-латротоксин
MAPK, mitogen-activated protein kinase, митоген-активируемая протеинкиназа, MAP-киназа
nAChR, никотиновый ацетилхолиновый рецептор
Na_v, потенциал-чувствительный натриевый канал
NaTx, модуляторы Na_v из яда скорпионов
NMDA, N-methyl-D-aspartate (N-метил-D-аспартат)
PDB, Protein Data Bank
PI, йодид пропидия
PKA, цАМФ-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа A)
PLA_2, фосфолипаза A_2
PLD, фосфолипаза D

pRII, фосфорилированная регуляторная субъединица протеинкиназы А типа II-α
RACE, rapid amplification of cDNA ends, быстрая амплификация концов кДНК
RMSD, root mean square deviation, среднеквадратическое отклонение (для описания различий структур)
RTX, резинифератоксин
RyR, рианодиновый рецептор
s.c., подкожное введение
scFv, одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела
SD, среднеквадратическое отклонение (в статистике)
SE, стандартная ошибка среднего
STZ, старгазин
Trx, тиоредоксин
TTX, тетродотоксин
STX, сакситоксин
UCHL1, убиквитин-С-концевая гидролаза L1
$V_{1/2}$, потенциал полумаксимальной активации каналов

Апробация работы, публикации, диссертации

Подавляющее большинство представленных здесь результатов были опубликованы, а основные докладывались на научных конференциях. Всего по теме диссертации вышло 80 статей в российских и международных рецензируемых научных журналах:

1. Pluzhnikov K., **Vassilevski A.**, Korolkova Y., Fisyunov A., Iegorova O., Krishtal O., Grishin E. (2007) omega-Lsp-IA, a novel modulator of P-type Ca^{2+} channels. *Toxicon* 50, 993-1004. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.07.004.
2. Billen B., **Vassilevski A.**, Nikolsky A., Tytgat J., Grishin E. (2008) Two novel sodium channel inhibitors from *Heriaeus melloteei* spider venom differentially interacting with mammalian channel's isoforms. *Toxicon* 52, 309-317. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.05.018.
3. Никольский А.С., Биллен Б., **Василевский А.А.**, Филькин С.Ю., Титгат Я., Гришин Е.В. (2009) Потенциал-зависимые натриевые каналы – мишени действия токсинов из яда паука *Heriaeus melloteei*. *Биологич. мембраны* 26, 249-257.
4. Polyansky A.A., **Vassilevski A.A.**, Volynsky P.E., Vorontsova O.V., Samsonova O.V., Egorova N.S., Krylov N.A., Feofanov A.V., Arseniev A.S., Grishin E.V., Efremov R.G. (2009) N-terminal amphipathic helix as a trigger of hemolytic activity in antimicrobial peptides: A case study in latarcins. *FEBS Lett.* 583, 2425-2428. doi: 10.1016/j.febslet.2009.06.044.
5. **Василевский А.А.**, Козлов С.А., Гришин Е.В. (2009) Молекулярное разнообразие яда пауков. *Успехи биологич. химии* 49, 211-274. doi [перевод в Biochemistry (Mosc.)]: 10.1134/s0006297909130069.
6. Kozlov S.A., **Vassilevski A.A.**, Grishin E.V. (2009) Secreted protein and peptide biosynthesis: precursor structures and processing mechanisms. In *Protein Biosynthesis* (Esterhouse T.E., Petrinos L.B., eds.), pp. 225-248. Nova Science Publishers, New York, NY.
7. **Vassilevski A.A.**, Kozlov S.A., Egorov T.A., Grishin E.V. (2010) Purification and characterization of biologically active peptides from spider venoms. *Methods Mol. Biol.* 615, 87-100. doi: 10.1007/978-1-60761-535-4_7.
8. Grishin E.V., Savchenko G.A., **Vassilevski A.A.**, Korolkova Y.V., Boychuk Y.A., Viatchenko-Karpinski V.Y., Nadezhdin K.D., Arseniev A.S., Pluzhnikov K.A., Kulyk V.B., Voitenko N.V., Krishtal O.O. (2010) Novel peptide from spider venom inhibits P2X3 receptors and inflammatory pain. *Ann. Neurol.* 67, 680-683. doi: 10.1002/ana.21949.
9. Billen B., **Vassilevski A.**, Nikolsky A., Debaveye S., Tytgat J., Grishin E. (2010) Unique bell-shaped voltage-dependent modulation of Na^{+} channel gating by novel insect-selective toxins from the spider *Agelena orientalis*. *J. Biol. Chem.* 285, 18545-18554. doi: 10.1074/jbc.M110.125211.
10. **Vassilevski A.A.**, Fedorova I.M., Maleeva E.E., Korolkova Y.V., Efimova S.S., Samsonova O.V., Schagina L.V., Feofanov A.V., Magazanik L.G., Grishin E.V. (2010) Novel class of spider toxin: Active principle from the yellow sac spider *Cheiracanthium punctorium* venom is a unique two-domain polypeptide. *J. Biol. Chem.* 285, 32293-32302. doi: 10.1074/jbc.M110.104265.
11. Andreev Y.A., Kozlov S.A., **Vassilevski A.A.**, Grishin E.V. (2010) Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions. *Anal. Biochem.* 407, 144-146. doi: 10.1016/j.ab.2010.07.023.
12. Savchenko G.A., Volkova T.M., **Vasilevskii A.A.**, Korol'kova Yu.V., Grishin E.V., Boichouk Ya.A., Krishtal O.A. (2011) Purinergic membrane receptors as targets for the effect of purotoxin 1, a component of venom of spiders from the *Geolycosa* genus. *Neurophysiology* 42, 387-391. doi: 10.1007/s11062-011-9173-9.
13. Nolde S.B., **Vassilevski A.A.**, Rogozhin E.A., Barinov N.A., Balashova T.A., Samsonova O.V., Baranov Y.V., Feofanov A.V., Egorov T.A., Arseniev A.S., Grishin E.V. (2011) Disulfide-stabilized helical hairpin structure and activity of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (*Echinochloa crus-galli*). *J. Biol. Chem.* 286, 25145-25153. doi: 10.1074/jbc.M110.200378.

14. Lazarev V.N., Polina N.F., Shkarupeta M.M., Kostrjukova E.S., **Vassilevski A.A.**, Kozlov S.A., Grishin E.V., Govorun V.M. (2011) Spider venom peptides for gene therapy of *Chlamydia* infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5367-5369. doi: 10.1128/AAC.00449-11.
15. Dubovskii P.V., **Vassilevski A.A.**, Samsonova O.V., Egorova N.S., Kozlov S.A., Feofanov A.V., Arseniev A.S., Grishin E.V. (2011) Novel lynx spider toxin shares common molecular architecture with defense peptides from frog skin. *FEBS J.* 278, 4382-4393. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08361.x.
16. **Vassilevski A.A.**, Grishin E.V. (2011) Novel active principles from spider venom. *Acta Chim. Slov.* 58, 717-723.
17. Andreev Y.A., **Vassilevski A.A.**, Kozlov S.A. (2012) Molecules to selectively target receptors for treatment of pain and neurogenic inflammation. *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 6, 35-45. doi: 10.2174/187221312798889266.
18. Oparin P.B., Mineev K.S., Dunaevsky Y.E., Arseniev A.S., Belozersky M.A., Grishin E.V., Egorov T.A., **Vassilevski A.A.** (2012) Buckwheat trypsin inhibitor with helical hairpin structure belongs to a new family of plant defense peptides. *Biochem. J.* 446, 69-77. doi: 10.1042/BJ20120548.
19. Polina N.F., Shkarupeta M.M., Popenko A.S., **Vassilevski A.A.**, Kozlov S.A., Grishin E.V., Lazarev V.N., Govorun V.M. (2012) Cyto-insectotoxin 1a from *Lachesana tarabaevi* spider venom inhibits *Chlamydia trachomatis* infection. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 4, 208-216. doi: 10.1007/s12602-012-9108-9.
20. Kabanova N.V., **Vassilevski A.A.**, Rogachevskaja O.A., Bystrova M.F., Korolkova Y.V., Pluzhnikov K.A., Romanov R.A., Grishin E.V., Kolesnikov S.S. (2012) Modulation of P2X3 receptors by spider toxins. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1818, 2868-2875. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.07.016.
21. Polyansky A.A., Chugunov A.O., **Vassilevski A.A.**, Grishin E.V., Efremov R.G. (2012) Recent advances in computational modeling of α-helical membrane-active peptides. *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 644-657. doi: 10.2174/138920312804142147.
22. Kuzmenkov A.I., Fedorova I.M., **Vassilevski A.A.**, Grishin E.V. (2013) Cysteine-rich toxins from *Lachesana tarabaevi* spider venom with amphiphilic C-terminal segments. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1828, 724-731. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.10.014.
23. Lazarev V.N., Shkarupeta M.M., Polina N.F., Kostrjukova E.S., **Vassilevski A.A.**, Kozlov S.A., Grishin E.V., Govorun V.M. (2013) Antimicrobial peptide from spider venom inhibits *Chlamydia trachomatis* infection at an early stage. *Arch. Microbiol.* 195, 173-179. doi: 10.1007/s00203-012-0863-5.
24. Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Kuzmenkov A.I., **Vassilevski A.A.**, Ignatova A.A., Korolkova Y.V., Grishin E.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. (2013) Fluorescent system based on bacterial expression of hybrid KcsA channels designed for Kv1.3 ligand screening and study. *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2379-2389. doi: 10.1007/s00216-012-6655-6.
25. Chugunov A.O., Koromyslova A.D., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Polyansky A.A., Pentkovsky V.M., **Vassilevski A.A.**, Grishin E.V., Efremov R.G. (2013) Modular organization of α-toxins from scorpion venom mirrors domain structure of their targets, sodium channels. *J. Biol. Chem.* 288, 19014-19027. doi: 10.1074/jbc.M112.431650.
26. Utkina L.L., Andreev Y.A., Rogozhin E.A., Korostyleva T.V., Slavokhotova A.A., Oparin P.B., **Vassilevski A.A.**, Grishin E.V., Egorov T.A., Odintsova T.I. (2013) Genes encoding 4-Cys antimicrobial peptides in wheat *Triticum kiharae* Dorof. et Migush.: multimodular structural organization, instraspecific variability, distribution and role in defence. *FEBS J.* 280, 3594-3608. doi: 10.1111/febs.12349.
27. **Vassilevski A.A.**, Sachkova M.Y., Ignatova A.A., Kozlov S.A., Feofanov A.V., Grishin E.V. (2013) Spider toxins comprising disulfide-rich and linear amphipathic domains: A new class of molecules identified in the lynx spider *Oxyopes takobius*. *FEBS J.* 280, 6247-6261. doi: 10.1111/febs.12547.

28. Slavokhotova A.A., Rogozhin E.A., Musolyamov A.K., Andreev Y.A., Oparin P.B., Berkut A.A., **Vassilevski A.A.**, Egorov T.A., Grishin E.V., Odintsova T.I. (2014) Novel antifungal α-hairpinin peptide from *Stellaria media* seeds: structure, biosynthesis, gene structure and evolution. *Plant Mol. Biol.* 84, 189-202. doi: 10.1007/s11103-013-0127-z.
29. Sachkova M.Y., Slavokhotova A.A., Grishin E.V., **Vassilevski A.A.** (2014) Genes and evolution of two-domain toxins from lynx spider venom. *FEBS Lett.* 588, 740-745. doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.018.
30. Berkut A.A., Usmanova D.R., Peigneur S., Oparin P.B., Mineev K.S., Odintsova T.I., Tytgat J., Arseniev A.S., Grishin E.V., **Vassilevski A.A.** (2014) Structural similarity between defense peptide from wheat and scorpion neurotoxin permits rational functional design. *J. Biol. Chem.* 289, 14331-14340. doi: 10.1074/jbc.M113.530477.
31. Sachkova M.Y., Slavokhotova A.A., Grishin E.V., **Vassilevski A.A.** (2014) Structure of the yellow sac spider *Cheiracanthium punctorium* genes provides clues to evolution of insecticidal two-domain knottin toxins. *Insect Mol. Biol.* 23, 527-538. doi: 10.1111/imb.12097.
32. Арзамасов А.А., **Василевский А.А.**, Гришин Е.В. (2014) Хлоротоксин и родственные пептиды — короткие инсектотоксины из яда скорпионов. *Биоорган. химия* 40, 387-398. doi: 10.7868/S0132342314040010.
33. Berkut A.A., Peigneur S., Myshkin M.Y., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Arseniev A.S., Grishin E.V., Tytgat J., Shenkarev Z.O., **Vassilevski A.A.** (2015) Structure of membrane-active toxin from crab spider *Heriaeus melloteei* suggests parallel evolution of sodium channel gating modifiers in Araneomorphae and Mygalomorphae. *J. Biol. Chem.* 290, 492-504. doi: 10.1074/jbc.M114.595678.
34. Kuzmenkov A.I., **Vassilevski A.A.**, Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tytgat J., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V. (2015) Variability of potassium channel blockers in *Mesobuthus eupeus* scorpion venom with focus on Kv1.1: an integrated transcriptomic and proteomic study. *J. Biol. Chem.* 290, 12195-12209. doi: 10.1074/jbc.M115.637611.
35. Dubovskii P.V., **Vassilevski A.A.**, Kozlov S.A., Feofanov A.V., Grishin E.V., Efremov R.G. (2015) Latarcins: versatile spider venom peptides. *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4501-4522. doi: 10.1007/s00018-015-2016-x.
36. Кузьменков А.И., Гришин Е.В., **Василевский А.А.** (2015) Разнообразие лигандов калиевых каналов и место токсинов скорпионов среди них. *Успехи биологич. химии* 55, 289-350. doi [перевод в Biochemistry (Mosc.)]: 10.1134/S0006297915130118.
37. 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. doi: 10.1093/database/baw056.
38. 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. doi: 10.1042/BCJ20160436.
39. Kuzmenkov A.I., Nekrasova O.V., Kudryashova K.S., Peigneur S., Tytgat J., Stepanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V., Feofanov A.V., **Vassilevski A.A.** (2016). Fluorescent protein-scorpion toxin chimera is a convenient molecular tool for studies of potassium channels. *Sci. Rep.* 6, 33314. doi: 10.1038/srep33314.
40. Oparin P.B., Nadezhdin K.D., Berkut A.A., Arseniev A.S., Grishin E.V., **Vassilevski A.A.** (2016). Structure of purotoxin-2 from wolf spider: modular design and membrane-assisted mode of action in arachnid toxins. *Biochem. J.* 473, 3113-3126. doi: 10.1042/BCJ20160573.
41. Nadezhdin K.D., Romanovskaia D.D., Sachkova M.Y., Oparin P.B., Kovalchuk S.I., Grishin E.V., Arseniev A.S., **Vassilevski A.A.** (2017) Modular toxin from the lynx spider *Oxyopes takobius*: Structure of spiderine domains in solution and membrane-mimicking environment. *Protein Sci.* 26, 611-616. doi: 10.1002/pro.3101.
42. 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 Proteom.* 1865, 465-472. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.02.001.
43. Andreev-Andrievskiy A., Popova A., Lagereva E., Osipov D., Berkut A., Grishin E., **Vassilevski A.** (2017) Pharmacological analysis of *Poecilotheria* spider venoms in mice provides clues for human treatment. *Toxicon* 138, 59-67. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.08.013.
44. Kuldyushev N.A., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Grishin E.V., **Vassilevski A.A.** (2017) Design of sodium channel ligands with defined selectivity — a case study in scorpion alpha-toxins. *FEBS Lett.* 591, 3414-3420. doi: 10.1002/1873-3468.12839.
45. Kuzmenkov A.I., **Vassilevski A.A.** (2018) Labelled animal toxins as selective molecular markers of ion channels: Applications in neurobiology and beyond. *Neurosci. Lett.* 679, 15-23. doi: 10.1016/j.neulet.2017.10.050.
46. Männikkö R., Shenkarev Z.O., Thor M.G., Berkut A.A., Myshkin M.Y., Paramonov A.S., Kulbatskii D.S., Kuzmin D.A., Sampedro Castañeda M., King L., Wilson E.R., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P., Schorge S., Bosmans F., Hanna M.G., Kullmann D.M., **Vassilevski A.A.** (2018) Spider toxin inhibits gating pore currents underlying periodic paralysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 4495-4500. doi: 10.1073/pnas.1720185115.
47. Kuldyushev N.A., Mineev K.S., Berkut A.A., Peigneur S., Arseniev A.S., Tytgat J., Grishin E.V., **Vassilevski A.A.** (2018) Refined structure of BeM9 reveals arginine hand, an overlooked structural motif in scorpion toxins affecting sodium channels. *Proteins* 86, 1117-1122. doi: 10.1002/prot.25583.
48. Twomey E.C., Yelshanskaya M.V., **Vassilevski A.A.**, Sobolevsky A.I. (2018) Mechanisms of channel block in calcium-permeable AMPA receptors. *Neuron* 99, 956-968.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2018.07.027.
49. 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) $K_V1.2$ channel-specific blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom: Structural basis of selectivity. *Neuropharmacology* 143, 228-238. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.09.030.
50. Шенкарёв З.О., Шулепко М.А., Пеньёр С., Мышкин М.Ю., Беркут А.А., **Василевский А.А.**, Титгат Я., Люкманова Е.Н., Кирпичников М.П. (2019) Рекомбинантная продукция и структурно-функциональная характеристика токсина Ts1 из яда бразильского скорпиона *Tityus serrulatus*. *Докл. акад. наук* 484, 112-116. doi: 10.31857/S0869-56524841112-116.
51. Utkin Y., **Vassilevski A.**, Kudryavtsev D., Undheim E.A.B. (2019) Editorial: Animal toxins as comprehensive pharmacological tools to identify diverse ion channels. *Front. Pharmacol.* 10, 423. doi: 10.3389/fphar.2019.00423.
52. 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. doi: 10.1038/s41597-019-0074-x.
53. Kasheverov I.E., Oparin P.B., Zhmak M.N., Egorova N.S., Ivanov I.A., Gigolaev A.M., Nekrasova O.V., Serebryakova M.V., Kudryavtsev D.S., Prokopev N.A., Hoang A.N., Tsetlin V.I., **Vassilevski A.A.**, Utkin Y.N. (2019) Scorpion toxins interact with nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Lett.* 593, 2779-2789. doi: 10.1002/1873-3468.13530.
54. 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. doi: 10.1074/jbc.RA119.010494.
55. Myshkin M.Y., Männikkö R., Krumkacheva O.A., Kulbatskii D.S., Chugunov A.O., Berkut A.A., Paramonov A.S., Shulepko M.A., Fedin M.V., Hanna M.G., Kullmann D.M., Bagryanskaya E.G., Arseniev A.S., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N., **Vassilevski A.A.**, Shenkarev Z.O. (2019) Cell-free expression of sodium channel domains for pharmacology studies. Noncanonical spider toxin binding site in the second voltage-sensing domain of human Nav1.4 channel. *Front. Pharmacol.* 10, 953. doi: 10.3389/fphar.2019.00953.

56. Кузьменков А.И., Пеньёр С., Титгат Я., **Василевский А.А.** (2019) Фармакологическая характеристика пептидных лигандов калиевых каналов MeKTx13-2 и MeKTx13-3 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*. *Рос. физиол. жур. им. И.М. Сеченова* 105, 1452-1462. doi: 10.1134/S0869813919110074.
57. 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. doi: 10.3389/fphar.2020.01010.
58. Føns S., Ledsgaard L., Nikolaev M.V., **Vassilevski A.A.**, Sørensen C.V., Chevalier M.K., Fiebig M., Laustsen A.H. (2020) Discovery of a recombinant human monoclonal immunoglobulin G antibody against α-latrotoxin from the Mediterranean Black Widow Spider (*Latrodectus tredecimguttatus*). *Front. Immunol.* 11, 587825. doi: 10.3389/fimmu.2020.587825.
59. Dunaevsky Y.E., Khadeeva N.V., **Vassilevski A.A.**, Domash V.I., Belozersky M.A. (2020) Proteinase inhibitors from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds. In *Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention* (Preedy V.R., Watson R.R., eds.), pp. 521-532. Elsevier, London. doi: 10.1016/B978-0-12-818553-7.00036-X.
60. van Cann M., Kuzmenkov A., Isensee J., Andreev-Andrievskiy A., Peigneur S., Khusainov G., Berkut A., Tytgat J., **Vassilevski A.**, Hucho T. (2021) Scorpion toxin MeuNaTxα-1 sensitizes primary nociceptors by selective modulation of voltage-gated sodium channels. *FEBS J.* 288, 2418-2435. doi: 10.1111/febs.15593.
61. Mineev K.S., Kuzmenkov A.I., Arseniev A.S., **Vassilevski A.A.** (2021) Structure of MeuNaTxα-1 toxin from scorpion venom highlights the importance of the nest motif. *Proteins* 89, 1055-1060. doi: 10.1002/prot.26074.
62. Мышкин М.Ю., Парамонов А.С., Кульбацкий Д.С., Суркова Е.А., Беркут А.А., **Василевский А.А.**, Люкманова Е.Н., Кирпичников М.П., Шенкарев З.О. (2021) Потенциалчувствительный домен из третьего повтора канала скелетных мышц человека $Na_V1.4$ — новая мишень действия «вольт-сенсорных» токсинов из ядов пауков. *Acta Naturae* 13, 134-139. doi: 10.32607/actanaturae.11279.
63. Tabakmakher V.M., Gigolaev A.M., Peigneur S., Krylov N.A., Tytgat J., Chugunov A.O., **Vassilevski A.A.**, Efremov R.G. (2021) Potassium channel blocker crafted by α-hairpinin scaffold engineering. *Biophys. J.* 120, 2471-2481. doi: 10.1016/j.bpj.2021.04.020.
64. Табакмахер В.М., Кузьменков А.И., Гиголаев А.М., Пиньейро-Жуниор Э.Л., Пеньёр С., Ефремов Р.Г., Титгат Я., **Василевский А.А.** (2021) Искусственный пептидный лиганд калиевого канала $K_V1.1$ с высокой селективностью. *Рос. физиол. жур. им. И.М. Сеченова* 107, 584-604. doi: 10.31857/S0869813921040130.
65. Черных М.А., Кульдюшев Н.А., Пеньёр С., Беркут А.А., Титгат Я., Ефремов Р.Г., **Василевский А.А.**, Чугунов А.О. (2021) Производное нейротоксина скорпиона BeM9, селективное в отношении потенциал-чувствительных натриевых каналов насекомых. *Биоорган. химия* 47, 495-505. doi: 10.31857/S0132342321040060.
66. Kasheverov I.E., Kuzmenkov A.I., Kudryavtsev D.S., Chudetskiy I.S., Shelukhina I.V., Barykin E.P., Ivanov I.A., Siniavin A.E., Ziganshin R.H., Baranov M.S., Tsetlin V.I., **Vassilevski A.A.**, Utkin Y.N. (2021) Snake toxins labeled by green fluorescent protein or its synthetic chromophore are new probes for nicotinic acetylcholine receptors. *Front. Mol. Biosci.* 8, 753283. doi: 10.3389/fmolb.2021.753283.
67. Gigolaev A.M., Lushpa V.A., Pinheiro-Junior E.L., Tabakmakher V.M., Peigneur S., Ignatova A.A., Feofanov A.V., Efremov R.G., Mineev K.S., Tytgat J., **Vassilevski A.A.** (2022) Artificial pore blocker acts specifically on voltage-gated potassium channel isoform $K_V1.6$. *J. Biol. Chem.* 298, 102467. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102467.
68. Гиголаев А.М., Пиньейро-Жуниор Э.Л., Пеньёр С., Титгат Я., **Василевский А.А.** (2022) Высокоаффинный $K_V1.2$-селективный пептид. *Рос. физиол. жур. им. И.М. Сеченова* 108, 1627-1638. doi: 10.31857/S0869813922120056.

69. Гиголаев А.М., Табакмахер В.М., Пеньёр С., Титгат Я., **Василевский А.А.** (2023) Оптимизация структуры α-гарпинина, блокирующего калиевые каналы K_V1.3. *Рос. физиол. жур. им. И.М. Сеченова* 109, 109-118. doi: 10.31857/S0869813923010041.
70. Kuzmenkov A.I., Gigolaev A.M., Pinheiro-Junior E.L., Peigneur S., Tytgat J., **Vassilevski A.A.** (2023). Methionine-isoleucine dichotomy at a key position in scorpion toxins inhibiting voltage-gated potassium channels. *Toxicon* 231, 107181. doi: 10.1016/j.toxicon.2023.107181.
71. Mineev K.S., Chernykh M.A., Motov V.V., Prudnikova D.A., Pavlenko D.M., Kuzmenkov A.I., Peigneur S., Tytgat J., **Vassilevski A.A.** (2023) A scorpion toxin affecting sodium channels shows double cis-trans isomerism. *FEBS Lett.* 597, 2358-2368. doi: 10.1002/1873-3468.14705.
72. Krylov N.A., Tabakmakher V.M., Yureva D.A., **Vassilevski A.A.**, Kuzmenkov A.I. (2023) Kalium 3.0 is a comprehensive depository of natural, artificial, and labeled polypeptides acting on potassium channels. *Protein Sci.* 32, e4776. doi: 10.1002/pro.4776.
73. Oparin P.B., Nikodimov S.S., **Vassilevski A.A.** (2023) Venoms with oral toxicity towards insects. *Toxicon* 235, 107308. doi: 10.1016/j.toxicon.2023.107308.
74. Ojomoko L.O., Kryukova E.V., Egorova N.S., Salikhov A.I., Epifanova L.A., Denisova D.A., Khomutov A.R., Sukhov D.A., **Vassilevski A.A.**, Khomutov M.A., Tsetlin V.I., Shelukhina I.V. (2023) Inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by oligoarginine peptides and polyamine-related compounds. *Front. Pharmacol.* 14, 1327603. doi: 10.3389/fphar.2023.1327603.
75. Черных М.А., Дюжева М.А., Кульдюшев Н.А., Пеньёр С., Беркут А.А., Титгат Я., **Василевский А.А.**, Чугунов А.О. (2024) Производное нейротоксина ВеМ9 раскрывает особенности взаимодействия с изоформой натриевых каналов Nav1.5. *Биоорган. химия* 50, 498-507. doi: 10.31857/S0132342324040081.
76. Zavarzina I.I., Kuzmenkov A.I., Dobrokhotov N.A., Maleeva E.E., Korolkova Y.V., Peigneur S., Tytgat J., Krylov N.A., **Vassilevski A.A.**, Chugunov A.O. (2024) The scorpion toxin BeKm-1 blocks hERG cardiac potassium channels using an indispensable arginine residue. *FEBS Lett.* 598, 889-901. doi: 10.1002/1873-3468.14850.
77. Oparin P., Khokhlova O., Cherkashin A., Nadezhdin K., Palikov V., Palikova Y., Korolkova Y., Mosharova I., Rogachevskaja O., Baranov M., Shaidullova K., Ermakova E., Lushpa V., Bruter A., Deykin A., Ivanova E., Silaeva Y., Dyachenko I., Bocharov E., Sitdikova G., Andreev-Andrievskiy A., Poteryaev D., Shuster A., Murashev A., Kolesnikov S., Stepanenko V., Grishin E., **Vassilevski A.** (2025) Potent painkiller from spider venom antagonizes P2X3 receptors without dysgeusia. *Mol. Ther.* 33, 771-785. doi: 10.1016/j.ymthe.2024.12.036.
78. Nikolaev M., Gataulina E., Fedorova I., Baleeva N., Baranov M., **Vassilevski A.**, Tikhonov D. (2025) Optical control of calcium-permeable AMPA receptors by azobenzene-spermines. *Br. J. Pharmacol.* 182, 5173-5191. doi: 10.1111/bph.70111.
79. Iunusova V.A., Orlov N.A., Nekrasova O.V., Feofanov A.V., **Vassilevski A.A.**, Kuzmenkov A.I. (2025) Targeting prokaryotic ion channel by a chimera of fluorescent protein and artificial peptide toxin. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1867, 184458. doi: 10.1016/j.bbamem.2025.184458.
80. Кузьменков А.И., Чудецкий И.С., Кудрявцев Д.С., Кашеверов И.Е., Цетлин В.И., **Василевский А.А.** (2025) Молекулярные зонды для визуализации никотинового ацетилхолинового рецептора на основе трехпетельных токсинов змей и красного флуоресцентного белка. *Биоорган. химия* 51, 853-862. doi: 10.31857/S0132342325050107.

По теме диссертации опубликовано 5 заявок на патенты, многие из патентов выданы:

1. **Василевский А.А.**, Савченко Г.А., Королькова Ю.В., Бойчук Я.А., Плужников К.А., Крышталь О.А., Гришин Е.В. Пептидный модулятор пуринергических рецепторов. № 2422459 (2011). Приоритет 01 июня 2010 г.
2. Лазарев В.Н., Шкарупета М.М., Левицкий С.А., **Василевский А.А.**, Козлов С.А., Гришин Е.В., Говорун В.М. Способ ингибирования возбудителя хламидийной инфекции с

использованием генов антимикробных пептидов паука *Lachesana tarabaevi*. № 2468089 (2012).
3. Есипов Р.С., Степаненко В.Н., **Василевский А.А.**, Королькова Ю.В., Гришин Е.В. Способ получения рекомбинантного анальгетического пептида. № 2571942 (2015). Приоритет 14 ноября 2013 г.
4. **Василевский А.А.**, Опарин П.Б., Королькова Ю.В., Мошарова И.В., Савченко Г.А., Бойчук Я.А., Крышталь О.А. Пептидный модулятор пуринергических рецепторов. № 2650780 (2018). Приоритет 6 декабря 2016 г. Международная заявка WO2018106142. Семейство патентов: RU0002650780, CA3045790, AU2017371488, CN110062763, KR1020190090849, EA201991365, EP3584254, JP2020504098, US20200207815.
5. Степаненко В.Н., Макаров Д.А., Зинченко А.А., Опарин П.Б., Соколова И.В., Воробьева Т.В., Левандовская К.Г., Павленко Д.М., Нокель Е.А., Пучков И.А., Гордеева Е.А., Мирошников А.И., Мягких И.В., **Василевский А.А.** Способ получения пептида, модулирующего активность пуринергических рецепторов. № 2714114 (2020). Приоритет 30 августа 2019 г.

Частично результаты работы вошли в материалы кандидатских диссертаций, защищенных под руководством А.А. Василевского или Е.В. Гришина (во втором случае ключевая роль А.А. Василевского подтверждается авторством соответствующих публикаций):

1. А.А. Молявка, «Структурно-функциональный анализ полипептидного токсина Lsp-1 из яда паука *Lycosa* и токсиномика яда паука *Agelena orientalis*», 2006 г. (руководитель Е.В. Гришин);
2. А.С. Никольский, «Полипептидные компоненты яда пауков, модулирующие активность потенциал-зависимых натриевых каналов», 2012 г. (руководитель Е.В. Гришин);
3. П.Б. Опарин, «α-Гарпинины — защитные пептиды растений», 2014 г. (руководитель А.А. Василевский);
4. М.Ю. Сачкова, «Двудоменные токсины ядов пауков», 2014 г. (руководитель А.А. Василевский);
5. А.И. Кузьменков, «Токсины яда скорпионов *Mesobuthus eupeus* и *Orthochirus scrobiculosus*, действующие на калиевые каналы», 2016 г. (руководитель А.А. Василевский);
6. А.А. Беркут, «Молекулярные основы взаимодействия компонентов яда паукообразных с потенциал-чувствительными натриевыми каналами», 2019 г. (руководитель А.А. Василевский);
7. А.М. Гиголаев, «Молекулярные основы селективности пептидных поровых блокаторов калиевых каналов», 2023 г. (руководитель А.А. Василевский);
8. В.А. Юнусова, «Поровые блокаторы калиевых каналов из яда беспозвоночных и их производные», 2026 г. (руководитель А.А. Василевский).

Благодарности

Автор признателен многим коллегам за помощь и участие. Большинство — сотрудники ГНЦ ИБХ РАН:

Е.В. Гришину за научное руководство и передачу бесценного опыта;

Ц.А. Егорову за обучение хроматографии и химии белка;

Сотрудникам лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии А.И. Кузьменкову, П.Б. Опарину, А.А. Беркут, А.М. Гиголаеву, М.Ю. Сачковой, А.С. Никольскому, А.А. Арзамасову, Н.А. Кульдюшеву, Д.К. Лукьянову, С.С. Никодимову, И.А. Поляковой, Д.А. Прудниковой, Н.Б. Устинову, Г.А. Хусаинову, М.А. Черных, И.С. Чудецкому, В.А. Юнусовой, Д.А. Юрьевой и Н.Б. Нигматулиной за многолетний труд и поддержку;

Сотрудникам лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов Л.А. Александровой, Я.А. Андрееву, Т.Г. Галкиной, В.Н. Данилевичу, С.Г. Кошелеву, Е.Е. Малеевой, И.В. Мошаровой, Д.И. Осмакову, К.А. Плужникову, А.А. Славохотовой за помощь в работе и особенно Ю.В. Корольковой — за обучение практической молекулярной биологии, С.А. Козлову — за помощь в анализе транскриптомов, А.Х. Мусолямову и Е.А. Рогожину — за проведение деградации по Эдману;

Руководителям лаборатории моделирования биомолекулярных систем и группы анализа структуры мембранных белков *in silico* Р.Г. Ефремову и А.О. Чугунову и сотрудникам этих подразделений П.Е. Волынскому, Н.А. Доброхотову, Я.И. Заварзиной, А.Д. Коромысловой, Н.А. Крылову, А.Ф. Лихоносовой, Д.Е. Нольде, А.А. Полянскому и В.М. Табакмахеру за многолетний труд по моделированию токсинов и их комплексов с мишенями, а также созданию и поддержанию базы данных Kalium;

Сотрудникам лабораторий химии пептидов, рецепции нейропептидов, лиганд-рецепторных взаимодействий и протеомики Н.С. Егоровой, М.Н. Жмаку, С.И. Ковальчуку и А.Ю. Суровому за химический синтез пептидов;

Руководителю лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул А.В. Феофанову и его сотрудникам О.В. Воронцовой, А.А. Игнатовой, К.С. Кудряшовой, Н.А. Орлову и О.В. Самсоновой за эксперименты по круговому дихроизму, анализ активности пептидов на клеточных культурах и сферопластах;

Руководителям и сотрудникам лабораторий биомолекулярной ЯМР-спектроскопии и структурной биологии ионных каналов А.С. Арсеньеву, К.С. Минееву, Э.В. Бочарову, З.О. Шенкарёву, Т.А. Балашовой, М.В. Гончарук, С.А. Гончаруку, П.В. Дубовскому, В.А. Лушпе, В.В. Мотову, М.Ю. Мышкину, К.Д. Надеждину, Е.В. Новиковой, С.Б. Нольде,

А.С. Парамонову, Д.Д. Романовской, Д.Р. Усмановой, В.В. Чупину за многолетнее сотрудничество, колоссальный труд по изучению пространственной структуры токсинов и всяческую помощь и поддержку;

Сотрудникам лаборатории протеомики Д.Г. Алексееву, Р.Х. Зиганшину и С.И. Ковальчуку за получение масс-спектров и помощь в их интерпретации;

Руководителю опытного биотехнологического производства В.Н. Степаненко и его сотрудникам Д.А. Макарову и Д.М. Павленко, а также сотруднику лаборатории биотехнологии А.А. Зинченко — за создание технологии получения РТ6;

Руководителям отдела биологических испытаний А.Н. Мурашеву и лаборатории биологических испытаний И.А. Дьяченко и их сотрудникам Ю.А. Паликовой, В.А. Паликову, О.Н. Хохловой — за изучение активности РТ6 на животных;

Руководителю отдела биоинженерии М.П. Кирпичникову и его сотрудникам Д.С. Кульбацкому, Е.Н. Люкмановой, О.В. Некрасовой, М.А. Шулепко — за получение и изучение препаратов мембранных белков;

Руководителю лаборатории химии гетероциклических соединений М.С. Баранову и его сотруднице Н.С. Балеевой за химический синтез BLU-5937 (камлипиксанта) и ABSP;

Руководителю отдела молекулярной нейроиммунной сигнализации В.И. Цетлину, руководителю лаборатории молекулярной токсинологии Ю.Н. Уткину за поддержку, помощь и ценные замечания;

Руководителю лаборатории лиганд-рецепторных взаимодействий И.Е. Кашеверову за проведение радиолигандного анализа; сотруднику этой лаборатории Д.С. Кудрявцеву за электрофизиологию на nAChR;

Руководителю лаборатории нейроиммунных процессов И.В. Шелухиной за эксперименты на срезах языка крысы;

Сотруднику лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза А.М. Нестеренко за помощь в построении регулярных выражений для анализа баз данных.

Автор признателен коллегам из других исследовательских центров (в скобках приводятся номера рисунков, данные для которых получены этими людьми):

Сотрудникам лаборатории молекулярной физиологии клетки Института биофизики клетки РАН: М.Ф. Быстровой, Н.В. Кабановой, О.А. Рогачевской, Р.А. Романову, А.П. Черкашину, а также ее руководителю С.С. Колесникову — за эксперименты по действию пуротоксинов на P2X рецепторы (96, 97);

Сотрудникам лаборатории биофизики синаптических процессов Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН Э.Д. Гатаулиной, М.В. Николаеву,

И.М. Федоровой, а также ее руководителям Л.Г. Магазанику и Д.Б. Тихонову — за эксперименты на нервно-мышечном сочленении мухи и лягушки и GluR (129);

Руководителю лаборатории фенотипирования животных Института медико-биологических проблем РАН А.А. Андрееву-Андриевскому и его сотрудникам Е.А. Лагеревой, М.А. Машкину, Н.В. Паньковой, А.С. Поповой, Е.В. Телятниковой, О.В. Фадеевой, сотруднице НИИ фармакологии имени В.В. Закусова Е.А. Ивановой — за изучение активности пептидов на животных (88, 100);

Директору ФНКЦ физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА В.М. Говоруну, заместителю директора В.Н. Лазареву и его сотрудницам Е.С. Кострюковой, Н.Ф. Полиной, М.М. Шкарупета за изучение активности пептидов на хламидиях (112);

Руководителю лаборатории моделирования мембран и ионных каналов Института цитологии РАН Л.В. Щагиной и ее сотруднице С.С. Ефимовой за эксперименты на липидных бислоях;

Сотруднику лаборатории медицинской протеомики НИИ биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича И.Ю. Торопыгину за получение масс-спектров;

Сотрудникам Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины в Институте биологии гена РАН А.В. Брутер, А.В. Дейкину, Ю.Ю. Силаевой за получение мышей, нокаутных по гену *P2rx3*;

Сотруднику компании «Евроген» А.Ф. Фрадкову за генно-инженерные работы;

Сотруднику Московского зоопарка Д.В. Осипову и руководителю компании компании Fauna Laboratories (Казахстан) А. Федорову за предоставление образцов яда;

А. Белову за помощь с оформлением рисунка 13.

Директору Института физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины О.А. Крышталю и его сторудникам Я.А. Бойчуку, О.В. Егоровой, Г.А. Савченко, А.И. Фисюнову за эксперименты на Ca^{2+} каналах и P2X рецепторах (91, 92, 95);

Руководителю лаборатории токсикологии и фармакологии Лёвенского университета (Бельгия) Я. Титгату (J. Tytgat) и его сотрудникам Б. Биллену (B. Billen), С. Дебавей (S. Debaveye), С. Пеньёру (S. Peigneur), Э. Пинейро-младшему (E. Pinheiro-Junior) за многолетнее сотрудничество и электрофизиологические эксперименты (56, 59, 61, 68–70, 75–79, 85);

Директору Центра нервно-мышечных заболеваний Медицинского исследовательского совета М. Ханна (M. Hanna), профессору неврологии Института неврологии Университетского колледжа Лондона (Великобритания) Д. Кульманну (D. Kullmann) и их сотрудникам Р. Манникко (R. Männikkö), М. Сампедро Кастаньеда (M. Sampedro Castañeda), М. Тор

(M. Thor), Д.А. Кузьмину, Л. Кинг (L. King), Э. Уилсон (E. Wilson), С. Скордж (S. Schorge), за изучение омега-токов (71, 72);

Руководителю лаборатории Колумбийского университета (США) А.И. Соболевскому и его сотрудникам Э.К. Твоми (E.C. Twomey) и М.В. Елшанской за эксперименты по крио-ЭМ (127);

Руководителю лаборатории трансляционного исследования боли Университетской больницы Кёльна (Германия) Т. Хухо (T. Hucho) и его сотрудникам Й. Изензее (J. Isensee), М. ван Канн (M. van Cann) за многопараметрический анализ чувствительных нейронов (87, 89);

Руководителю лаборатории в Медицинской школе Университета Джонса Хопкинса (США) Ф. Босмансу (F. Bosmans) за тестирование токсинов на химерных Na_v/K_v каналах (72);

Сотрудникам DuPont Agriculture and Nutrition (США) М. Долан (M. Dolan), У. Креспану (W. Krespan), Б. Маккатчену (B. McCutchen), Р. Херрманну (R. Herrmann) за создание и секвенирование библиотек кДНК ядовитых желез паукообразных;

Сотруднице UniProt и Швейцарского института биоинформатики, главному создателю и куратору VenomZone Ф. Жунго (F. Jungo) за подробное объяснение принципов работы этих баз данных.

Часть иллюстраций в Результатах и их обсуждении подготовлены с использованием рисунков из оригинальных статей, опубликованных по работе (список приведен выше). Лицензии у издательств автором получены.

Список литературы

1. (2018) World Spider Catalog, version 19.0 Natural History Museum Bern,
2. Fet, V., Sissom, W. D., Lowe, G. J., and Braunwalder, M. E. (2000) *Catalog of the Scorpions of the World (1758-1998)*, New York Entomological Society,
3. Harvey, M. S. (2011) Pseudoscorpions of the World, version 2.0 Western Australian Museum, Perth
4. Kramer, J., Luddecke, T., Marner, M., Maiworm, E., Eichberg, J., Hardes, K. *et al.* (2022) Antimicrobial, insecticidal and cytotoxic activity of linear venom peptides from the pseudoscorpion Chelifer cancroides *Toxins (Basel)* **14**, 58
5. Schmidt, J. O., Dani, F. R., Jones, G. R., and Morgan, E. D. (2000) Chemistry, ontogeny, and role of pygidial gland secretions of the vinegaroon Mastigoproctus giganteus (Arachnida: Uropygi) *J Insect Physiol* **46**, 443–450
6. Dean, J., Aneshansley, D. J., Edgerton, H. E., and Eisner, T. (1990) Defensive spray of the bombardier beetle: a biological pulse jet *Science* **248**, 1219–1221
7. Mans, B. J., Steinmann, C. M., Venter, J. D., Louw, A. I., and Neitz, A. W. (2002) Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, Ornithodoros savignyi *Toxicon* **40**, 1007–1016
8. Mans, B. J., Louw, A. I., and Neitz, A. W. (2003) The major tick salivary gland proteins and toxins from the soft tick, Ornithodoros savignyi, are part of the tick Lipocalin family: implications for the origins of tick toxicoses *Mol Biol Evol* **20**, 1158–1167
9. Mans, B. J., Gothe, R., and Neitz, A. W. (2004) Biochemical perspectives on paralysis and other forms of toxicoses caused by ticks *Parasitology* **129 Suppl**, S95–111
10. Cabezas-Cruz, A., and Valdes, J. J. (2014) Are ticks venomous animals? *Front Zool* **11**, 47
11. Rodriguez-Valle, M., Moolhuijzen, P., Barrero, R. A., Ong, C. T., Busch, G., Karbanowicz, T. *et al.* (2018) Transcriptome and toxin family analysis of the paralysis tick, Ixodes holocyclus *Int J Parasitol* **48**, 71–82
12. Weng, J.-L., Barrantes, G., and Eberhard, W. G. (2006) Feeding by Philoponella vicina (Araneae, Uloboridae) and how uloborid spiders lost their venom glands *Can J Zool* **84**, 1752–1762
13. Suter, R. B., and Stratton, G. E. (2013) Predation by spitting spiders: elaborate venom gland, intricate delivery system In *Spider Ecophysiology*, Nentwig W, ed. Springer, Berlin, Heidelberg, 241–251
14. Jungo, F., Bougueleret, L., Xenarios, I., and Poux, S. (2012) The UniProtKB/Swiss-Prot Tox-Prot program: A central hub of integrated venom protein data *Toxicon* **60**, 551–557
15. Kuhn-Nentwig, L., Stöcklin, R., and Nentwig, W. (2011) Venom composition and strategies in spiders: is everything possible? In *Spider Physiology and Behaviour*, Casas J, ed. Elsevier, 1–86
16. Russell, J. F. (1979) Tarantism *Medical history* **23**, 404–425
17. Diaz, J. H. (2004) The global epidemiology, syndromic classification, management, and prevention of spider bites *Am J Trop Med Hyg* **71**, 239–250
18. Isbister, G. K., and Fan, H. W. (2011) Spider bite *Lancet* **378**, 2039–2047
19. Hauke, T. J., and Herzig, V. (2017) Dangerous arachnids-Fake news or reality? *Toxicon* **138**, 173–183
20. Chippaux, J. P., and Goyffon, M. (2008) Epidemiology of scorpionism: a global appraisal *Acta Trop* **107**, 71–79
21. Gutierrez, J. M., Calvete, J. J., Habib, A. G., Harrison, R. A., Williams, D. J., and Warrell, D. A. (2017) Snakebite envenoming *Nat Rev Dis Primers* **3**, 17063
22. Catterall, W. A. (1976) Purification of a toxic protein from scorpion venom which activates the action potential Na+ ionophore *J Biol Chem* **251**, 5528–5536

23. Nicholson, G. M., Willow, M., Howden, M. E., and Narahashi, T. (1994) Modification of sodium channel gating and kinetics by versutoxin from the Australian funnel-web spider Hadronyche versuta *Pflugers Arch* **428**, 400–409
24. Matavel, A., Cruz, J. S., Penaforte, C. L., Araujo, D. A., Kalapothakis, E., Prado, V. F. *et al.* (2002) Electrophysiological characterization and molecular identification of the Phoneutria nigriventer peptide toxin PnTx2-6 *FEBS Lett* **523**, 219–223
25. Miller, M. K., Whyte, I. M., White, J., and Keir, P. M. (2000) Clinical features and management of Hadronyche envenomation in man *Toxicon* **38**, 409–427
26. Weisel-Eichler, A., and Libersat, F. (2004) Venom effects on monoaminergic systems *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* **190**, 683–690
27. Reis, M. B., Zoccal, K. F., Gardinassi, L. G., and Faccioli, L. H. (2019) Scorpion envenomation and inflammation: Beyond neurotoxic effects *Toxicon* **167**, 174–179
28. Grishin, E. V. (1998) Black widow spider toxins: the present and the future *Toxicon* **36**, 1693–1701
29. Isbister, G. K., and Gray, M. R. (2003) Effects of envenoming by comb-footed spiders of the genera Steatoda and Achaearanea (family Theridiidae: Araneae) in Australia *J Toxicol Clin Toxicol* **41**, 809–819
30. da Silva, P. H., da Silveira, R. B., Appel, M. H., Mangili, O. C., Gremski, W., and Veiga, S. S. (2004) Brown spiders and loxoscelism *Toxicon* **44**, 693–709
31. Gremski, L. H., Trevisan-Silva, D., Ferrer, V. P., Matsubara, F. H., Meissner, G. O., Wille, A. C. *et al.* (2014) Recent advances in the understanding of brown spider venoms: From the biology of spiders to the molecular mechanisms of toxins *Toxicon* **83**, 91–120
32. Zobel-Thropp, P. A., Bodner, M. R., and Binford, G. J. (2010) Comparative analyses of venoms from American and African Sicarius spiders that differ in sphingomyelinase D activity *Toxicon* **55**, 1274–1282
33. Lopes, P. H., Bertani, R., Goncalves-de-Andrade, R. M., Nagahama, R. H., van den Berg, C. W., and Tambourgi, D. V. (2013) Venom of the Brazilian spider Sicarius ornatus (Araneae, Sicariidae) contains active sphingomyelinase D: potential for toxicity after envenomation *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2394
34. Chand, K. K., Lee, K. M., Lavidis, N. A., Rodriguez-Valle, M., Ijaz, H., Koehbach, J. *et al.* (2016) Tick holocyclotoxins trigger host paralysis by presynaptic inhibition *Sci Rep* **6**, 29446
35. Nicholson, G. M., Walsh, R., Little, M. J., and Tyler, M. I. (1998) Characterisation of the effects of robustoxin, the lethal neurotoxin from the Sydney funnel-web spider Atrax robustus, on sodium channel activation and inactivation *Pflugers Arch* **436**, 117–126
36. Bucaretchi, F., Deus Reinaldo, C. R., Hyslop, S., Madureira, P. R., De Capitani, E. M., and Vieira, R. J. (2000) A clinico-epidemiological study of bites by spiders of the genus Phoneutria *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **42**, 17–21
37. Maretic, Z. (1983) Latrodectism: variations in clinical manifestations provoked by Latrodectus species of spiders *Toxicon* **21**, 457–466
38. Wright, S. W., Wrenn, K. D., Murray, L., and Seger, D. (1997) Clinical presentation and outcome of brown recluse spider bite *Ann Emerg Med* **30**, 28–32
39. Possani, L. D., Becerril, B., Delepierre, M., and Tytgat, J. (1999) Scorpion toxins specific for Na+-channels *Eur J Biochem* **264**, 287–300
40. Bosmans, F., and Tytgat, J. (2007) Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins *Toxicon* **49**, 142–158
41. Isbister, G. K., and Bawaskar, H. S. (2014) Scorpion envenomation *N Engl J Med* **371**, 457–463
42. Ryan, N. M., Buckley, N. A., and Graudins, A. (2017) Treatments for latrodectism — A systematic review on their clinical effectiveness *Toxins (Basel)* **9**, 148

43. Graudins, A., Wilson, D., Alewood, P. F., Broady, K. W., and Nicholson, G. M. (2002) Cross-reactivity of Sydney funnel-web spider antivenom: neutralization of the in vitro toxicity of other Australian funnel-web (Atrax and Hadronyche) spider venoms *Toxicon* **40**, 259–266
44. Pauli, I., Puka, J., Gubert, I. C., and Minozzo, J. C. (2006) The efficacy of antivenom in loxoscelism treatment *Toxicon* **48**, 123–137
45. Monte, A. A. (2012) Black widow spider (Latrodectus mactans) antivenom in clinical practice *Curr Pharm Biotechnol* **13**, 1935–1939
46. de Roodt, A. R., Lago, N. R., Lanari, L. C., Laskowicz, R. D., Costa de Oliveira, V., Neder de Roman, E. *et al.* (2017) Lethality and histopathological alterations caused by Phoneutria nigriventer spider venom from Argentina: Neutralization of lethality by experimental and therapeutic antivenoms *Toxicon* **125**, 24–31
47. Rodrigo, C., and Gnanathasan, A. (2017) Management of scorpion envenoming: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials *Syst Rev* **6**, 74
48. Laustsen, A. H., Sola, M., Jappe, E. C., Oscoz, S., Lauridsen, L. P., and Engmark, M. (2016) Biotechnological trends in spider and scorpion antivenom development *Toxins (Basel)* **8**, 226
49. Boyer, L. (2013) History of scorpion antivenom: one Arizonan's view *Toxicon* **69**, 14–20
50. Alvarenga, L. M., Zahid, M., di Tommaso, A., Juste, M. O., Aubrey, N., Billiald, P. *et al.* (2014) Engineering venom's toxin-neutralizing antibody fragments and its therapeutic potential *Toxins (Basel)* **6**, 2541–2567
51. Squaiella-Baptistao, C. C., Sant'Anna, O. A., Marcelino, J. R., and Tambourgi, D. V. (2018) The history of antivenoms development: Beyond Calmette and Vital Brazil *Toxicon* **150**, 86–95
52. Murphy, C. M., Hong, J. J., and Beuhler, M. C. (2011) Anaphylaxis with Latrodectus antivenin resulting in cardiac arrest *J Med Toxicol* **7**, 317–321
53. Leon, G., Herrera, M., Segura, A., Villalta, M., Vargas, M., and Gutierrez, J. M. (2013) Pathogenic mechanisms underlying adverse reactions induced by intravenous administration of snake antivenoms *Toxicon* **76**, 63–76
54. Fischer, J., Eberlein, B., Hilger, C., Eyer, F., Eyerich, S., Ollert, M. *et al.* (2017) Alpha-gal is a possible target of IgE-mediated reactivity to antivenom *Allergy* **72**, 764–771
55. Murphy, J. C. (2010) Antivenoms administered properly and swiftly save lives *Nat Med* **16**, 747
56. Isbister, G. K., Page, C. B., Buckley, N. A., Fatovich, D. M., Pascu, O., MacDonald, S. P. *et al.* (2014) Randomized controlled trial of intravenous antivenom versus placebo for latrodectism: the second Redback Antivenom Evaluation (RAVE-II) study *Ann Emerg Med* **64**, 620–628 e622
57. Laustsen, A. H., Lohse, B., Lomonte, B., Engmark, M., and Gutierrez, J. M. (2015) Selecting key toxins for focused development of elapid snake antivenoms and inhibitors guided by a Toxicity Score *Toxicon* **104**, 43–45
58. Rodriguez-Rodriguez, E. R., Olamendi-Portugal, T., Serrano-Posada, H., Arredondo-Lopez, J. N., Gomez-Ramirez, I., Fernandez-Taboada, G. *et al.* (2016) Broadening the neutralizing capacity of a family of antibody fragments against different toxins from Mexican scorpions *Toxicon* **119**, 52–63
59. Alvarenga, L. M., Diniz, C. R., Granier, C., and Chavez-Olortegui, C. (2002) Induction of neutralizing antibodies against Tityus serrulatus scorpion toxins by immunization with a mixture of defined synthetic epitopes *Toxicon* **40**, 89–95
60. Bahraoui, E., Pichon, J., Muller, J. M., Darbon, H., Elayeb, M., Granier, C. *et al.* (1988) Monoclonal antibodies to scorpion toxins. Characterization and molecular mechanisms of neutralization *J Immunol* **141**, 214–220

61. Clot-Faybesse, O., Juin, M., Rochat, H., and Devaux, C. (1999) Monoclonal antibodies against the Androctonus australis hector scorpion neurotoxin I: characterisation and use for venom neutralisation *FEBS Lett* **458**, 313–318
62. Mousli, M., Devaux, C., Rochat, H., Goyffon, M., and Billiald, P. (1999) A recombinant single-chain antibody fragment that neutralizes toxin II from the venom of the scorpion Androctonus australis hector *FEBS Lett* **442**, 183–188
63. Devaux, C., Moreau, E., Goyffon, M., Rochat, H., and Billiald, P. (2001) Construction and functional evaluation of a single-chain antibody fragment that neutralizes toxin AahI from the venom of the scorpion Androctonus australis hector *Eur J Biochem* **268**, 694–702
64. Juarez-Gonzalez, V. R., Riano-Umbarila, L., Quintero-Hernandez, V., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-Leon, M., Ortiz, E. *et al.* (2005) Directed evolution, phage display and combination of evolved mutants: a strategy to recover the neutralization properties of the scFv version of BCF2 a neutralizing monoclonal antibody specific to scorpion toxin Cn2 *J Mol Biol* **346**, 1287–1297
65. Abderrazek, R. B., Hmila, I., Vincke, C., Benlasfar, Z., Pellis, M., Dabbek, H. *et al.* (2009) Identification of potent nanobodies to neutralize the most poisonous polypeptide from scorpion venom *Biochem J* **424**, 263–272
66. Hmila, I., Saerens, D., Ben Abderrazek, R., Vincke, C., Abidi, N., Benlasfar, Z. *et al.* (2010) A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming *FASEB J* **24**, 3479–3489
67. Selisko, B., Cosio, G., Garcia, C., Becerril, B., Possani, L. D., and Horjales, E. (2004) Bacterial expression, purification and functional characterization of a recombinant chimeric Fab derived from murine mAb BCF2 that neutralizes the venom of the scorpion Centruroides noxius hoffmann *Toxicon* **43**, 43–51
68. Riano-Umbarila, L., Juarez-Gonzalez, V. R., Olamendi-Portugal, T., Ortiz-Leon, M., Possani, L. D., and Becerril, B. (2005) A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. An example of a single-chain antibody fragment that neutralizes a major component of scorpion venom *FEBS J* **272**, 2591–2601
69. Riano-Umbarila, L., Contreras-Ferrat, G., Olamendi-Portugal, T., Morelos-Juarez, C., Corzo, G., Possani, L. D. *et al.* (2011) Exploiting cross-reactivity to neutralize two different scorpion venoms with one single chain antibody fragment *J Biol Chem* **286**, 6143–6151
70. Rodriguez-Rodriguez, E. R., Ledezma-Candanoza, L. M., Contreras-Ferrat, L. G., Olamendi-Portugal, T., Possani, L. D., Becerril, B. *et al.* (2012) A single mutation in framework 2 of the heavy variable domain improves the properties of a diabody and a related single-chain antibody *J Mol Biol* **423**, 337–350
71. Føns, S., Ledsgaard, L., Nikolaev, M. V., Vassilevski, A. A., Sørensen, C. V., Chevalier, M. K. *et al.* (2020) Discovery of a recombinant human monoclonal immunoglobulin G antibody against α-latrotoxin from the Mediterranean black widow spider (Latrodectus tredecimguttatus) *Frontiers in immunology* **11**, 587825
72. Swiderski, R. (2010) *Poison Eaters: Snakes, Opium, Arsenic, and the Lethal Show*,
73. Glanville, J., Bellin, M., Pletnev, S., Zhang, B., Andrade, J. C., Kim, S. *et al.* (2025) Snake venom protection by a cocktail of varespladib and broadly neutralizing human antibodies *Cell* **188**, 3117–3134 e3111
74. Laustsen, A. H., Maria Gutierrez, J., Knudsen, C., Johansen, K. H., Bermudez-Mendez, E., Cerni, F. A. *et al.* (2018) Pros and cons of different therapeutic antibody formats for recombinant antivenom development *Toxicon* **146**, 151–175

75. Geffeney, S. L., Fujimoto, E., Brodie, E. D., 3rd, Brodie, E. D., Jr., and Ruben, P. C. (2005) Evolutionary diversification of TTX-resistant sodium channels in a predator-prey interaction *Nature* **434**, 759–763
76. Wang, S. Y., and Wang, G. K. (2017) Single rat muscle Na(+) channel mutation confers batrachotoxin autoresistance found in poison-dart frog Phyllobates terribilis *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 10491–10496
77. Tarvin, R. D., Borghese, C. M., Sachs, W., Santos, J. C., Lu, Y., O'Connell, L. A. *et al.* (2017) Interacting amino acid replacements allow poison frogs to evolve epibatidine resistance *Science* **357**, 1261–1266
78. Legros, C., Martin-Eauclaire, M. F., and Cattaert, D. (1998) The myth of scorpion suicide: are scorpions insensitive to their own venom? *J Exp Biol* **201 (Pt 18)**, 2625–2636
79. Zuo, X. P., He, H. Q., He, M., Liu, Z. R., Xu, Q., Ye, J. G. *et al.* (2006) Comparative pharmacology and cloning of two novel arachnid sodium channels: Exploring the adaptive insensitivity of scorpion to its toxins *FEBS Lett* **580**, 4508–4514
80. Cao, Z., Yu, Y., Wu, Y., Hao, P., Di, Z., He, Y. *et al.* (2013) The genome of Mesobuthus martensii reveals a unique adaptation model of arthropods *Nat Commun* **4**, 2602
81. Rowe, A. H., and Rowe, M. P. (2006) Risk assessment by grasshopper mice (Onychomys spp.) feeding on neurotoxic prey (Centruroides spp.) *Animal Behaviour* **71**, 725–734
82. Rowe, A. H., Xiao, Y., Rowe, M. P., Cummins, T. R., and Zakon, H. H. (2013) Voltage-gated sodium channel in grasshopper mice defends against bark scorpion toxin *Science* **342**, 441–446
83. Santos, W. F., and Coutinho-Netto, J. (2006) Effects of the Paratemnus elongatus pseudoscorpion venom in the uptake and binding of the L-glutamate and GABA from rat cerebral cortex *J Biochem Mol Toxicol* **20**, 27–34
84. Santibanez-Lopez, C. E., Ontano, A. Z., Harvey, M. S., and Sharma, P. P. (2018) Transcriptomic analysis of pseudoscorpion venom reveals a unique cocktail dominated by enzymes and protease inhibitors *Toxins (Basel)* **10**, 207
85. Vink, S., Daly, N. L., Steen, N., Craik, D. J., and Alewood, P. F. (2014) Holocyclotoxin-1, a cystine knot toxin from Ixodes holocyclus *Toxicon* **90**, 308–317
86. Pienaar, R., Neitz, A. W. H., and Mans, B. J. (2018) Tick paralysis: solving an enigma *Vet Sci* **5**,
87. Rong, M., Liu, J., Zhang, M., Wang, G., Zhao, G., Wang, G. *et al.* (2016) A sodium channel inhibitor ISTX-I with a novel structure provides a new hint at the evolutionary link between two toxin folds *Sci Rep* **6**, 29691
88. Malli, H., Kuhn-Nentwig, L., Imboden, H., and Nentwig, W. (1999) Effects of size, motility and paralysation time of prey on the quantity of venom injected by the hunting spider Cupiennius salei *J Exp Biol* **202**, 2083–2089
89. Nisani, Z., Boskovic, D. S., Dunbar, S. G., Kelln, W., and Hayes, W. K. (2012) Investigating the chemical profile of regenerated scorpion (Parabuthus transvaalicus) venom in relation to metabolic cost and toxicity *Toxicon* **60**, 315–323
90. Evans, E. R. J., Northfield, T. D., Daly, N. L., and Wilson, D. T. (2019) Venom costs and optimization in scorpions *Front Ecol Evol* **7**, 196
91. Lyons, K., Dugon, M. M., and Healy, K. (2025) Spider venom potency exhibits phylogenetic prey specificity but does not trade-off with body size or silk use in prey capture *Biol Lett* **21**, 20250133
92. Wigger, E., Kuhn-Nentwig, L., and Nentwig, W. (2002) The venom optimisation hypothesis: a spider injects large venom quantities only into difficult prey types *Toxicon* **40**, 749–752
93. Alsop, D. W., and Bettini, S. (1978) *Arthropod venoms*, Springer-Verlag, Berlin

94. Yang, S., Yang, F., Zhang, B., Lee, B. H., Li, B., Luo, L. *et al.* (2017) A bimodal activation mechanism underlies scorpion toxin-induced pain *Science advances* **3**, e1700810
95. Zhao, L., Zhang, S., Li, J., Zhang, C., Xiao, R., Bai, X. *et al.* (2024) Unveiling diversity and function: venom-associated microbes in two spiders, Heteropoda venatoria and Chilobrachys guangxiensis *Microb Ecol* **87**, 156
96. Murdoch, B., Kleinschmit, A. J., Santibanez-Lopez, C. E., and Graham, M. R. (2026) Microbiota discovered in scorpion venom *PLoS One* **21**, e0328427
97. Quintero-Hernandez, V., Jimenez-Vargas, J. M., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H., and Possani, L. D. (2013) Scorpion venom components that affect ion-channels function *Toxicon* **76**, 328–342
98. Grishin, E. V., Volkova, T. M., and Arseniev, A. S. (1989) Isolation and structure analysis of components from venom of the spider Argiope lobata *Toxicon* **27**, 541–549
99. Василевский, А. А. (2008) *Цитолитические и антимикробные пептиды из яда паука Lachesana tarabaevi*, ИБХ РАН
100. Adams, M. E. (2004) Agatoxins: ion channel specific toxins from the American funnel web spider, Agelenopsis aperta *Toxicon* **43**, 509–525
101. Yan, L., and Adams, M. E. (1998) Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider Lycosa carolinensis *J Biol Chem* **273**, 2059–2066
102. Koua, D., Mary, R., Ebou, A., Barrachina, C., El Koulali, K., Cazals, G. *et al.* (2020) Proteotranscriptomic insights into the venom composition of the wolf spider Lycosa tarantula *Toxins (Basel)* **12**, 501
103. Miranda, F., Kupeyan, C., Rochat, H., Rochat, C., and Lissitzky, S. (1970) Purification of animal neurotoxins. Isolation and characterization of eleven neurotoxins from the venoms of the scorpions Androctonus australis hector, Buthus occitanus tunetanus and Leiurus quinquestriatus quinquestriatus *Eur J Biochem* **16**, 514–523
104. Гришин, Е. В., Солдатов, Н. М., Ташмухамедов, Б. А., and Атакузиев, Б. У. (1978) Выделение, свойства и аминокислотный состав токсинов яда среднеазиатского скорпиона Buthus eupeus *Биоорган химия* **4**, 450–460
105. Skinner, W. S., Adams, M. E., Quistad, G. B., Kataoka, H., Cesarin, B. J., Enderlin, F. E. *et al.* (1989) Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, Agelenopsis aperta *J Biol Chem* **264**, 2150–2155
106. Красноперов, В. Г., Шамотиенко, О. Г., and Гришин, Е. В. (1990) Выделение и свойства инсектоспецифичных нейротоксинов из яда паука каракурта Latrodectus mactans tredecimguttatus *Биоорган химия* **16**, 1138–1140
107. Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., Feofanov, A. V., Surovoy, A. Y., Karpunin, D. V., and Grishin, E. V. (2006) Latarcins, antimicrobial and cytolytic peptides from the venom of the spider Lachesana tarabaevi (Zodariidae) that exemplify biomolecular diversity *J Biol Chem* **281**, 20983–20992
108. Escoubas, P., Quinton, L., and Nicholson, G. M. (2008) Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry *J Mass Spectrom* **43**, 279–295
109. Liang, S. (2008) Proteome and peptidome profiling of spider venoms *Expert Rev Proteomics* **5**, 731–746
110. Tang, X., Zhang, Y., Hu, W., Xu, D., Tao, H., Yang, X. *et al.* (2010) Molecular diversification of peptide toxins from the tarantula Haplopelma hainanum (Ornithoctonus hainana) venom based on transcriptomic, peptidomic, and genomic analyses *J Proteome Res* **9**, 2550–2564
111. Palagi, A., Koh, J. M., Leblanc, M., Wilson, D., Dutertre, S., King, G. F. *et al.* (2013) Unravelling the complex venom landscapes of lethal Australian funnel-web spiders (Hexathelidae: Atracinae) using LC-MALDI-TOF mass spectrometry *J Proteomics* **80**, 292–310

112. Oldrati, V., Koua, D., Allard, P. M., Hulo, N., Arrell, M., Nentwig, W. *et al.* (2017) Peptidomic and transcriptomic profiling of four distinct spider venoms *PLoS One* **12**, e0172966
113. Rokyta, D. R., and Ward, M. J. (2017) Venom-gland transcriptomics and venom proteomics of the black-back scorpion (Hadrurus spadix) reveal detectability challenges and an unexplored realm of animal toxin diversity *Toxicon* **128**, 23–37
114. Batista, C. V., del Pozo, L., Zamudio, F. Z., Contreras, S., Becerril, B., Wanke, E. *et al.* (2004) Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion Tityus cambridgei and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **803**, 55–66
115. Rates, B., Ferraz, K. K., Borges, M. H., Richardson, M., De Lima, M. E., and Pimenta, A. M. (2008) Tityus serrulatus venom peptidomics: assessing venom peptide diversity *Toxicon* **52**, 611–618
116. Quintero-Hernandez, V., Ortiz, E., Rendon-Anaya, M., Schwartz, E. F., Becerril, B., Corzo, G. *et al.* (2011) Scorpion and spider venom peptides: gene cloning and peptide expression *Toxicon* **58**, 644–663
117. Xu, X., Duan, Z., Di, Z., He, Y., Li, J., Li, Z. *et al.* (2014) Proteomic analysis of the venom from the scorpion Mesobuthus martensii *J Proteomics* **106**, 162–180
118. Pernemalm, M., and Lehtio, J. (2014) Mass spectrometry-based plasma proteomics: state of the art and future outlook *Expert Rev Proteomics* **11**, 431–448
119. dos Santos, V. L. P., Franco, C. R., Viggiano, R. L., da Silveira, R. B., Cantão, M. P., Mangili, O. C. *et al.* (2000) Structural and ultrastructural description of the venom gland of Loxosceles intermedia (brown spider) *Toxicon* **38**, 265–285
120. Yigit, N., and Guven, T. (2006) Functional structure of Agelena labyrinthica's (Araneae:Agelenidae) venom gland and electrophoresis of venom *Toxicon* **47**, 58–67
121. Silva, L. M., Botelho, A. C., Nacif-Pimenta, R., Martins, G. F., Alves, L. C., Brayner, F. A. *et al.* (2008) Structural analysis of the venom glands of the armed spider Phoneutria nigriventer (Keyserling, 1891): microanatomy, fine structure and confocal observations *Toxicon* **51**, 693–706
122. Soliman, B. A., Shoukry, N. M., Mohallal, M. E., Fetaih, H. A. W., and Khaled, H. S. (2013) Fine structure of the stinger, histology and histochemistry of the venom gland in the scorpion Androctonus amoreuxi (Buthidae) *J Basic Appl Zool* **66**, 41–46
123. Xun, C., Wang, L., Yang, H., Xiao, Z., Deng, M., Xu, R. *et al.* (2021) Origin and characterization of extracellular vesicles present in the spider venom of Ornithoctonus hainana *Toxins (Basel)* **13**, 579
124. Kozlov, S., Malyavka, A., McCutchen, B., Lu, A., Schepers, E., Herrmann, R. *et al.* (2005) A novel strategy for the identification of toxinlike structures in spider venom *Proteins* **59**, 131–140
125. Duan, Z., Cao, R., Jiang, L., and Liang, S. (2013) A combined de novo protein sequencing and cDNA library approach to the venomic analysis of Chinese spider Araneus ventricosus *J Proteomics* **78**, 416–427
126. Zhong, J., Zeng, X. C., Zeng, X., Nie, Y., Zhang, L., Wu, S. *et al.* (2017) Transcriptomic analysis of the venom glands from the scorpion Hadogenes troglodytes revealed unique and extremely high diversity of the venom peptides *J Proteomics* **150**, 40–62
127. Zhang, Y. Y., Huang, Y., He, Q. Z., Luo, J., Zhu, L., Lu, S. S. *et al.* (2015) Structural and functional diversity of peptide toxins from tarantula Haplopelma hainanum (Ornithoctonus hainana) venom revealed by transcriptomic, peptidomic, and patch clamp approaches *J Biol Chem* **290**, 14192–14207
128. Haney, R. A., Clarke, T. H., Gadgil, R., Fitzpatrick, R., Hayashi, C. Y., Ayoub, N. A. *et al.* (2016) Effects of gene duplication, positive selection, and shifts in gene expression on

the evolution of the venom gland transcriptome in widow spiders *Genome Biol Evol* **8**, 228–242
129. Romero-Gutierrez, T., Peguero-Sanchez, E., Cevallos, M. A., Batista, C. V. F., Ortiz, E., and Possani, L. D. (2017) A deeper examination of Thorellius atrox scorpion venom components with omic techonologies *Toxins (Basel)* **9**, 399
130. Zhu, S., Li, W., and Cao, Z. (2001) A naturally occurring non-coding fusion transcript derived from scorpion venom gland: implication for the regulation of scorpion toxin gene expression *FEBS Lett* **508**, 241–244
131. Zeng, X. C., and Wang, S. X. (2002) Evidence that BmTXK beta-BmKCT cDNA from Chinese scorpion Buthus martensii Karsch is an artifact generated in the reverse transcription process *FEBS Lett* **520**, 183–184; author reply 185
132. Pineda, S. S., Chin, Y. K., Undheim, E. A. B., Senff, S., Mobli, M., Dauly, C. *et al.* (2020) Structural venomics reveals evolution of a complex venom by duplication and diversification of an ancient peptide-encoding gene *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 11399–11408
133. Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., and Sabatier, J. M. (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels *Biochem J* **378**, 717–726
134. Pallaghy, P. K., Nielsen, K. J., Craik, D. J., and Norton, R. S. (1994) A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides *Protein Sci* **3**, 1833–1839
135. Gracy, J., and Chiche, L. (2011) Structure and modeling of knottins, a promising molecular scaffold for drug discovery *Curr Pharm Des* **17**, 4337–4350
136. Froy, O., and Gurevitz, M. (1998) Membrane potential modulators: a thread of scarlet from plants to humans *FASEB J* **12**, 1793–1796
137. Zhu, S., Gao, B., and Tytgat, J. (2005) Phylogenetic distribution, functional epitopes and evolution of the CSalphabeta superfamily *Cell Mol Life Sci* **62**, 2257–2269
138. Tsetlin, V. I. (2015) Three-finger snake neurotoxins and Ly6 proteins targeting nicotinic acetylcholine receptors: pharmacological tools and endogenous modulators *Trends Pharmacol Sci* **36**, 109–123
139. Terlau, H., and Olivera, B. M. (2004) Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides *Physiol Rev* **84**, 41–68
140. Reeks, T. A., Fry, B. G., and Alewood, P. F. (2015) Privileged frameworks from snake venom *Cell Mol Life Sci* **72**, 1939–1958
141. Миков, А. Н., and Козлов, С. А. (2015) Структурные особенности цистеин-богатых полипептидов из ядов морских анемон *Биоорган химия* **41**, 511–523
142. Olivera, B. M., Hillyard, D. R., Marsh, M., and Yoshikami, D. (1995) Combinatorial peptide libraries in drug design: lessons from venomous cone snails *Trends Biotechnol* **13**, 422–426
143. Sollod, B. L., Wilson, D., Zhaxybayeva, O., Gogarten, J. P., Drinkwater, R., and King, G. F. (2005) Were arachnids the first to use combinatorial peptide libraries? *Peptides* **26**, 131–139
144. Starcevic, A., and Long, P. F. (2013) Diversification of animal venom peptides-were jellyfish amongst the first combinatorial chemists? *Chembiochem* **14**, 1407–1409
145. Estrada, G., Villegas, E., and Corzo, G. (2007) Spider venoms: a rich source of acylpolyamines and peptides as new leads for CNS drugs *Nat Prod Rep* **24**, 145–161
146. Pineda, S. S., Sollod, B. L., Wilson, D., Darling, A., Sunagar, K., Undheim, E. A. *et al.* (2014) Diversification of a single ancestral gene into a successful toxin superfamily in highly venomous Australian funnel-web spiders *BMC Genomics* **15**, 177
147. Wong, E. S., and Belov, K. (2012) Venom evolution through gene duplications *Gene* **496**, 1–7

148. Fry, B. G., Wuster, W., Kini, R. M., Brusic, V., Khan, A., Venkataraman, D. *et al.* (2003) Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins *J Mol Evol* **57**, 110–129
149. Macrander, J., and Daly, M. (2016) Evolution of the cytolytic pore-forming proteins (actinoporins) in sea anemones *Toxins (Basel)* **8**, 368
150. McIntosh, J. M., Santos, A. D., and Olivera, B. M. (1999) Conus peptides targeted to specific nicotinic acetylcholine receptor subtypes *Annu Rev Biochem* **68**, 59–88
151. Conticello, S. G., Gilad, Y., Avidan, N., Ben-Asher, E., Levy, Z., and Fainzilber, M. (2001) Mechanisms for evolving hypervariability: the case of conopeptides *Mol Biol Evol* **18**, 120–131
152. Pimenta, A. M., De Marco Almeida, F., de Lima, M. E., Martin-Eauclaire, M. F., and Bougis, P. E. (2003) Individual variability in Tityus serrulatus (Scorpiones, Buthidae) venom elicited by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**, 413–418
153. Шляпников, Ю. М., Козлов, С. А., Федоров, А. А., and Гришин, Е. В. (2010) Сравнение полипептидного состава яда индивидуальных пауков Agelena orientalis *Биоорган химия* **36**, 81–88
154. Planas, E., Zobel-Thropp, P. A., Ribera, C., and Binford, G. (2015) Not as docile as it looks? Loxosceles venom variation and loxoscelism in the Mediterranean Basin and the Canary Islands *Toxicon* **93**, 11–19
155. Duran, L. H., Rymer, T. L., and Wilson, D. T. (2020) Variation in venom composition in the Australian funnel-web spiders Hadronyche valida *Toxicon: X* **8**, 100063
156. Herzig, V., Sunagar, K., Wilson, D. T. R., Pineda, S. S., Israel, M. R., Dutertre, S. *et al.* (2020) Australian funnel-web spiders evolved human-lethal δ-hexatoxins for defense against vertebrate predators *Proc Natl Acad Sci U S A* **117**, 24920–24928
157. Tytgat, J., Chandy, K. G., Garcia, M. L., Gutman, G. A., Martin-Eauclaire, M. F., van der Walt, J. J. *et al.* (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies *Trends Pharmacol Sci* **20**, 444–447
158. Kozlov, S., and Grishin, E. (2005) Classification of spider neurotoxins using structural motifs by primary structure features. Single residue distribution analysis and pattern analysis techniques *Toxicon* **46**, 672–686
159. King, G. F., Gentz, M. C., Escoubas, P., and Nicholson, G. M. (2008) A rational nomenclature for naming peptide toxins from spiders and other venomous animals *Toxicon* **52**, 264–276
160. Forster, Y. M., Reusser, S., Forster, F., Bienz, S., and Bigler, L. (2020) VenoMS — a website for the low molecular mass compounds in spider venoms *Metabolites* **10**,
161. Kuhn-Nentwig, L., Schaller, J., and Nentwig, W. (1994) Purification of toxic peptides and the amino acid sequence of CSTX-1 from the multicomponent venom of Cupiennius salei (Araneae:Ctenidae) *Toxicon* **32**, 287–302
162. Boeve, J. L., Kuhn-Nentwig, L., Keller, S., and Nentwig, W. (1995) Quantity and quality of venom released by a spider (Cupiennius salei, Ctenidae) *Toxicon* **33**, 1347–1357
163. Müller, H. M. (1987) Ionic concentrations, osmolarity and pH of the haemolymph of the common housespider Tegenaria atrica C.L. Koch (Agelenidae, Arachnida) *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* **87**, 433–437
164. Chapman, R. F. (1998) *The Insects: Structure and Function*, 4th Ed., Cambridge University Press, Cambridge
165. Wullschleger, B., Nentwig, W., and Kuhn-Nentwig, L. (2005) Spider venom: enhancement of venom efficacy mediated by different synergistic strategies in Cupiennius salei *J Exp Biol* **208**, 2115–2121
166. Inceoglu, B., Lango, J., Jing, J., Chen, L., Doymaz, F., Pessah, I. N. *et al.* (2003) One scorpion, two venoms: prevenom of Parabuthus transvaalicus acts as an alternative

type of venom with distinct mechanism of action *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 922–927
167. Fenton, A. W., West, P. R., Odell, G. V., Hudiburg, S. M., Ownby, C. L., Mills, J. N. *et al.* (1995) Arthropod venom citrate inhibits phospholipase A2 *Toxicon* **33**, 763–770
168. Francis, B., Seebart, C., and Kaiser, II (1992) Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation *Toxicon* **30**, 1239–1246
169. Odell, G. V., Fenton, A. W., Ownby, C. L., Doss, M. P., and Schmidt, J. O. (1999) The role of venom citrate *Toxicon* **37**, 407–409
170. Adam, K. R., and Weiss, C. (1959) Distribution of 5-hydroxytryptamine in scorpion venoms *Nature* **183**, 1398–1399
171. Welsh, J. H., and Batty, C. S. (1963) 5-Hydroxytryptamine content of some arthropod venoms and venom-containing parts *Toxicon* **1**, 165–170
172. Schanbacher, F. L., Lee, C. K., Hall, J. E., Wilson, I. B., Howell, D. E., and Odell, G. V. (1973) Composition and properties of tarantula Dugesiella hentzi (Girard) venom *Toxicon* **11**, 21–29
173. Lange, C., Paris, C., and Celerier, M. L. (1992) The components of the venom of a spider Scodra griseipes. 2. Structural information on biogenic amines using tandem mass spectrometry *Rapid Commun Mass Spectrom* **6**, 517–519
174. Frew, R., Hamilton, M. G., and Lundy, P. M. (1994) Identification of noradrenaline in venom from the funnel-web spider Hololena curta *Toxicon* **32**, 511–515
175. Rash, L. D., King, R. G., and Hodgson, W. C. (1998) Evidence that histamine is the principal pharmacological component of venom from an Australian wolf spider (Lycosa godeffroyi) *Toxicon* **36**, 367–375
176. Nirthanan, S., Joseph, J. S., Gopalakrishnakone, P., Khoo, H. E., Cheah, L. S., and Gwee, M. C. (2002) Biochemical and pharmacological characterization of the venom of the black scorpion Heterometrus spinifer *Biochem Pharmacol* **63**, 49–55
177. Schroeder, F. C., Taggi, A. E., Gronquist, M., Malik, R. U., Grant, J. B., Eisner, T. *et al.* (2008) NMR-spectroscopic screening of spider venom reveals sulfated nucleosides as major components for the brown recluse and related species *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 14283–14287
178. Gewehr, C., Oliveira, S. M., Rossato, M. F., Trevisan, G., Dalmolin, G. D., Rigo, F. K. *et al.* (2013) Mechanisms involved in the nociception triggered by the venom of the armed spider Phoneutria nigriventer *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2198
179. Forster, Y. M., Green, J. L., Khatiwada, A., Liberato, J. L., Narayana Reddy, P. A., Salvino, J. M. *et al.* (2020) Elucidation of the structure and synthesis of neuroprotective low molecular mass components of the Parawixia bistriata spider venom *ACS Chem Neurosci* **11**, 1573–1596
180. Ibarra-Vega, R., Jimenez-Vargas, J. M., Pineda-Contreras, A., Martinez-Martinez, F. J., Barajas-Saucedo, C. E., Garcia-Ortega, H. *et al.* (2023) Indolealkylamines in the venom of the scorpion Thorellius intrepidus *Toxicon* **233**, 107232
181. Gelfuso, E. A., Cunha, A. O., Mortari, M. R., Liberato, J. L., Paraventi, K. H., Beleboni, R. O. *et al.* (2007) Neuropharmacological profile of FrPbAII, purified from the venom of the social spider Parawixia bistriata (Araneae, Araneidae), in Wistar rats *Life Sci* **80**, 566–572
182. Gelfuso, E. A., Liberato, J. L., Cunha, A. O., Mortari, M. R., Beleboni, R. O., Lopes, N. P. *et al.* (2013) Parawixin2, a novel non-selective GABA uptake inhibitor from Parawixia bistriata spider venom, inhibits pentylenetetrazole-induced chemical kindling in rats *Neurosci Lett* **543**, 12–16
183. Liberato, J. L., Godoy, L. D., Cunha, A. O. S., Mortari, M. R., de Oliveira Beleboni, R., Fontana, A. C. K. *et al.* (2018) Parawixin2 protects hippocampal cells in experimental temporal lobe epilepsy *Toxins (Basel)* **10**, 486

184. Beleboni, R. O., Guizzo, R., Fontana, A. C., Pizzo, A. B., Carolino, R. O., Gobbo-Neto, L. *et al.* (2006) Neurochemical characterization of a neuroprotective compound from Parawixia bistriata spider venom that inhibits synaptosomal uptake of GABA and glycine *Mol Pharmacol* **69**, 1998–2006
185. Fontana, A. C., Guizzo, R., de Oliveira Beleboni, R., Meirelles, E. S. A. R., Coimbra, N. C., Amara, S. G. *et al.* (2003) Purification of a neuroprotective component of Parawixia bistriata spider venom that enhances glutamate uptake *Br J Pharmacol* **139**, 1297–1309
186. Fontana, A. C., de Oliveira Beleboni, R., Wojewodzic, M. W., Ferreira Dos Santos, W., Coutinho-Netto, J., Grutle, N. J. *et al.* (2007) Enhancing glutamate transport: mechanism of action of Parawixin1, a neuroprotective compound from Parawixia bistriata spider venom *Mol Pharmacol* **72**, 1228–1237
187. Torres-Salazar, D., and Fahlke, C. (2007) Parawixin1: a spider toxin opening new avenues for glutamate transporter pharmacology *Mol Pharmacol* **72**, 1100–1102
188. Osborne, R. H. (1996) Insect neurotransmission: neurotransmitters and their receptors *Pharmacol Ther* **69**, 117–142
189. Early, S. L., and Michaelis, E. K. (1987) Presence of proteins and glutamate as major constituents of the venom of the spider Araneus gemma *Toxicon* **25**, 433–442
190. Moore, E. L., Haspel, G., Libersat, F., and Adams, M. E. (2006) Parasitoid wasp sting: a cocktail of GABA, taurine, and beta-alanine opens chloride channels for central synaptic block and transient paralysis of a cockroach host *J Neurobiol* **66**, 811–820
191. Paludo, K. S., Biscaia, S. M., Chaim, O. M., Otuki, M. F., Naliwaiko, K., Dombrowski, P. A. *et al.* (2009) Inflammatory events induced by brown spider venom and its recombinant dermonecrotic toxin: a pharmacological investigation *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **149**, 323–333
192. Quistad, G. B., Lam, W. W., and Casida, J. E. (1993) Identification of bis(agmatine)oxalamide in venom from the primitive hunting spider, Plectreurys tristis (Simon) *Toxicon* **31**, 920–924
193. Banerjee, S., Gnanamani, E., Lynch, S. R., Zuniga, F. Z., Jimenez-Vargas, J. M., Possani, L. D. *et al.* (2018) An alkaloid from scorpion venom: chemical structure and synthesis *J Nat Prod* **81**, 1899–1904
194. Chan, T. K., Geren, C. R., Howell, D. E., and Odell, G. V. (1975) Adenosine triphosphate in tarantula spider venoms and its synergistic effect with the venom toxin *Toxicon* **13**, 61–66
195. Horni, A., Weickmann, D., and Hesse, M. (2001) The main products of the low molecular mass fraction in the venom of the spider Latrodectus menavodi *Toxicon* **39**, 425–428
196. Rodrigues, M. C., Guizzo, R., Gobbo-Neto, L., Ward, R. J., Lopes, N. P., and dos Santos, W. F. (2004) The biological activity in mammals and insects of the nucleosidic fraction from the spider Parawixia bistriata *Toxicon* **43**, 375–383
197. Evans, E. R. J., McIntyre, L., Northfield, T. D., Daly, N. L., and Wilson, D. T. (2020) Small molecules in the venom of the scorpion Hormurus waigiensis *Biomedicines* **8**,
198. Aird, S. D. (2002) Ophidian envenomation strategies and the role of purines *Toxicon* **40**, 335–393
199. McCormick, J., Li, Y., McCormick, K., Duynstee, H. I., van Engen, A. K., van der Marel, G. A. *et al.* (1999) Structure and total synthesis of HF-7, a neuroactive glyconucleoside disulfate from the funnel-web spider Hololena curta *J Am Chem Soc* **121**, 5661–5665
200. Carcamo-Noriega, E. N., Sathyamoorthi, S., Banerjee, S., Gnanamani, E., Mendoza-Trujillo, M., Mata-Espinosa, D. *et al.* (2019) 1,4-Benzoquinone antimicrobial agents against Staphylococcus aureus and Mycobacterium tuberculosis derived from scorpion venom *Proc Natl Acad Sci U S A* **116**, 12642–12647

201. Gomes, P. C., de Souza, B. M., Dias, N. B., Cesar-Tognoli, L. M., Silva-Filho, L. C., Tormena, C. F. *et al.* (2011) Nigriventrine: a low molecular mass neuroactive compound from the venom of the spider Phoneutria nigriventer *Toxicon* **57**, 266–274
202. Cesar, L. M. M., Tormena, C. F., Marques, M. R., Silva, G. V. J., Mendes, M. A., Rittner, R. *et al.* (2005) Structure determination of hydroxytrypargine: a new tetrahydro-β-carboline toxin from the venom of the spider Parawixia bistriata *Helv Chim Acta* **88**, 796–801
203. Cesar, L. M., Mendes, M. A., Tormena, C. F., Marques, M. R., de Souza, B. M., Saidemberg, D. M. *et al.* (2005) Isolation and chemical characterization of PwTx-II: a novel alkaloid toxin from the venom of the spider Parawixia bistriata (Araneidae, Araneae) *Toxicon* **46**, 786–796
204. Marques, M. R., Mendes, M. A., Tormena, C. F., Souza, B. M., Cesar, L. M., Rittner, R. *et al.* (2005) Structure determination of a tetrahydro-beta-carboline of arthropod origin: a novel alkaloid-toxin subclass from the web of spider Nephila clavipes *Chem Biodivers* **2**, 525–534
205. Akizawa, T., Yamazaki, K., Yasuhara, T., Nakajima, T., Roseghini, M., Erspamer, G. F. *et al.* (1982) Trypargine, a new tetrahydro-β-carboline of animal origin: Isolation and chemical characterization from the skin of the African rhacophorid frog, Kassina senegalensis *Biomed Res (Tokyo)* **3**, 232–234
206. Saidemberg, D. M., Ferreira, M. A., Takahashi, T. N., Gomes, P. C., Cesar-Tognoli, L. M., da Silva-Filho, L. C. *et al.* (2009) Monoamine oxidase inhibitory activities of indolylalkaloid toxins from the venom of the colonial spider Parawixia bistriata: functional characterization of PwTX-I *Toxicon* **54**, 717–724
207. Tran, T. V., Hoang, A. N., Nguyen, T. T. T., Phung, T. V., Nguyen, K. C., Osipov, A. V. *et al.* (2017) Anticoagulant activity of low-molecular weight compounds from Heterometrus laoticus scorpion venom *Toxins (Basel)* **9**, 343
208. Гришин, Е. В., Волкова, Т. М., Арсеньев, А. С., Решетова, О. С., Оноприенко, В. В., Магазаник, Л. Г. *et al.* (1986) Структурно-функциональная характеристика аргиопина – блокатора ионных каналов *Биоорган химия* **12**, 1121–1124
209. Aramaki, Y., Yasuhara, T., Higashijima, T., Yoshioka, M., Miwa, A., Kawai, N. *et al.* (1986) Chemical characterization of spider toxin, JSTX and NSTX *Proc Jpn Acad, Ser B* **62**, 359–362
210. Aramaki, Y., Yasuhara, T., Shimazaki, K., Kawai, N., and Nakajima, T. (1987) Chemical structure of Joro spider toxin (JSTX) *Biomed Res* **8**, 241–245
211. Quistad, G. B., Suwanrumpha, S., Jarema, M. A., Shapiro, M. J., Skinner, W. S., Jamieson, G. C. *et al.* (1990) Structures of paralytic acylpolyamines from the spider Agelenopsis aperta *Biochem Biophys Res Commun* **169**, 51–56
212. Гришин, Е. В., Волкова, Т. М., and Арсеньев, А. С. (1988) Антагонисты глутаматных рецепторов из яда паука Argiope lobata *Биоорган химия* **14**, 883–892
213. Chesnov, S., Bigler, L., and Hesse, M. (2001) The acylpolyamines from the venom of the spider, Agelenopsis aperta *Helv Chim Acta* **84**, 2178–2197
214. Tzouros, M., Chesnov, S., Bienz, S., Hesse, M., and Bigler, L. (2005) New linear polyamine derivatives in spider venoms *Toxicon* **46**, 350–354
215. Eldefrawi, A. T., Eldefrawi, M. E., Konno, K., Mansour, N. A., Nakanishi, K., Oltz, E. *et al.* (1988) Structure and synthesis of a potent glutamate receptor antagonist in wasp venom *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 4910–4913
216. Магазаник, Л. Г. (1998) Блокада ионного канала как подход к исследованию подтипов АМПА-рецепторов *Рос физиол журн* **84**, 994–1005
217. Mellor, I. R., and Usherwood, P. N. (2004) Targeting ionotropic receptors with polyamine-containing toxins *Toxicon* **43**, 493–508

218. Antonov, S. M., Grishin, E. V., Magazanik, L. G., Shupliakov, O. V., Vesselkin, N. P., and Volkova, T. M. (1987) Argiopin blocks the glutamate responses and sensorimotor transmission in motoneurones of isolated frog spinal cord *Neurosci Lett* **83**, 179–184
219. Кискин, Н. И., Крышталь, О. А., Цындренко, А. Я., Волкова, Т. М., and Гришин, Е. В. (1989) Аргиопин, аргиопинины и псевдоаргиопинины – блокаторы глутаматных рецепторов в нейронах гиппокампа *Нейрофизиология* **21**, 748–756
220. Sutton, K. G., Stapleton, S. R., and Scott, R. H. (1998) Inhibitory actions of synthesised polyamine spider toxins and their analogues on Ca2+-activated Cl- currents recorded from cultured DRG neurones from neonatal rats *Neurosci Lett* **251**, 117–120
221. Lee, J. K., John, S. A., and Weiss, J. N. (1999) Novel gating mechanism of polyamine block in the strong inward rectifier K channel Kir2.1 *J Gen Physiol* **113**, 555–564
222. Bixel, M. G., Krauss, M., Liu, Y., Bolognesi, M. L., Rosini, M., Mellor, I. S. *et al.* (2000) Structure-activity relationship and site of binding of polyamine derivatives at the nicotinic acetylcholine receptor *Eur J Biochem* **267**, 110–120
223. Yakehiro, M., Furukawa, Y., Koike, T., Kimura, E., Nakajima, T., Yamaoka, K. *et al.* (2001) Novel mechanism of blocking axonal Na(+) channels by three macrocyclic polyamine analogues and two spider toxins *Br J Pharmacol* **132**, 63–72
224. Kitaguchi, T., and Swartz, K. J. (2005) An inhibitor of TRPV1 channels isolated from funnel Web spider venom *Biochemistry* **44**, 15544–15549
225. Jasys, V. J., Kelbaugh, P. R., Nason, D. M., Phillips, D., Rosnack, K. J., Saccomano, N. A. *et al.* (1990) Isolation, structure elucidation, and synthesis of novel hydroxylamine-containing polyamines from the venom of the Agelenopsis aperta spider *J Am Chem Soc* **112**, 6696–6704
226. Doroudian, Y., Schepers, M., Vanmierlo, T., and Bunch, L. (2026) The N-acylpolyamine structure assigned as Parawixin10 does not display positive allosteric modulatory activity in EAAT1-3 radioligand uptake assays, nor does it enhance neuronal survival in mice in a dose-dependent and statistically significant way *ACS Chem Neurosci* **17**, 1530–1539
227. Poulsen, M. H., Lucas, S., Bach, T. B., Barslund, A. F., Wenzler, C., Jensen, C. B. *et al.* (2013) Structure-activity relationship studies of argiotoxins: selective and potent inhibitors of ionotropic glutamate receptors *J Med Chem* **56**, 1171–1181
228. Xiong, X. F., Poulsen, M. H., Hussein, R. A., Norager, N. G., and Stromgaard, K. (2014) Structure-activity relationship study of spider polyamine toxins as inhibitors of ionotropic glutamate receptors *ChemMedChem* **9**, 2661–2670
229. Magazanik, L. G., Buldakova, S. L., Samoilova, M. V., Gmiro, V. E., Mellor, I. R., and Usherwood, P. N. (1997) Block of open channels of recombinant AMPA receptors and native AMPA/kainate receptors by adamantane derivatives *J Physiol* **505 (Pt 3)**, 655–663
230. Takazawa, A., Yamazaki, O., Kanai, H., Ishida, N., Kato, N., and Yamauchi, T. (1996) Potent and long-lasting anticonvulsant effects of 1-naphthylacetyl spermine, an analogue of Joro spider toxin, against amygdaloid kindled seizures in rats *Brain Res* **706**, 173–176
231. Hume, R. I., Dingledine, R., and Heinemann, S. F. (1991) Identification of a site in glutamate receptor subunits that controls calcium permeability *Science* **253**, 1028–1031
232. Blaschke, M., Keller, B. U., Rivosecchi, R., Hollmann, M., Heinemann, S., and Konnerth, A. (1993) A single amino acid determines the subunit-specific spider toxin block of alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate/kainate receptor channels *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6528–6532
233. Huettner, J. E. (2015) Glutamate receptor pores *J Physiol* **593**, 49–59

234. Barygin, O. I., Grishin, E. V., and Tikhonov, D. B. (2011) Argiotoxin in the closed AMPA receptor channel: experimental and modeling study *Biochemistry* **50**, 8213–8220
235. Poulsen, M. H., Andersen, J., Christensen, R., Hansen, K. B., Traynelis, S. F., Stromgaard, K. *et al.* (2015) Binding of ArgTX-636 in the NMDA receptor ion channel *J Mol Biol* **427**, 176–189
236. Bowie, D., and Mayer, M. L. (1995) Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block *Neuron* **15**, 453–462
237. Green, A. C., Nakanishi, K., and Usherwood, P. N. (1996) Polyamine amides are neuroprotective in cerebellar granule cell cultures challenged with excitatory amino acids *Brain Res* **717**, 135–146
238. Herold, E. E., and Yaksh, T. L. (1992) Anesthesia and muscle relaxation with intrathecal injections of AR636 and AG489, two acylpolyamine spider toxins, in rat *Anesthesiology* **77**, 507–512
239. Laustsen, A. H., Lomonte, B., Lohse, B., Fernandez, J., and Gutierrez, J. M. (2015) Unveiling the nature of black mamba (Dendroaspis polylepis) venom through venomics and antivenom immunoprofiling: Identification of key toxin targets for antivenom development *J Proteomics* **119**, 126–142
240. Habermann, E. (1972) Bee and wasp venoms *Science* **177**, 314–322
241. Liu, Z., Deng, M., Xiang, J., Ma, H., Hu, W., Zhao, Y. *et al.* (2012) A novel spider peptide toxin suppresses tumor growth through dual signaling pathways *Curr Mol Med* **12**, 1350–1360
242. Budnik, B. A., Olsen, J. V., Egorov, T. A., Anisimova, V. E., Galkina, T. G., Musolyamov, A. K. *et al.* (2004) De novo sequencing of antimicrobial peptides isolated from the venom glands of the wolf spider Lycosa singoriensis *J Mass Spectrom* **39**, 193–201
243. Kuhn-Nentwig, L., Muller, J., Schaller, J., Walz, A., Dathe, M., and Nentwig, W. (2002) Cupiennin 1, a new family of highly basic antimicrobial peptides in the venom of the spider Cupiennius salei (Ctenidae) *J Biol Chem* **277**, 11208–11216
244. Trachsel, C., Siegemund, D., Kampfer, U., Kopp, L. S., Buhr, C., Grossmann, J. *et al.* (2012) Multicomponent venom of the spider Cupiennius salei: a bioanalytical investigation applying different strategies *FEBS J* **279**, 2683–2694
245. Corzo, G., Villegas, E., Gomez-Lagunas, F., Possani, L. D., Belokoneva, O. S., and Nakajima, T. (2002) Oxyopinins, large amphipathic peptides isolated from the venom of the wolf spider Oxyopes kitabensis with cytolytic properties and positive insecticidal cooperativity with spider neurotoxins *J Biol Chem* **277**, 23627–23637
246. Dai, L., Yasuda, A., Naoki, H., Corzo, G., Andriantsiferana, M., and Nakajima, T. (2001) IsCT, a novel cytotoxic linear peptide from scorpion Opisthacanthus madagascariensis *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 820–825
247. Zeng, X. C., Wang, S. X., Zhu, Y., Zhu, S. Y., and Li, W. X. (2004) Identification and functional characterization of novel scorpion venom peptides with no disulfide bridge from Buthus martensii Karsch *Peptides* **25**, 143–150
248. Gao, B., and Zhu, S. (2018) Mesobuthus venom-derived antimicrobial peptides possess intrinsic multifunctionality and differential potential as drugs *Front Microbiol* **9**, 320
249. Gao, B., Xu, J., Rodriguez Mdel, C., Lanz-Mendoza, H., Hernandez-Rivas, R., Du, W. *et al.* (2010) Characterization of two linear cationic antimalarial peptides in the scorpion Mesobuthus eupeus *Biochimie* **92**, 350–359
250. Torres-Larios, A., Gurrola, G. B., Zamudio, F. Z., and Possani, L. D. (2000) Hadrurin, a new antimicrobial peptide from the venom of the scorpion Hadrurus aztecus *Eur J Biochem* **267**, 5023–5031

251. Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Barnham, K. J., He, W., Norton, R. S. *et al.* (2001) Characterization of unique amphipathic antimicrobial peptides from venom of the scorpion Pandinus imperator *Biochem J* **359**, 35–45
252. Remijsen, Q., Verdonck, F., and Willems, J. (2010) Parabutoporin, a cationic amphipathic peptide from scorpion venom: much more than an antibiotic *Toxicon* **55**, 180–185
253. Hernandez-Aponte, C. A., Silva-Sanchez, J., Quintero-Hernandez, V., Rodriguez-Romero, A., Balderas, C., Possani, L. D. *et al.* (2011) Vejovine, a new antibiotic from the scorpion venom of Vaejovis mexicanus *Toxicon* **57**, 84–92
254. Raghuraman, H., and Chattopadhyay, A. (2007) Melittin: a membrane-active peptide with diverse functions *Biosci Rep* **27**, 189–223
255. Zasloff, M. (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from Xenopus skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5449–5453
256. Zanetti, M., Gennaro, R., and Romeo, D. (1995) Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain *FEBS Lett* **374**, 1–5
257. Gao, B., Sherman, P., Luo, L., Bowie, J., and Zhu, S. (2009) Structural and functional characterization of two genetically related meucin peptides highlights evolutionary divergence and convergence in antimicrobial peptides *FASEB J* **23**, 1230–1245
258. Yuan, W., Cao, L., Ma, Y., Mao, P., Wang, W., Zhao, R. *et al.* (2010) Cloning and functional characterization of a new antimicrobial peptide gene StCT1 from the venom of the scorpion Scorpiops tibetanus *Peptides* **31**, 22–26
259. Nie, Y., Zeng, X. C., Yang, Y., Luo, F., Luo, X., Wu, S. *et al.* (2012) A novel class of antimicrobial peptides from the scorpion Heterometrus spinifer *Peptides* **38**, 389–394
260. Tan, H., Ding, X., Meng, S., Liu, C., Wang, H., Xia, L. *et al.* (2013) Antimicrobial potential of lycosin-I, a cationic and amphiphilic peptide from the venom of the spider Lycosa singorensis *Curr Mol Med* **13**, 900–910
261. Ramirez-Carreto, S., Jimenez-Vargas, J. M., Rivas-Santiago, B., Corzo, G., Possani, L. D., Becerril, B. *et al.* (2015) Peptides from the scorpion Vaejovis punctatus with broad antimicrobial activity *Peptides* **73**, 51–59
262. Cao, L., Dai, C., Li, Z., Fan, Z., Song, Y., Wu, Y. *et al.* (2012) Antibacterial activity and mechanism of a scorpion venom peptide derivative in vitro and in vivo *PLoS One* **7**, e40135
263. Bea Rde, L., Petraglia, A. F., and Johnson, L. E. (2015) Synthesis, antimicrobial activity and toxicity of analogs of the scorpion venom BmKn peptides *Toxicon* **101**, 79–84
264. Teerapo, K., Roytrakul, S., Sistayanarain, A., and Kunthalert, D. (2019) A scorpion venom peptide derivative BmKn22 with potent antibiofilm activity against Pseudomonas aeruginosa *PLoS One* **14**, e0218479
265. Pukala, T. L., Boland, M. P., Gehman, J. D., Kuhn-Nentwig, L., Separovic, F., and Bowie, J. H. (2007) Solution structure and interaction of cupiennin 1a, a spider venom peptide, with phospholipid bilayers *Biochemistry* **46**, 3576–3585
266. Lee, K., Shin, S. Y., Kim, K., Lim, S. S., Hahm, K. S., and Kim, Y. (2004) Antibiotic activity and structural analysis of the scorpion-derived antimicrobial peptide IsCT and its analogs *Biochem Biophys Res Commun* **323**, 712–719
267. Dubovskii, P. V., Volynsky, P. E., Polyansky, A. A., Chupin, V. V., Efremov, R. G., and Arseniev, A. S. (2006) Spatial structure and activity mechanism of a novel spider antimicrobial peptide *Biochemistry* **45**, 10759–10767
268. Dubovskii, P. V., Volynsky, P. E., Polyansky, A. A., Karpunin, D. V., Chupin, V. V., Efremov, R. G. *et al.* (2008) Three-dimensional structure/hydrophobicity of latarcins specifies their mode of membrane activity *Biochemistry* **47**, 3525–3533

269. Klopfer, K., and Hagn, F. (2019) Beyond detergent micelles: The advantages and applications of non-micellar and lipid-based membrane mimetics for solution-state NMR *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **114-115**, 271–283
270. Yeaman, M. R., and Yount, N. Y. (2003) Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance *Pharmacol Rev* **55**, 27–55
271. Wimley, W. C. (2010) Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model *ACS Chem Biol* **5**, 905–917
272. Hallock, K. J., Lee, D. K., Omnaas, J., Mosberg, H. I., and Ramamoorthy, A. (2002) Membrane composition determines pardaxin's mechanism of lipid bilayer disruption *Biophys J* **83**, 1004–1013
273. Qian, S., Wang, W., Yang, L., and Huang, H. W. (2008) Structure of the alamethicin pore reconstructed by x-ray diffraction analysis *Biophys J* **94**, 3512–3522
274. Ludtke, S. J., He, K., Heller, W. T., Harroun, T. A., Yang, L., and Huang, H. W. (1996) Membrane pores induced by magainin *Biochemistry* **35**, 13723–13728
275. Yang, L., Harroun, T. A., Weiss, T. M., Ding, L., and Huang, H. W. (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores *Biophys J* **81**, 1475–1485
276. Hristova, K., Wimley, W. C., Mishra, V. K., Anantharamiah, G. M., Segrest, J. P., and White, S. H. (1999) An amphipathic alpha-helix at a membrane interface: a structural study using a novel X-ray diffraction method *J Mol Biol* **290**, 99–117
277. Ladokhin, A. S., and White, S. H. (1999) Folding of amphipathic alpha-helices on membranes: energetics of helix formation by melittin *J Mol Biol* **285**, 1363–1369
278. Matsuzaki, K., Harada, M., Handa, T., Funakoshi, S., Fujii, N., Yajima, H. *et al.* (1989) Magainin 1-induced leakage of entrapped calcein out of negatively-charged lipid vesicles *Biochim Biophys Acta* **981**, 130–134
279. Vorontsova, O. V., Egorova, N. S., Arseniev, A. S., and Feofanov, A. V. (2011) Haemolytic and cytotoxic action of latarcin Ltc2a *Biochimie* **93**, 227–241
280. Won, A., Ruscito, A., and Ianoul, A. (2012) Imaging the membrane lytic activity of bioactive peptide latarcin 2a *Biochim Biophys Acta* **1818**, 3072–3080
281. Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A., Samsonova, O. V., Egorova, N. S., Karpunin, D. V., Pluzhnikov, K. A. *et al.* (2008) Cyto-insectotoxins, a novel class of cytolytic and insecticidal peptides from spider venom *Biochem J* **411**, 687–696
282. Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* **3**, 238–250
283. Brown, K. L., and Hancock, R. E. (2006) Cationic host defense (antimicrobial) peptides *Curr Opin Immunol* **18**, 24–30
284. Mollay, C., and Kreil, G. (1974) Enhancement of bee venom phospholipase A2 activity by melittin, direct lytic factor from cobra venom and polymyxin B *FEBS Lett* **46**, 141–144
285. Yount, N. Y., and Yeaman, M. R. (2004) Multidimensional signatures in antimicrobial peptides *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 7363–7368
286. Jung, H. J., Kim, P. I., Lee, S. K., Lee, C. W., Eu, Y. J., Lee, D. G. *et al.* (2006) Lipid membrane interaction and antimicrobial activity of GsMTx-4, an inhibitor of mechanosensitive channel *Biochem Biophys Res Commun* **340**, 633–638
287. Diaz, P., D'Suze, G., Salazar, V., Sevcik, C., Shannon, J. D., Sherman, N. E. *et al.* (2009) Antibacterial activity of six novel peptides from Tityus discrepans scorpion venom. A fluorescent probe study of microbial membrane Na+ permeability changes *Toxicon* **54**, 802–817
288. Pimenta, A. M., Rates, B., Bloch, C., Jr., Gomes, P. C., Santoro, M. M., de Lima, M. E. *et al.* (2005) Electrospray ionization quadrupole time-of-flight and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem time-of-flight mass spectrometric analyses to solve

micro-heterogeneity in post-translationally modified peptides from Phoneutria nigriventer (Aranea, Ctenidae) venom *Rapid Commun Mass Spectrom* **19**, 31–37
289. Nässel, D. R., Zandawala, M., Kawada, T., and Satake, H. (2019) Tachykinins: neuropeptides that are ancient, diverse, widespread and functionally pleiotropic *Frontiers in neuroscience* **13**, 1262
290. Arvidson, R., Kaiser, M., Lee, S. S., Urenda, J. P., Dail, C., Mohammed, H. *et al.* (2019) Parasitoid jewel wasp mounts multipronged neurochemical attack to hijack a host brain *Mol Cell Proteomics* **18**, 99–114
291. Соснина, Н. А., Голубенко, З., Ахунов, А. А., Кугаевская, Е. В., Елисеева, Ю. Е., and Н., О. В. (1990) Брадикинин-потенциирующие пептиды паука Latrodectus tredecimguttatus — ингибиторы карбоксикатепсина и препарата киненазы яда каракута *Докл Акад наук СССР* **315**, 236–239
292. Ferreira, L. A., Lucas, S. M., Alves, E. W., Hermann, V. V., Reichl, A. P., Habermehl, G. *et al.* (1998) Isolation, characterization and biological properties of two kinin-like peptides (peptide-S and peptide-r) from Scaptocosa raptoria venom *Toxicon* **36**, 31–39
293. Verano-Braga, T., Rocha-Resende, C., Silva, D. M., Ianzer, D., Martin-Eauclaire, M. F., Bougis, P. E. *et al.* (2008) Tityus serrulatus Hypotensins: a new family of peptides from scorpion venom *Biochem Biophys Res Commun* **371**, 515–520
294. Camargo, A. C., Ianzer, D., Guerreiro, J. R., and Serrano, S. M. (2012) Bradykinin-potentiating peptides: beyond captopril *Toxicon* **59**, 516–523
295. Ferreira, L. A., Alves, E. W., and Henriques, O. B. (1993) Peptide T, a novel bradykinin potentiator isolated from Tityus serrulatus scorpion venom *Toxicon* **31**, 941–947
296. Meki, A. R., Nassar, A. Y., and Rochat, H. (1995) A bradykinin-potentiating peptide (peptide K12) isolated from the venom of Egyptian scorpion Buthus occitanus *Peptides* **16**, 1359–1365
297. Pucca, M. B., Cerni, F. A., Pinheiro-Junior, E. L., Zoccal, K. F., Bordon, K. C. F., Amorim, F. G. *et al.* (2016) Non-disulfide-bridged peptides from Tityus serrulatus venom: Evidence for proline-free ACE-inhibitors *Peptides* **82**, 44–51
298. Verano-Braga, T., Figueiredo-Rezende, F., Melo, M. N., Lautner, R. Q., Gomes, E. R., Mata-Machado, L. T. *et al.* (2010) Structure-function studies of Tityus serrulatus Hypotensin-I (TsHpt-I): A new agonist of B(2) kinin receptor *Toxicon* **56**, 1162–1171
299. Volsi, E. C., Mendes, M. A., Marques, M. R., dos Santos, L. D., Santos, K. S., de Souza, B. M. *et al.* (2006) Multiple bradykinin-related peptides from the capture web of the spider Nephila clavipes (Araneae, Tetragnatidae) *Peptides* **27**, 690–697
300. Barona, J., Batista, C. V., Zamudio, F. Z., Gomez-Lagunas, F., Wanke, E., Otero, R. *et al.* (2006) Proteomic analysis of the venom and characterization of toxins specific for Na+ - and K+ -channels from the Colombian scorpion Tityus pachyurus *Biochim Biophys Acta* **1764**, 76–84
301. Batista, C. V. F., Román-González, S. A., Salas-Castillo, S. P., Zamudio, F. Z., Gómez-Lagunas, F., and Possani, L. D. (2007) Proteomic analysis of the venom from the scorpion Tityus stigmurus: biochemical and physiological comparison with other Tityus species *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **146**, 147–157
302. Melo, M. M. A., Daniele-Silva, A., Teixeira, D. G., Estrela, A. B., Melo, K. R. T., Oliveira, V. S. *et al.* (2017) Structure and in vitro activities of a Copper II-chelating anionic peptide from the venom of the scorpion Tityus stigmurus *Peptides* **94**, 91–98
303. Dias, N. B., de Souza, B. M., Cocchi, F. K., Chalkidis, H. M., Dorce, V. A. C., and Palma, M. S. (2018) Profiling the short, linear, non-disulfide bond-containing peptidome from the venom of the scorpion Tityus obscurus *J Proteomics* **170**, 70–79
304. Rodríguez de la Vega, R. C., and Possani, L. D. (2004) Current views on scorpion toxins specific for K+-channels *Toxicon* **43**, 865–875

305. Guerrero-Vargas, J. A., Mourão, C. B., Quintero-Hernández, V., Possani, L. D., and Schwartz, E. F. (2012) Identification and phylogenetic analysis of Tityus pachyurus and Tityus obscurus novel putative Na+-channel scorpion toxins *PLoS One* **7**, e30478
306. Murakami, M. T., Fernandes-Pedrosa, M. F., de Andrade, S. A., Gabdoulkhakov, A., Betzel, C., Tambourgi, D. V. *et al.* (2006) Structural insights into the catalytic mechanism of sphingomyelinases D and evolutionary relationship to glycerophosphodiester phosphodiesterases *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 323–329
307. Binford, G. J., Bodner, M. R., Cordes, M. H., Baldwin, K. L., Rynerson, M. R., Burns, S. N. *et al.* (2009) Molecular evolution, functional variation, and proposed nomenclature of the gene family that includes sphingomyelinase D in sicariid spider venoms *Mol Biol Evol* **26**, 547–566
308. Koua, D., and Kuhn-Nentwig, L. (2017) Spider neurotoxins, short linear cationic peptides and venom protein classification improved by an automated competition between exhaustive profile HMM classifiers *Toxins (Basel)* **9**, 245
309. Postic, G., Gracy, J., Périn, C., Chiche, L., and Gelly, J. C. (2018) KNOTTIN: the database of inhibitor cystine knot scaffold after 10 years, toward a systematic structure modeling *Nucleic Acids Res* **46**, D454–d458
310. Sillitoe, I., Bordin, N., Dawson, N., Waman, V. P., Ashford, P., Scholes, H. M. *et al.* (2021) CATH: increased structural coverage of functional space *Nucleic Acids Res* **49**, D266–d273
311. Andreeva, A., Kulesha, E., Gough, J., and Murzin, A. G. (2020) The SCOP database in 2020: expanded classification of representative family and superfamily domains of known protein structures *Nucleic Acids Res* **48**, D376–d382
312. Harvey, A. L. (2001) Twenty years of dendrotoxins *Toxicon* **39**, 15–26
313. Diochot, S., and Lazdunski, M. (2009) Sea anemone toxins affecting potassium channels *Prog Mol Subcell Biol* **46**, 99–122
314. Stocker, M. (2004) Ca(2+)-activated K+ channels: molecular determinants and function of the SK family *Nat Rev Neurosci* **5**, 758–770
315. Kuzmenkov, A. I., Peigneur, S., Nasburg, J. A., Mineev, K. S., Nikolaev, M. V., Pinheiro-Junior, E. L. *et al.* (2022) Apamin structure and pharmacology revisited *Front Pharmacol* **13**, 977440
316. Ascenzi, P., Bocedi, A., Bolognesi, M., Spallarossa, A., Coletta, M., De Cristofaro, R. *et al.* (2003) The bovine basic pancreatic trypsin inhibitor (Kunitz inhibitor): a milestone protein *Curr Protein Pept Sci* **4**, 231–251
317. Gurrola, G. B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A. *et al.* (1999) A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K+ channels isolated from Centruroides noxius scorpion venom *FASEB J* **13**, 953–962
318. Korolkova, Y. V., Kozlov, S. A., Lipkin, A. V., Pluzhnikov, K. A., Hadley, J. K., Filippov, A. K. *et al.* (2001) An ERG channel inhibitor from the scorpion Buthus eupeus *J Biol Chem* **276**, 9868–9876
319. Srinivasan, K. N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T. K. *et al.* (2002) kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion Heterometrus fulvipes with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity *J Biol Chem* **277**, 30040–30047
320. Chagot, B., Pimentel, C., Dai, L., Pil, J., Tytgat, J., Nakajima, T. *et al.* (2005) An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion Opisthacanthus madagascariensis *Biochem J* **388**, 263–271
321. Saucedo, A. L., Flores-Solis, D., Rodriguez de la Vega, R. C., Ramirez-Cordero, B., Hernandez-Lopez, R., Cano-Sanchez, P. *et al.* (2012) New tricks of an old pattern:

structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing *J Biol Chem* **287**, 12321–12330
322. Chen, Z., Luo, F., Feng, J., Yang, W., Zeng, D., Zhao, R. *et al.* (2013) Genomic and structural characterization of Kunitz-type peptide LmKTT-1a highlights diversity and evolution of scorpion potassium channel toxins *PLoS One* **8**, e60201
323. Chen, Z. Y., Hu, Y. T., Yang, W. S., He, Y. W., Feng, J., Wang, B. *et al.* (2012) Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family *J Biol Chem* **287**, 13813–13821
324. Chen, Z., Hu, Y., Han, S., Yin, S., He, Y., Wu, Y. *et al.* (2011) ImKTx1, a new Kv1.3 channel blocker with a unique primary structure *J Biochem Mol Toxicol* **25**, 244–251
325. Gao, B., Harvey, P. J., Craik, D. J., Ronjat, M., De Waard, M., and Zhu, S. (2013) Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold *Biosci Rep* **33**,
326. Cremonez, C. M., Maiti, M., Peigneur, S., Cassoli, J. S., Dutra, A. A., Waelkens, E. *et al.* (2016) Structural and functional elucidation of peptide Ts11 shows evidence of a novel subfamily of scorpion venom toxins *Toxins (Basel)* **8**, 288
327. Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L. D., and Maelicke, A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K+ channels by a novel scorpion toxin *Nature* **296**, 90–91
328. Possani, L. D., Martin, B. M., and 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 Research Communications* **47**, 285–289
329. Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., and Phillips, M. (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca2+-activated K+ channels from mammalian skeletal muscle *Nature* **313**, 316–318
330. Gimenez-Gallego, G., Navia, M. A., Reuben, J. P., Katz, G. M., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1988) Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 3329–3333
331. Crest, M., Jacquet, G., Gola, M., Zerrouk, H., Benslimane, A., Rochat, H. *et al.* (1992) Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca(2+)-activated K+ channels characterized from Androctonus mauretanicus mauretanicus venom *J Biol Chem* **267**, 1640–1647
332. Garcia, M. L., Garcia-Calvo, M., Hidalgo, P., Lee, A., and MacKinnon, R. (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K+ channels from Leiurus quinquestriatus var. hebraeus venom *Biochemistry* **33**, 6834–6839
333. Grishin, E. V., Korolkova, Y. V., Kozlov, S. A., Lipkin, A. V., Nosyreva, E. D., Pluzhnikov, K. A. *et al.* (1996) Structure and function of the potassium channel inhibitor from black scorpion venom *Pure Appl Chem* **68**, 2105–2109
334. Diego-Garcia, E., Abdel-Mottaleb, Y., Schwartz, E. F., de la Vega, R. C., Tytgat, J., and Possani, L. D. (2008) Cytolytic and K+ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms *Cell Mol Life Sci* **65**, 187–200
335. Anderson, C. S., MacKinnon, R., Smith, C., and Miller, C. (1988) Charybdotoxin block of single Ca2+-activated K+ channels. Effects of channel gating, voltage, and ionic strength *J Gen Physiol* **91**, 317–333
336. MacKinnon, R., and Miller, C. (1988) Mechanism of charybdotoxin block of the high-conductance, Ca2+-activated K+ channel *J Gen Physiol* **91**, 335–349
337. Miller, C. (1988) Competition for block of a Ca2(+)-activated K+ channel by charybdotoxin and tetraethylammonium *Neuron* **1**, 1003–1006
338. Park, C. S., and Miller, C. (1992) Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin *Biochemistry* **31**, 7749–7755

339. Stampe, P., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1994) Intimations of K+ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin *Biochemistry* **33**, 443–450
340. Goldstein, S. A., Pheasant, D. J., and Miller, C. (1994) The charybdotoxin receptor of a Shaker K+ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition *Neuron* **12**, 1377–1388
341. MacKinnon, R., and Miller, C. (1989) Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor *Science* **245**, 1382–1385
342. Hidalgo, P., and MacKinnon, R. (1995) Revealing the architecture of a K+ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor *Science* **268**, 307–310
343. Gross, A., and MacKinnon, R. (1996) Agitoxin footprinting the shaker potassium channel pore *Neuron* **16**, 399–406
344. Naranjo, D., and Miller, C. (1996) A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a Shaker K+ channel *Neuron* **16**, 123–130
345. Naini, A. A., and Miller, C. (1996) A symmetry-driven search for electrostatic interaction partners in charybdotoxin and a voltage-gated K+ channel *Biochemistry* **35**, 6181–6187
346. Ranganathan, R., Lewis, J. H., and MacKinnon, R. (1996) Spatial localization of the K+ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis *Neuron* **16**, 131–139
347. Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E., and Mackinnon, R. (2013) Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel *Elife* **2**, e00594
348. Lange, A., Giller, K., Hornig, S., Martin-Eauclaire, M. F., Pongs, O., Becker, S. *et al.* (2006) Toxin-induced conformational changes in a potassium channel revealed by solid-state NMR *Nature* **440**, 959–962
349. Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007) Atomic structure of a voltage-dependent K+ channel in a lipid membrane-like environment *Nature* **450**, 376–382
350. Coleman, S. K., Newcombe, J., Pryke, J., and Dolly, J. O. (1999) Subunit composition of Kv1 channels in human CNS *J Neurochem* **73**, 849–858
351. Trimmer, J. S., and Rhodes, K. J. (2004) Localization of voltage-gated ion channels in mammalian brain *Annu Rev Physiol* **66**, 477–519
352. Vacher, H., Mohapatra, D. P., and Trimmer, J. S. (2008) Localization and targeting of voltage-dependent ion channels in mammalian central neurons *Physiol Rev* **88**, 1407–1447
353. Zhu, L., Gao, B., Luo, L., and Zhu, S. (2012) Two dyad-free Shaker-type K(+) channel blockers from scorpion venom *Toxicon* **59**, 402–407
354. Shakkottai, V. G., Regaya, I., Wulff, H., Fajloun, Z., Tomita, H., Fathallah, M. *et al.* (2001) Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated K+ channel, SkCa2 *J Biol Chem* **276**, 43145–43151
355. Takacs, Z., Toups, M., Kollewe, A., Johnson, E., Cuello, L. G., Driessens, G. *et al.* (2009) A designer ligand specific for Kv1.3 channels from a scorpion neurotoxin-based library *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 22211–22216
356. Varga, Z., Gurrola-Briones, G., Papp, F., Rodriguez de la Vega, R. C., Pedraza-Alva, G., Tajhya, R. B. *et al.* (2012) Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells *Mol Pharmacol* **82**, 372–382
357. Restano-Cassulini, R., Korolkova, Y. V., Diochot, S., Gurrola, G., Guasti, L., Possani, L. D. *et al.* (2006) Species diversity and peptide toxins blocking selectivity of ether-a-go-go-related gene subfamily K+ channels in the central nervous system *Mol Pharmacol* **69**, 1673–1683

358. Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J. P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G. J. *et al.* (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion Buthus tamulus *J Biol Chem* **265**, 11083–11090
359. Beeton, C., Wulff, H., Standifer, N. E., Azam, P., Mullen, K. M., Pennington, M. W. *et al.* (2006) Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 17414–17419
360. Giangiacomo, K. M., Sugg, E. E., Garcia-Calvo, M., Leonard, R. J., McManus, O. B., Kaczorowski, G. J. *et al.* (1993) Synthetic charybdotoxin-iberiotoxin chimeric peptides define toxin binding sites on calcium-activated and voltage-dependent potassium channels *Biochemistry* **32**, 2363–2370
361. Rashid, M. H., Huq, R., Tanner, M. R., Chhabra, S., Khoo, K. K., Estrada, R. *et al.* (2014) A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTX1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases *Sci Rep* **4**, 4509
362. Lin King, J. V., Emrick, J. J., Kelly, M. J. S., Herzig, V., King, G. F., Medzihradszky, K. F. *et al.* (2019) A cell-penetrating scorpion toxin enables mode-specific modulation of TRPA1 and pain *Cell* **178**, 1362–1374 e1316
363. Swartz, K. J. (2007) Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels *Toxicon* **49**, 213–230
364. Swartz, K. J., and MacKinnon, R. (1995) An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula *Neuron* **15**, 941–949
365. Swartz, K. J., and MacKinnon, R. (1997) Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K+ channel through multiple binding sites *Neuron* **18**, 665–673
366. Islas, L. D., and Sigworth, F. J. (1999) Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels *J Gen Physiol* **114**, 723–742
367. Phillips, L. R., Milescu, M., Li-Smerin, Y., Mindell, J. A., Kim, J. I., and Swartz, K. J. (2005) Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo *Nature* **436**, 857–860
368. Ruta, V., Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., and MacKinnon, R. (2003) Functional analysis of an archaebacterial voltage-dependent K+ channel *Nature* **422**, 180–185
369. McDonough, S. I., Lampe, R. A., Keith, R. A., and Bean, B. P. (1997) Voltage-dependent inhibition of N- and P-type calcium channels by the peptide toxin omega-grammotoxin-SIA *Mol Pharmacol* **52**, 1095–1104
370. Suchyna, T. M., Johnson, J. H., Hamer, K., Leykam, J. F., Gage, D. A., Clemo, H. F. *et al.* (2000) Identification of a peptide toxin from Grammostola spatulata spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels *J Gen Physiol* **115**, 583–598
371. Siemens, J., Zhou, S., Piskorowski, R., Nikai, T., Lumpkin, E. A., Basbaum, A. I. *et al.* (2006) Spider toxins activate the capsaicin receptor to produce inflammatory pain *Nature* **444**, 208–212
372. Marvin, L., De, E., Cosette, P., Gagnon, J., Molle, G., and Lange, C. (1999) Isolation, amino acid sequence and functional assays of SGTx1. The first toxin purified from the venom of the spider scodra griseipes *Eur J Biochem* **265**, 572–579
373. Escoubas, P., Diochot, S., Célérier, M. L., Nakajima, T., and Lazdunski, M. (2002) Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies *Mol Pharmacol* **62**, 48–57
374. Xiao, Y., Tang, J., Yang, Y., Wang, M., Hu, W., Xie, J. *et al.* (2004) Jingzhaotoxin-III, a novel spider toxin inhibiting activation of voltage-gated sodium channel in rat cardiac myocytes *J Biol Chem* **279**, 26220–26226
375. Herrington, J., Zhou, Y. P., Bugianesi, R. M., Dulski, P. M., Feng, Y., Warren, V. A. *et al.* (2006) Blockers of the delayed-rectifier potassium current in pancreatic beta-cells enhance glucose-dependent insulin secretion *Diabetes* **55**, 1034–1042

376. Wang, M., Diao, J., Li, J., Tang, J., Lin, Y., Hu, W. *et al.* (2008) JZTX-IV, a unique acidic sodium channel toxin isolated from the spider Chilobrachys jingzhao *Toxicon* **52**, 871–880
377. Johnson, S. R., and Rikli, H. G. (2020) Aspartic acid isomerization characterized by high definition mass spectrometry significantly alters the bioactivity of a novel toxin from Poecilotheria *Toxins (Basel)* **12**, 207
378. Yin, K., Deuis, J. R., Dekan, Z., Jin, A. H., Alewood, P. F., King, G. F. *et al.* (2020) Addition of K22 converts spider venom peptide Pme2a from an activator to an inhibitor of Na(V)1.7 *Biomedicines* **8**,
379. Middleton, R. E., Warren, V. A., Kraus, R. L., Hwang, J. C., Liu, C. J., Dai, G. *et al.* (2002) Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels *Biochemistry* **41**, 14734–14747
380. Diochot, S., Drici, M. D., Moinier, D., Fink, M., and Lazdunski, M. (1999) Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis *Br J Pharmacol* **126**, 251–263
381. Bosmans, F., Rash, L., Zhu, S., Diochot, S., Lazdunski, M., Escoubas, P. *et al.* (2006) Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes *Mol Pharmacol* **69**, 419–429
382. Peng, K., Shu, Q., Liu, Z., and Liang, S. (2002) Function and solution structure of huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium channel antagonist from Chinese bird spider Selenocosmia huwena *J Biol Chem* **277**, 47564–47571
383. Sanguinetti, M. C., Johnson, J. H., Hammerland, L. G., Kelbaugh, P. R., Volkmann, R. A., Saccomano, N. A. *et al.* (1997) Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels *Mol Pharmacol* **51**, 491–498
384. Wang, J. M., Roh, S. H., Kim, S., Lee, C. W., Kim, J. I., and Swartz, K. J. (2004) Molecular surface of tarantula toxins interacting with voltage sensors in K(v) channels *J Gen Physiol* **123**, 455–467
385. Jung, H. J., Lee, J. Y., Kim, S. H., Eu, Y. J., Shin, S. Y., Milescu, M. *et al.* (2005) Solution structure and lipid membrane partitioning of VSTx1, an inhibitor of the KvAP potassium channel *Biochemistry* **44**, 6015–6023
386. Milescu, M., Vobecky, J., Roh, S. H., Kim, S. H., Jung, H. J., Kim, J. I. *et al.* (2007) Tarantula toxins interact with voltage sensors within lipid membranes *J Gen Physiol* **130**, 497–511
387. Posokhov, Y. O., Gottlieb, P. A., Morales, M. J., Sachs, F., and Ladokhin, A. S. (2007) Is lipid bilayer binding a common property of inhibitor cysteine knot ion-channel blockers? *Biophys J* **93**, L20–22
388. Schmidt, D., and MacKinnon, R. (2008) Voltage-dependent K+ channel gating and voltage sensor toxin sensitivity depend on the mechanical state of the lipid membrane *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19276–19281
389. Polido, G., Shi, X., Xu, D., Guo, C., Thai, R., Patterson, J. P. *et al.* (2019) Investigating the interaction of Grammostola rosea venom peptides and model lipid bilayers with solid-state NMR and electron microscopy techniques *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1861**, 151–160
390. Takahashi, H., Kim, J. I., Min, H. J., Sato, K., Swartz, K. J., and Shimada, I. (2000) Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K(+) channels: common surface features of gating modifier toxins *J Mol Biol* **297**, 771–780
391. Swartz, K. J., and MacKinnon, R. (1997) Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K+ channels *Neuron* **18**, 675–682

392. Li-Smerin, Y., and Swartz, K. J. (2000) Localization and molecular determinants of the Hanatoxin receptors on the voltage-sensing domains of a K(+) channel *J Gen Physiol* **115**, 673–684
393. Li-Smerin, Y., and Swartz, K. J. (2001) Helical structure of the COOH terminus of S3 and its contribution to the gating modifier toxin receptor in voltage-gated ion channels *J Gen Physiol* **117**, 205–218
394. Lee, H. C., Wang, J. M., and Swartz, K. J. (2003) Interaction between extracellular Hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in Kv channels *Neuron* **40**, 527–536
395. Li-Smerin, Y., and Swartz, K. J. (1998) Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca2+ and K+ channels *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 8585–8589
396. Bosmans, F., Martin-Eauclaire, M. F., and Swartz, K. J. (2008) Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels *Nature* **456**, 202–208
397. Salari, A., Vega, B. S., Milescu, L. S., and Milescu, M. (2016) Molecular interactions between tarantula toxins and low-voltage-activated calcium channels *Sci Rep* **6**, 23894
398. Lee, S. Y., and MacKinnon, R. (2004) A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom *Nature* **430**, 232–235
399. Redaelli, E., Cassulini, R. R., Silva, D. F., Clement, H., Schiavon, E., Zamudio, F. Z. *et al.* (2010) Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting Na+ and K+ ion channels *J Biol Chem* **285**, 4130–4142
400. Tao, H., Chen, J. J., Xiao, Y. C., Wu, Y. Y., Su, H. B., Li, D. *et al.* (2013) Analysis of the interaction of tarantula toxin Jingzhaotoxin-III (beta-TRTX-Cj1alpha) with the voltage sensor of Kv2.1 uncovers the molecular basis for cross-activities on Kv2.1 and Nav1.5 channels *Biochemistry* **52**, 7439–7448
401. Correnti, C. E., Gewe, M. M., Mehlin, C., Bandaranayake, A. D., Johnsen, W. A., Rupert, P. B. *et al.* (2018) Screening, large-scale production and structure-based classification of cystine-dense peptides *Nat Struct Mol Biol* **25**, 270–278
402. Wang, X., Connor, M., Smith, R., Maciejewski, M. W., Howden, M. E., Nicholson, G. M. *et al.* (2000) Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge *Nat Struct Biol* **7**, 505–513
403. Gunning, S. J., Maggio, F., Windley, M. J., Valenzuela, S. M., King, G. F., and Nicholson, G. M. (2008) The Janus-faced atracotoxins are specific blockers of invertebrate K(Ca) channels *FEBS J* **275**, 4045–4059
404. Windley, M. J., Vetter, I., Lewis, R. J., and Nicholson, G. M. (2017) Lethal effects of an insecticidal spider venom peptide involve positive allosteric modulation of insect nicotinic acetylcholine receptors *Neuropharmacology* **127**, 224–242
405. Yuan, C. H., He, Q. Y., Peng, K., Diao, J. B., Jiang, L. P., Tang, X. *et al.* (2008) Discovery of a distinct superfamily of Kunitz-type toxin (KTT) from tarantulas *PLoS One* **3**, e3414
406. Kushmerick, C., Kalapothakis, E., Beirão, P. S., Penaforte, C. L., Prado, V. F., Cruz, J. S. *et al.* (1999) Phoneutria nigriventer toxin Tx3-1 blocks A-type K+ currents controlling Ca2+ oscillation frequency in GH3 cells *J Neurochem* **72**, 1472–1481
407. Huang, P., Zhang, Y., Chen, X., Zhu, L., Yin, D., Zeng, X. *et al.* (2014) The activation effect of hainantoxin-I, a peptide toxin from the Chinese spider, Ornithoctonus hainana, on intermediate-conductance Ca2+-activated K+ channels *Toxins (Basel)* **6**, 2568–2579
408. Li, D., Xiao, Y., Hu, W., Xie, J., Bosmans, F., Tytgat, J. *et al.* (2003) Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider Selenocosmia hainana *FEBS Lett* **555**, 616–622
409. Landoulsi, Z., Miceli, F., Palmese, A., Amoresano, A., Marino, G., El Ayeb, M. *et al.* (2013) Subtype-selective activation of K(v)7 channels by AaTXKbeta(2)(-)(6)(4), a novel toxin variant from the Androctonus australis scorpion venom *Mol Pharmacol* **84**, 763–773

410. Cestele, S., and Catterall, W. A. (2000) Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels *Biochimie* **82**, 883–892
411. Billen, B., Bosmans, F., and Tytgat, J. (2008) Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels *Curr Pharm Des* **14**, 2492–2502
412. Israel, M. R., Tay, B., Deuis, J. R., and Vetter, I. (2017) Sodium channels and venom peptide pharmacology *Adv Pharmacol* **79**, 67–116
413. Li, Z., Wu, Q., and Yan, N. (2024) A structural atlas of druggable sites on Na(v) channels *Channels (Austin, Tex)* **18**, 2287832
414. Gurevitz, M., Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, R., Turkov, M. *et al.* (2007) The insecticidal potential of scorpion beta-toxins *Toxicon* **49**, 473–489
415. Rogers, J. C., Qu, Y., Tanada, T. N., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1996) Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na+ channel alpha subunit *J Biol Chem* **271**, 15950–15962
416. Wang, J., Yarov-Yarovoy, V., Kahn, R., Gordon, D., Gurevitz, M., Scheuer, T. *et al.* (2011) Mapping the receptor site for alpha-scorpion toxins on a Na+ channel voltage sensor *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 15426–15431
417. Peigneur, S., Cologna, C. T., Cremonez, C. M., Mille, B. G., Pucca, M. B., Cuypers, E. *et al.* (2015) A gamut of undiscovered electrophysiological effects produced by Tityus serrulatus toxin 1 on NaV-type isoforms *Neuropharmacology* **95**, 269–277
418. Clairfeuille, T., Cloake, A., Infield, D. T., Llongueras, J. P., Arthur, C. P., Li, Z. R. *et al.* (2019) Structural basis of alpha-scorpion toxin action on Nav channels *Science* **363**,
419. Couraud, F., Jover, E., Dubois, J. M., and Rochat, H. (1982) Two types of scorpion receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel *Toxicon* **20**, 9–16
420. Gordon, D., Karbat, I., Ilan, N., Cohen, L., Kahn, R., Gilles, N. *et al.* (2007) The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control *Toxicon* **49**, 452–472
421. Gordon, D., Martin-Eauclaire, M. F., Cestele, S., Kopeyan, C., Carlier, E., Khalifa, R. B. *et al.* (1996) Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels *J Biol Chem* **271**, 8034–8045
422. Hamon, A., Gilles, N., Sautiere, P., Martinage, A., Kopeyan, C., Ulens, C. *et al.* (2002) Characterization of scorpion alpha-like toxin group using two new toxins from the scorpion Leiurus quinquestriatus hebraeus *Eur J Biochem* **269**, 3920–3933
423. Sautiere, P., Cestele, S., Kopeyan, C., Martinage, A., Drobecq, H., Doljansky, Y. *et al.* (1998) New toxins acting on sodium channels from the scorpion Leiurus quinquestriatus hebraeus suggest a clue to mammalian vs insect selectivity *Toxicon* **36**, 1141–1154
424. Gilles, N., Chen, H., Wilson, H., Le Gall, F., Montoya, G., Molgo, J. *et al.* (2000) Scorpion alpha and alpha-like toxins differentially interact with sodium channels in mammalian CNS and periphery *Eur J Neurosci* **12**, 2823–2832
425. Leipold, E., Lu, S., Gordon, D., Hansel, A., and Heinemann, S. H. (2004) Combinatorial interaction of scorpion toxins Lqh-2, Lqh-3, and LqhalphaIT with sodium channel receptor sites-3 *Mol Pharmacol* **65**, 685–691
426. Maertens, C., Cuypers, E., Amininasab, M., Jalali, A., Vatanpour, H., and Tytgat, J. (2006) Potent modulation of the voltage-gated sodium channel Nav1.7 by OD1, a toxin from the scorpion Odonthobuthus doriae *Mol Pharmacol* **70**, 405–414
427. Deuis, J. R., Wingerd, J. S., Winter, Z., Durek, T., Dekan, Z., Sousa, S. R. *et al.* (2016) Analgesic effects of GpTx-1, PF-04856264 and CNV1014802 in a mouse model of NaV1.7-mediated pain *Toxins (Basel)* **8**, 78

428. Zhu, S., Peigneur, S., Gao, B., Lu, X., Cao, C., and Tytgat, J. (2012) Evolutionary diversification of Mesobuthus alpha-scorpion toxins affecting sodium channels *Mol Cell Proteomics* **11**, M111 012054
429. Zilberberg, N., Gordon, D., Pelhate, M., Adams, M. E., Norris, T. M., Zlotkin, E. *et al.* (1996) Functional expression and genetic alteration of an alpha scorpion neurotoxin *Biochemistry* **35**, 10215–10222
430. Zilberberg, N., Froy, O., Loret, E., Cestele, S., Arad, D., Gordon, D. *et al.* (1997) Identification of structural elements of a scorpion alpha-neurotoxin important for receptor site recognition *J Biol Chem* **272**, 14810–14816
431. Gordon, D., and Gurevitz, M. (2003) The selectivity of scorpion alpha-toxins for sodium channel subtypes is determined by subtle variations at the interacting surface *Toxicon* **41**, 125–128
432. Wang, C. G., Gilles, N., Hamon, A., Le Gall, F., Stankiewicz, M., Pelhate, M. *et al.* (2003) Exploration of the functional site of a scorpion alpha-like toxin by site-directed mutagenesis *Biochemistry* **42**, 4699–4708
433. Sun, Y. M., Bosmans, F., Zhu, R. H., Goudet, C., Xiong, Y. M., Tytgat, J. *et al.* (2003) Importance of the conserved aromatic residues in the scorpion alpha-like toxin BmK M1: the hydrophobic surface region revisited *J Biol Chem* **278**, 24125–24131
434. Guan, R. J., Xiang, Y., He, X. L., Wang, C. G., Wang, M., Zhang, Y. *et al.* (2004) Structural mechanism governing cis and trans isomeric states and an intramolecular switch for cis/trans isomerization of a non-proline peptide bond observed in crystal structures of scorpion toxins *J Mol Biol* **341**, 1189–1204
435. Liu, L. H., Bosmans, F., Maertens, C., Zhu, R. H., Wang, D. C., and Tytgat, J. (2005) Molecular basis of the mammalian potency of the scorpion alpha-like toxin, BmK M1 *FASEB J* **19**, 594–596
436. Ye, X., Bosmans, F., Li, C., Zhang, Y., Wang, D. C., and Tytgat, J. (2005) Structural basis for the voltage-gated Na+ channel selectivity of the scorpion alpha-like toxin BmK M1 *J Mol Biol* **353**, 788–803
437. Karbat, I., Kahn, R., Cohen, L., Ilan, N., Gilles, N., Corzo, G. *et al.* (2007) The unique pharmacology of the scorpion alpha-like toxin Lqh3 is associated with its flexible C-tail *FEBS J* **274**, 1918–1931
438. Karbat, I., Frolow, F., Froy, O., Gilles, N., Cohen, L., Turkov, M. *et al.* (2004) Molecular basis of the high insecticidal potency of scorpion alpha-toxins *J Biol Chem* **279**, 31679–31686
439. Kahn, R., Karbat, I., Ilan, N., Cohen, L., Sokolov, S., Catterall, W. A. *et al.* (2009) Molecular requirements for recognition of brain voltage-gated sodium channels by scorpion alpha-toxins *J Biol Chem* **284**, 20684–20691
440. Mozhayeva, G. N., Naumov, A. P., Nosyreva, E. D., and Grishin, E. V. (1980) Potential-dependent interaction of toxin from venom of the scorpion Buthus eupeus with sodium channels in myelinated fibre: voltage clamp experiments *Biochim Biophys Acta* **597**, 587–602
441. Duval, A., Malecot, C. O., Pelhate, M., and Rochat, H. (1989) Changes in Na channel properties of frog and rat skeletal muscles induced by the AaH II toxin from the scorpion Androctonus australis *Pflugers Arch* **415**, 361–371
442. Eitan, M., Fowler, E., Herrmann, R., Duval, A., Pelhate, M., and Zlotkin, E. (1990) A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action *Biochemistry* **29**, 5941–5947
443. Gilles, N., Harrison, G., Karbat, I., Gurevitz, M., Nicholson, G. M., and Gordon, D. (2002) Variations in receptor site-3 on rat brain and insect sodium channels highlighted by binding of a funnel-web spider delta-atracotoxin *Eur J Biochem* **269**, 1500–1510

444. Пашков, В. С., Хоанг, Н. А., Майоров, В. Н., and Ф., Б. В. (1986) Строение нейротоксина М9 Buthus eupeus в растворе по данным спектроскопии 1Н-ЯМР *Биоорган химия* **12**, 1306–1316
445. Pashkov, V. S., Maiorov, V. N., Bystrov, V. F., Hoang, A. N., Volkova, T. M., and Grishin, E. V. (1988) Solution spatial structure of 'long'neurotoxin M9 from the scorpion Buthus eupeus by 1H-NMR spectroscopy *Biophys Chem* **31**, 121–131
446. Pal, D., and Chakrabarti, P. (1999) Cis peptide bonds in proteins: residues involved, their conformations, interactions and locations *J Mol Biol* **294**, 271–288
447. Sun, Y. M., Liu, W., Zhu, R. H., Goudet, C., Tytgat, J., and Wang, D. C. (2002) Roles of disulfide bridges in scorpion toxin BmK M1 analyzed by mutagenesis *J Pept Res* **60**, 247–256
448. Gur, M., Kahn, R., Karbat, I., Regev, N., Wang, J., Catterall, W. A. *et al.* (2011) Elucidation of the molecular basis of selective recognition uncovers the interaction site for the core domain of scorpion alpha-toxins on sodium channels *J Biol Chem* **286**, 35209–35217
449. Shen, H., Zhou, Q., Pan, X., Li, Z., Wu, J., and Yan, N. (2017) Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution *Science* **355**,
450. Capes, D. L., Goldschen-Ohm, M. P., Arcisio-Miranda, M., Bezanilla, F., and Chanda, B. (2013) Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels *J Gen Physiol* **142**, 101–112
451. Jiang, D., Tonggu, L., Gamal El-Din, T. M., Banh, R., Pomès, R., Zheng, N. *et al.* (2021) Structural basis for voltage-sensor trapping of the cardiac sodium channel by a deathstalker scorpion toxin *Nat Commun* **12**, 128
452. De Lima, M. E., Martin, M. F., Diniz, C. R., and Rochat, H. (1986) Tityus serrulatus toxin VII bears pharmacological properties of both beta-toxin and insect toxin from scorpion venoms *Biochem Biophys Res Commun* **139**, 296–302
453. Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, B. M., Gurrola-Briones, G., Hérion, P., and Possani, L. D. (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion Centruroides noxius Hoffmann *Eur J Biochem* **204**, 281–292
454. Zlotkin, E., Fraenkel, G., Miranda, F., and Lissitzky, S. (1971) The effect of scorpion venom on blowfly larvae--a new method for the evaluation of scorpion venoms potency *Toxicon* **9**, 1–8
455. Karbat, I., Cohen, L., Gilles, N., Gordon, D., and Gurevitz, M. (2004) Conversion of a scorpion toxin agonist into an antagonist highlights an acidic residue involved in voltage sensor trapping during activation of neuronal Na+ channels *Faseb j* **18**, 683–689
456. Karbat, I., Turkov, M., Cohen, L., Kahn, R., Gordon, D., Gurevitz, M. *et al.* (2007) X-ray structure and mutagenesis of the scorpion depressant toxin LqhIT2 reveals key determinants crucial for activity and anti-insect selectivity *J Mol Biol* **366**, 586–601
457. Gordon, D., Jover, E., Couraud, F., and Zlotkin, E. (1984) The binding of the insect selective neurotoxin (AaIT) from scorpion venom to locust synaptosomal membranes *Biochim Biophys Acta* **778**, 349–358
458. Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (1998) Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II *Neuron* **21**, 919–931
459. Cahalan, M. D. (1975) Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibres by Centruroides sculpturatus scorpion venom *J Physiol* **244**, 511–534
460. De Lima, M. E., Martin-Eauclaire, M. F., Hue, B., Loret, E., Diniz, C. R., and Rochat, H. (1989) On the binding of two scorpion toxins to the central nervous system of the cockroach Periplaneta americana *Insect Biochemistry* **19**, 413–422

461. Gordon, D., Moskowitz, H., Eitan, M., Warner, C., Catterall, W. A., and Zlotkin, E. (1992) Localization of receptor sites for insect-selective toxins on sodium channels by site-directed antibodies *Biochemistry* **31**, 7622–7628
462. Moskowitz, H., Herrmann, R., Zlotkin, E., and Gordon, D. (1994) Variability among insect sodium channels revealed by selective neurotoxins *Insect Biochem Mol Biol* **24**, 13–19
463. Camargos, T. S., Bosmans, F., Rego, S. C., Mourão, C. B., and Schwartz, E. F. (2015) The scorpion toxin Tf2 from Tityus fasciolatus promotes Nav1.3 opening *PLoS One* **10**, e0128578
464. Almassy, R. J., Fontecilla-Camps, J. C., Suddath, F. L., and Bugg, C. E. (1983) Structure of variant-3 scorpion neurotoxin from Centruroides sculpturatus Ewing, refined at 1·8 Å resolution *J Mol Biol* **170**, 497–527
465. Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Ilan, N., Benveniste, M., Gordon, D. *et al.* (2005) Common features in the functional surface of scorpion beta-toxins and elements that confer specificity for insect and mammalian voltage-gated sodium channels *J Biol Chem* **280**, 5045–5053
466. Cohen, L., Karbat, I., Gilles, N., Froy, O., Corzo, G., Angelovici, R. *et al.* (2004) Dissection of the functional surface of an anti-insect excitatory toxin illuminates a putative "hot spot" common to all scorpion beta-toxins affecting Na+ channels *J Biol Chem* **279**, 8206–8211
467. Oren, D. A., Froy, O., Amit, E., Kleinberger-Doron, N., Gurevitz, M., and Shaanan, B. (1998) An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alpha helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels *Structure (London, England : 1993)* **6**, 1095–1103
468. Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Qu, Y., Sampieri, F., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2006) Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin *J Biol Chem* **281**, 21332–21344
469. Meves, H., Rubly, N., and Watt, D. D. (1987) Gating current experiments on frog nodes of Ranvier treated with Centruroides sculpturatus toxins or aconitine *Pflugers Arch* **409**, 381–393
470. Zhang, J. Z., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., Karbat, I., Cohen, L., Gordon, D. *et al.* (2011) Structure-function map of the receptor site for β-scorpion toxins in domain II of voltage-gated sodium channels *J Biol Chem* **286**, 33641–33651
471. Zhang, J. Z., Yarov-Yarovoy, V., Scheuer, T., Karbat, I., Cohen, L., Gordon, D. *et al.* (2012) Mapping the interaction site for a β-scorpion toxin in the pore module of domain III of voltage-gated Na(+) channels *J Biol Chem* **287**, 30719–30728
472. Fan, X., Huang, J., Yang, L., Chen, J., Wang, H., Huang, X. *et al.* (2026) Diverse binding poses of agonistic neurotoxins on human Nav1.6 *LangTaoSha Preprint Server* 10.65215/LTSpreprints.2026.05.05.000226
473. Durek, T., Vetter, I., Wang, C. I., Motin, L., Knapp, O., Adams, D. J. *et al.* (2013) Chemical engineering and structural and pharmacological characterization of the alpha-scorpion toxin OD1 *ACS Chem Biol* **8**, 1215–1222
474. Leipold, E., Borges, A., and Heinemann, S. H. (2012) Scorpion β-toxin interference with NaV channel voltage sensor gives rise to excitatory and depressant modes *J Gen Physiol* **139**, 305–319
475. Inceoglu, B., Lango, J., Wu, J., Hawkins, P., Southern, J., and Hammock, B. D. (2001) Isolation and characterization of a novel type of neurotoxic peptide from the venom of the South African scorpion Parabuthus transvaalicus (Buthidae) *Eur J Biochem* **268**, 5407–5413

476. Inceoglu, A. B., Hayashida, Y., Lango, J., Ishida, A. T., and Hammock, B. D. (2002) A single charged surface residue modifies the activity of ikitoxin, a beta-type Na+ channel toxin from Parabuthus transvaalicus *Eur J Biochem* **269**, 5369–5376
477. Inceoglu, B., Lango, J., Pessah, I. N., and Hammock, B. D. (2005) Three structurally related, highly potent, peptides from the venom of Parabuthus transvaalicus possess divergent biological activity *Toxicon* **45**, 727–733
478. Martin-Eauclaire, M. F., Ceard, B., Bosmans, F., Rosso, J. P., Tytgat, J., and Bougis, P. E. (2005) New "Birtoxin analogs" from Androctonus australis venom *Biochem Biophys Res Commun* **333**, 524–530
479. Valdez-Cruz, N. A., Batista, C. V., Zamudio, F. Z., Bosmans, F., Tytgat, J., and Possani, L. D. (2004) Phaiodotoxin, a novel structural class of insect-toxin isolated from the venom of the Mexican scorpion Anuroctonus phaiodactylus *Eur J Biochem* **271**, 4753–4761
480. Martin-Moutot, N., Mansuelle, P., Alcaraz, G., Dos Santos, R. G., Cordeiro, M. N., De Lima, M. E. *et al.* (2006) Phoneutria nigriventer toxin 1: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with micro conotoxin binding sites *Mol Pharmacol* **69**, 1931–1937
481. Sheumack, D. D., Claassens, R., Whiteley, N. M., and Howden, M. E. (1985) Complete amino acid sequence of a new type of lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider Atrax robustus *FEBS Lett* **181**, 154–156
482. Brown, M. R., Sheumack, D. D., Tyler, M. I., and Howden, M. E. (1988) Amino acid sequence of versutoxin, a lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider Atrax versutus *Biochem J* **250**, 401–405
483. Sheumack, D. D., Baldo, B. A., Carroll, P. R., Hampson, F., Howden, M. E., and Skorulis, A. (1984) A comparative study of properties and toxic constituents of funnel web spider (Atrax) venoms *Comparative biochemistry and physiology C, Comparative pharmacology and toxicology* **78**, 55–68
484. Little, M. J., Wilson, H., Zappia, C., Cestèle, S., Tyler, M. I., Martin-Eauclaire, M. F. *et al.* (1998) Delta-atracotoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion alpha-toxin binding on both rat brain and insect sodium channels *FEBS Lett* **439**, 246–252
485. Nicholson, G. M., Little, M. J., Tyler, M., and Narahashi, T. (1996) Selective alteration of sodium channel gating by Australian funnel-web spider toxins *Toxicon* **34**, 1443–1453
486. Corzo, G., Gilles, N., Satake, H., Villegas, E., Dai, L., Nakajima, T. *et al.* (2003) Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider Macrothele gigas that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel *FEBS Lett* **547**, 43–50
487. Yamaji, N., Little, M. J., Nishio, H., Billen, B., Villegas, E., Nishiuchi, Y. *et al.* (2009) Synthesis, solution structure, and phylum selectivity of a spider delta-toxin that slows inactivation of specific voltage-gated sodium channel subtypes *J Biol Chem* **284**, 24568–24582
488. Gunning, S. J., Chong, Y., Khalife, A. A., Hains, P. G., Broady, K. W., and Nicholson, G. M. (2003) Isolation of delta-missulenatoxin-Mb1a, the major vertebrate-active spider delta-toxin from the venom of Missulena bradleyi (Actinopodidae) *FEBS Lett* **554**, 211–218
489. Hedin, M., Derkarabetian, S., Ramírez, M. J., Vink, C., and Bond, J. E. (2018) Phylogenomic reclassification of the world's most venomous spiders (Mygalomorphae, Atracinae), with implications for venom evolution *Sci Rep* **8**, 1636
490. Isbister, G. K. (2004) Mouse spider bites (Missulena spp.) and their medical importance. A systematic review *The Medical journal of Australia* **180**, 225–227
491. Herzig, V., Khalife, A. A., Chong, Y., Isbister, G. K., Currie, B. J., Churchill, T. B. *et al.* (2008) Intersexual variations in Northern (Missulena pruinosa) and Eastern (M. bradleyi) mouse spider venom *Toxicon* **51**, 1167–1177

492. Cordeiro Mdo, N., Diniz, C. R., Valentim Ado, C., von Eickstedt, V. R., Gilroy, J., and Richardson, M. (1992) The purification and amino acid sequences of four Tx2 neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider Phoneutria nigriventer (Keys) *FEBS Lett* **310**, 153–156
493. Matavel, A., Fleury, C., Oliveira, L. C., Molina, F., de Lima, M. E., Cruz, J. S. *et al.* (2009) Structure and activity analysis of two spider toxins that alter sodium channel inactivation kinetics *Biochemistry* **48**, 3078–3088
494. Silva, C. N., Nunes, K. P., Torres, F. S., Cassoli, J. S., Santos, D. M., Almeida Fde, M. *et al.* (2015) PnPP-19, a synthetic and nontoxic peptide designed from a Phoneutria nigriventer toxin, potentiates erectile function via NO/cGMP *The Journal of urology* **194**, 1481–1490
495. Yonamine, C. M., Troncone, L. R., and Camillo, M. A. (2004) Blockade of neuronal nitric oxide synthase abolishes the toxic effects of Tx2-5, a lethal Phoneutria nigriventer spider toxin *Toxicon* **44**, 169–172
496. Nunes, K. P., Costa-Gonçalves, A., Lanza, L. F., Cortes, S. F., Cordeiro, M. N., Richardson, M. *et al.* (2008) Tx2-6 toxin of the Phoneutria nigriventer spider potentiates rat erectile function *Toxicon* **51**, 1197–1206
497. Figueiredo, S. G., Garcia, M. E., Valentim, A. C., Cordeiro, M. N., Diniz, C. R., and Richardson, M. (1995) Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4(6-1) from the venom of the 'armed' spider Phoneutria nigriventer (Keys) *Toxicon* **33**, 83–93
498. de Figueiredo, S. G., de Lima, M. E., Nascimento Cordeiro, M., Diniz, C. R., Patten, D., Halliwell, R. F. *et al.* (2001) Purification and amino acid sequence of a highly insecticidal toxin from the venom of the brazilian spider Phoneutria nigriventer which inhibits NMDA-evoked currents in rat hippocampal neurones *Toxicon* **39**, 309–317
499. de Lima, M. E., Stankiewicz, M., Hamon, A., de Figueiredo, S. G., Cordeiro, M. N., Diniz, C. R. *et al.* (2002) The toxin Tx4(6-1) from the spider Phoneutria nigriventer slows down Na(+) current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3 *J Insect Physiol* **48**, 53–61
500. Paiva, A. L., Matavel, A., Peigneur, S., Cordeiro, M. N., Tytgat, J., Diniz, M. R. *et al.* (2016) Differential effects of the recombinant toxin PnTx4(5-5) from the spider Phoneutria nigriventer on mammalian and insect sodium channels *Biochimie* **121**, 326–335
501. Xiao, Y., Tang, J., Hu, W., Xie, J., Maertens, C., Tytgat, J. *et al.* (2005) Jingzhaotoxin-I, a novel spider neurotoxin preferentially inhibiting cardiac sodium channel inactivation *J Biol Chem* **280**, 12069–12076
502. Wang, M., Liu, Q., Luo, H., Li, J., Tang, J., Xiao, Y. *et al.* (2008) Jingzhaotoxin-II, a novel tarantula toxin preferentially targets rat cardiac sodium channel *Biochem Pharmacol* **76**, 1716–1727
503. Huang, Y., Zhou, X., Tang, C., Zhang, Y., Tao, H., Chen, P. *et al.* (2015) Molecular basis of the inhibition of the fast inactivation of voltage-gated sodium channel Nav1.5 by tarantula toxin Jingzhaotoxin-II *Peptides* **68**, 175–182
504. Tao, H., Chen, X., Lu, M., Wu, Y., Deng, M., Zeng, X. *et al.* (2016) Molecular determinant for the tarantula toxin Jingzhaotoxin-I slowing the fast inactivation of voltage-gated sodium channels *Toxicon* **111**, 13–21
505. Tao, H., Wu, Y., Deng, M., He, J., Wang, M., Xiao, Y. *et al.* (2013) Molecular determinants for the tarantula toxin jingzhaotoxin-I interacting with potassium channel Kv2.1 *Toxicon* **63**, 129–136
506. Osteen, J. D., Herzig, V., Gilchrist, J., Emrick, J. J., Zhang, C., Wang, X. *et al.* (2016) Selective spider toxins reveal a role for the Nav1.1 channel in mechanical pain *Nature* **534**, 494–499

507. Xiao, Y., Blumenthal, K., Jackson, J. O., 2nd, Liang, S., and Cummins, T. R. (2010) The tarantula toxins ProTx-II and huwentoxin-IV differentially interact with human Nav1.7 voltage sensors to inhibit channel activation and inactivation *Mol Pharmacol* **78**, 1124–1134
508. Xiao, Y., Bingham, J. P., Zhu, W., Moczydlowski, E., Liang, S., and Cummins, T. R. (2008) Tarantula huwentoxin-IV inhibits neuronal sodium channels by binding to receptor site 4 and trapping the domain ii voltage sensor in the closed configuration *J Biol Chem* **283**, 27300–27313
509. Sokolov, S., Kraus, R. L., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2008) Inhibition of sodium channel gating by trapping the domain II voltage sensor with protoxin II *Mol Pharmacol* **73**, 1020–1028
510. Schmalhofer, W. A., Calhoun, J., Burrows, R., Bailey, T., Kohler, M. G., Weinglass, A. B. *et al.* (2008) ProTx-II, a selective inhibitor of NaV1.7 sodium channels, blocks action potential propagation in nociceptors *Mol Pharmacol* **74**, 1476–1484
511. Gui, J., Liu, B., Cao, G., Lipchik, A. M., Perez, M., Dekan, Z. *et al.* (2014) A tarantula-venom peptide antagonizes the TRPA1 nociceptor ion channel by binding to the S1-S4 gating domain *Current biology : CB* **24**, 473–483
512. Agwa, A. J., Peigneur, S., Chow, C. Y., Lawrence, N., Craik, D. J., Tytgat, J. *et al.* (2018) Gating modifier toxins isolated from spider venom: Modulation of voltage-gated sodium channels and the role of lipid membranes *J Biol Chem* **293**, 9041–9052
513. Milescu, M., Bosmans, F., Lee, S., Alabi, A. A., Kim, J. I., and Swartz, K. J. (2009) Interactions between lipids and voltage sensor paddles detected with tarantula toxins *Nat Struct Mol Biol* **16**, 1080–1085
514. Agwa, A. J., Henriques, S. T., and Schroeder, C. I. (2017) Gating modifier toxin interactions with ion channels and lipid bilayers: Is the trimolecular complex real? *Neuropharmacology* **127**, 32–45
515. Xiao, Y., Luo, X., Kuang, F., Deng, M., Wang, M., Zeng, X. *et al.* (2008) Synthesis and characterization of huwentoxin-IV, a neurotoxin inhibiting central neuronal sodium channels *Toxicon* **51**, 230–239
516. Xu, H., Li, T., Rohou, A., Arthur, C. P., Tzakoniati, F., Wong, E. *et al.* (2019) Structural basis of Nav1.7 inhibition by a gating-modifier spider toxin *Cell* **176**, 702–715 e714
517. Ahuja, S., Mukund, S., Deng, L., Khakh, K., Chang, E., Ho, H. *et al.* (2015) Structural basis of Nav1.7 inhibition by an isoform-selective small-molecule antagonist *Science* **350**, aac5464
518. Shen, H., Liu, D., Wu, K., Lei, J., and Yan, N. (2019) Structures of human Na(v)1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins *Science* **363**, 1303–1308
519. Fan, X., Chen, J., Huang, X., Hou, Z., Xie, Y., Li, Z. *et al.* (2025) Phrixotoxin-3 binds to three distinct antagonistic sites on human Na(v)1.6 *Cell Res* **35**, 610–613
520. Neumann, B., McCarthy, S., and Gonen, S. (2025) Structural basis of inhibition of human Na(V)1.8 by the tarantula venom peptide Protoxin-I *Nat Commun* **16**, 1459
521. Prikhod'ko, G. G., Robson, M., Warmke, J. W., Cohen, C. J., Smith, M. M., Wang, P. *et al.* (1996) Properties of three baculovirus-expressing genes that encode insect-selective toxins: μ-Aga-IV, As II, and Sh I *Biological Control* **7**, 236–244
522. Adams, M. E., Herold, E. E., and Venema, V. J. (1989) Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom *Journal of comparative physiology A, Sensory, neural, and behavioral physiology* **164**, 333–342
523. Stapleton, A., Blankenship, D. T., Ackermann, B. L., Chen, T. M., Gorder, G. W., Manley, G. D. *et al.* (1990) Curtatoxins. Neurotoxic insecticidal polypeptides isolated from the funnel-web spider Hololena curta *J Biol Chem* **265**, 2054–2059
524. Corzo, G., Escoubas, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Kristensen, C. P., and Nakajima, T. (2000) Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-palutoxins

IT, novel insecticidal toxins from the spider Paracoelotes luctuosus (Amaurobiidae) *Eur J Biochem* **267**, 5783–5795
525. Ferrat, G., Bosmans, F., Tytgat, J., Pimentel, C., Chagot, B., Gilles, N. *et al.* (2005) Solution structure of two insect-specific spider toxins and their pharmacological interaction with the insect voltage-gated Na+ channel *Proteins* **59**, 368–379
526. Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Karbat, I., Gordon, D., Gurevitz, M. *et al.* (2005) A spider toxin that induces a typical effect of scorpion alpha-toxins but competes with beta-toxins on binding to insect sodium channels *Biochemistry* **44**, 1542–1549
527. Omecinsky, D. O., Holub, K. E., Adams, M. E., and Reily, M. D. (1996) Three-dimensional structure analysis of mu-agatoxins: further evidence for common motifs among neurotoxins with diverse ion channel specificities *Biochemistry* **35**, 2836–2844
528. Corzo, G., Sabo, J. K., Bosmans, F., Billen, B., Villegas, E., Tytgat, J. *et al.* (2007) Solution structure and alanine scan of a spider toxin that affects the activation of mammalian voltage-gated sodium channels *J Biol Chem* **282**, 4643–4652
529. Zhou, X., Ma, T., Yang, L., Peng, S., Li, L., Wang, Z. *et al.* (2020) Spider venom-derived peptide induces hyperalgesia in Na(v)1.7 knockout mice by activating Na(v)1.9 channels *Nat Commun* **11**, 2293
530. Olivera, B. M. (2021) A serendipitous path to pharmacology *Annual review of pharmacology and toxicology* **61**, 9–23
531. Lampe, R. A., Defeo, P. A., Davison, M. D., Young, J., Herman, J. L., Spreen, R. C. *et al.* (1993) Isolation and pharmacological characterization of omega-grammotoxin SIA, a novel peptide inhibitor of neuronal voltage-sensitive calcium channel responses *Mol Pharmacol* **44**, 451–460
532. Takeuchi, K., Park, E., Lee, C., Kim, J., Takahashi, H., Swartz, K. *et al.* (2002) Solution structure of omega-grammotoxin SIA, a gating modifier of P/Q and N-type Ca(2+) channel *J Mol Biol* **321**, 517–526
533. Ohkubo, T., Yamazaki, J., and Kitamura, K. (2010) Tarantula toxin ProTx-I differentiates between human T-type voltage-gated Ca2+ Channels Cav3.1 and Cav3.2 *Journal of pharmacological sciences* **112**, 452–458
534. Bladen, C., Hamid, J., Souza, I. A., and Zamponi, G. W. (2014) Block of T-type calcium channels by protoxins I and II *Molecular brain* **7**, 36
535. Chuang, R. S., Jaffe, H., Cribbs, L., Perez-Reyes, E., and Swartz, K. J. (1998) Inhibition of T-type voltage-gated calcium channels by a new scorpion toxin *Nat Neurosci* **1**, 668–674
536. Sidach, S. S., and Mintz, I. M. (2002) Kurtoxin, a gating modifier of neuronal high- and low-threshold ca channels *J Neurosci* **22**, 2023–2034
537. Bindokas, V. P., Venema, V. J., and Adams, M. E. (1991) Differential antagonism of transmitter release by subtypes of omega-agatoxins *Journal of neurophysiology* **66**, 590–601
538. Venema, V. J., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Hathaway, G. M., and Adams, M. E. (1992) Antagonism of synaptosomal calcium channels by subtypes of omega-agatoxins *J Biol Chem* **267**, 2610–2615
539. Mintz, I. M., Venema, V. J., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Bean, B. P., and Adams, M. E. (1992) P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVA *Nature* **355**, 827–829
540. Ertel, E. A., Warren, V. A., Adams, M. E., Griffin, P. R., Cohen, C. J., and Smith, M. M. (1994) Type III omega-agatoxins: a family of probes for similar binding sites on L- and N-type calcium channels *Biochemistry* **33**, 5098–5108
541. Mintz, I. M., Venema, V. J., Adams, M. E., and Bean, B. P. (1991) Inhibition of N- and L-type Ca2+ channels by the spider venom toxin omega-Aga-IIIA *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 6628–6631

542. Mintz, I. M. (1994) Block of Ca channels in rat central neurons by the spider toxin omega-Aga-IIIA *J Neurosci* **14**, 2844–2853
543. Adams, M. E., Mintz, I. M., Reily, M. D., Thanabal, V., and Bean, B. P. (1993) Structure and properties of omega-agatoxin IVB, a new antagonist of P-type calcium channels *Mol Pharmacol* **44**, 681–688
544. Reily, M. D., Holub, K. E., Gray, W. R., Norris, T. M., and Adams, M. E. (1994) Structure-activity relationships for P-type calcium channel-selective omega-agatoxins *Nat Struct Biol* **1**, 853–856
545. Bourinet, E., Soong, T. W., Sutton, K., Slaymaker, S., Mathews, E., Monteil, A. *et al.* (1999) Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels *Nat Neurosci* **2**, 407–415
546. Reily, M. D., Thanabal, V., and Adams, M. E. (1995) The solution structure of omega-Aga-IVB, a P-type calcium channel antagonist from venom of the funnel web spider, Agelenopsis aperta *Journal of biomolecular NMR* **5**, 122–132
547. Kim, J. I., Konishi, S., Iwai, H., Kohno, T., Gouda, H., Shimada, I. *et al.* (1995) Three-dimensional solution structure of the calcium channel antagonist omega-agatoxin IVA: consensus molecular folding of calcium channel blockers *J Mol Biol* **250**, 659–671
548. Gomez, M. V. (2016) Reply to the letter "Create guidelines for characterization of venom peptides" from Dr. Volker Herzig *Toxins (Basel)* **8**, 253
549. Adams, M. E., Myers, R. A., Imperial, J. S., and Olivera, B. M. (1993) Toxityping rat brain calcium channels with omega-toxins from spider and cone snail venoms *Biochemistry* **32**, 12566–12570
550. McDonough, S. I., Boland, L. M., Mintz, I. M., and Bean, B. P. (2002) Interactions among toxins that inhibit N-type and P-type calcium channels *J Gen Physiol* **119**, 313–328
551. Ellinor, P. T., Zhang, J. F., Horne, W. A., and Tsien, R. W. (1994) Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin *Nature* **372**, 272–275
552. Mintz, I. M., Adams, M. E., and Bean, B. P. (1992) P-type calcium channels in rat central and peripheral neurons *Neuron* **9**, 85–95
553. McDonough, S. I., Mintz, I. M., and Bean, B. P. (1997) Alteration of P-type calcium channel gating by the spider toxin omega-Aga-IVA *Biophys J* **72**, 2117–2128
554. Li, Z., Cong, Y., Wu, T., Wang, T., Lou, X., Yang, X. *et al.* (2024) Structural basis for different omega-agatoxin IVA sensitivities of the P-type and Q-type Ca(v)2.1 channels *Cell Res* **34**, 455–457
555. Winterfield, J. R., and Swartz, K. J. (2000) A hot spot for the interaction of gating modifier toxins with voltage-dependent ion channels *J Gen Physiol* **116**, 637–644
556. Peigneur, S., de Lima, M. E., and Tytgat, J. (2018) Phoneutria nigriventer venom: A pharmacological treasure *Toxicon* **151**, 96–110
557. Kalapothakis, E., Penaforte, C. L., Leão, R. M., Cruz, J. S., Prado, V. F., Cordeiro, M. N. *et al.* (1998) Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (Phoneutria nigriventer) *Toxicon* **36**, 1971–1980
558. Leão, R. M., Cruz, J. S., Diniz, C. R., Cordeiro, M. N., and Beirão, P. S. (2000) Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-phoneutria nigriventer Tx3-3 peptide toxin *Neuropharmacology* **39**, 1756–1767
559. Dos Santos, R. G., Van Renterghem, C., Martin-Moutot, N., Mansuelle, P., Cordeiro, M. N., Diniz, C. R. *et al.* (2002) Phoneutria nigriventer omega-phonetoxin IIA blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with omega-conotoxin-binding sites *J Biol Chem* **277**, 13856–13862
560. Vieira, L. B., Kushmerick, C., Hildebrand, M. E., Garcia, E., Stea, A., Cordeiro, M. N. *et al.* (2005) Inhibition of high voltage-activated calcium channels by spider toxin PnTx3-6 *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 1370–1377

561. Fletcher, J. I., Smith, R., O'Donoghue, S. I., Nilges, M., Connor, M., Howden, M. E. *et al.* (1997) The structure of a novel insecticidal neurotoxin, omega-atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider *Nat Struct Biol* **4**, 559–566
562. Wang, X., Smith, R., Fletcher, J. I., Wilson, H., Wood, C. J., Howden, M. E. *et al.* (1999) Structure-function studies of omega-atracotoxin, a potent antagonist of insect voltage-gated calcium channels *Eur J Biochem* **264**, 488–494
563. Tedford, H. W., Gilles, N., Ménez, A., Doering, C. J., Zamponi, G. W., and King, G. F. (2004) Scanning mutagenesis of omega-atracotoxin-Hv1a reveals a spatially restricted epitope that confers selective activity against insect calcium channels *J Biol Chem* **279**, 44133–44140
564. Chong, Y., Hayes, J. L., Sollod, B., Wen, S., Wilson, D. T., Hains, P. G. *et al.* (2007) The omega-atracotoxins: selective blockers of insect M-LVA and HVA calcium channels *Biochem Pharmacol* **74**, 623–638
565. Guo, S., Herzig, V., and King, G. F. (2018) Dipteran toxicity assays for determining the oral insecticidal activity of venoms and toxins *Toxicon* **150**, 297–303
566. Wang, X. H., Connor, M., Wilson, D., Wilson, H. I., Nicholson, G. M., Smith, R. *et al.* (2001) Discovery and structure of a potent and highly specific blocker of insect calcium channels *J Biol Chem* **276**, 40306–40312
567. Chambers, C., Cutler, P., Huang, Y. H., Goodchild, J. A., Blythe, J., Wang, C. K. *et al.* (2019) Insecticidal spider toxins are high affinity positive allosteric modulators of the nicotinic acetylcholine receptor *FEBS Lett* **593**, 1336–1350
568. Xiao, L., Gurrola, G. B., Zhang, J., Valdivia, C. R., SanMartin, M., Zamudio, F. Z. *et al.* (2016) Structure-function relationships of peptides forming the calcin family of ryanodine receptor ligands *J Gen Physiol* **147**, 375–394
569. Zamudio, F. Z., Gurrola, G. B., Arévalo, C., Sreekumar, R., Walker, J. W., Valdivia, H. H. *et al.* (1997) Primary structure and synthesis of Imperatoxin A (IpTx(a)), a peptide activator of Ca2+ release channels/ryanodine receptors *FEBS Lett* **405**, 385–389
570. Tripathy, A., Resch, W., Xu, L., Valdivia, H. H., and Meissner, G. (1998) Imperatoxin A induces subconductance states in Ca2+ release channels (ryanodine receptors) of cardiac and skeletal muscle *J Gen Physiol* **111**, 679–690
571. Nabhani, T., Zhu, X., Simeoni, I., Sorrentino, V., Valdivia, H. H., and García, J. (2002) Imperatoxin a enhances Ca(2+) release in developing skeletal muscle containing ryanodine receptor type 3 *Biophys J* **82**, 1319–1328
572. Sutko, J. L., Airey, J. A., Welch, W., and Ruest, L. (1997) The pharmacology of ryanodine and related compounds *Pharmacol Rev* **49**, 53–98
573. Estève, E., Mabrouk, K., Dupuis, A., Smida-Rezgui, S., Altafaj, X., Grunwald, D. *et al.* (2005) Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane *J Biol Chem* **280**, 12833–12839
574. Schwartz, E. F., Capes, E. M., Diego-García, E., Zamudio, F. Z., Fuentes, O., Possani, L. D. *et al.* (2009) Characterization of hadrucalcin, a peptide from Hadrurus gertschi scorpion venom with pharmacological activity on ryanodine receptors *Br J Pharmacol* **157**, 392–403
575. Peraro, L., and Kritzer, J. A. (2018) Emerging methods and design principles for cell-penetrant peptides *Angewandte Chemie (International ed in English)* **57**, 11868–11881
576. Lee, C. W., Lee, E. H., Takeuchi, K., Takahashi, H., Shimada, I., Sato, K. *et al.* (2004) Molecular basis of the high-affinity activation of type 1 ryanodine receptors by imperatoxin A *Biochem J* **377**, 385–394
577. Mosbah, A., Kharrat, R., Fajloun, Z., Renisio, J. G., Blanc, E., Sabatier, J. M. *et al.* (2000) A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel *Proteins* **40**, 436–442

578. Estève, E., Smida-Rezgui, S., Sarkozi, S., Szegedi, C., Regaya, I., Chen, L. *et al.* (2003) Critical amino acid residues determine the binding affinity and the Ca2+ release efficacy of maurocalcine in skeletal muscle cells *J Biol Chem* **278**, 37822–37831
579. Mabrouk, K., Ram, N., Boisseau, S., Strappazzon, F., Rehaim, A., Sadoul, R. *et al.* (2007) Critical amino acid residues of maurocalcine involved in pharmacology, lipid interaction and cell penetration *Biochim Biophys Acta* **1768**, 2528–2540
580. Samsó, M., Trujillo, R., Gurrola, G. B., Valdivia, H. H., and Wagenknecht, T. (1999) Three-dimensional location of the imperatoxin A binding site on the ryanodine receptor *The Journal of cell biology* **146**, 493–499
581. Chiu, I. M., Heesters, B. A., Ghasemlou, N., Von Hehn, C. A., Zhao, F., Tran, J. *et al.* (2013) Bacteria activate sensory neurons that modulate pain and inflammation *Nature* **501**, 52–57
582. Dekan, Z., Headey, S. J., Scanlon, M., Baldo, B. A., Lee, T. H., Aguilar, M. I. *et al.* (2017) Δ-Myrtoxin-Mp1a is a helical heterodimer from the venom of the jack jumper ant that has antimicrobial, membrane-disrupting, and nociceptive activities *Angewandte Chemie (International ed in English)* **56**, 8495–8499
583. Мирошников, А. И., Снежкова, Л. Г., Назимов, И. В., Решетова, О. И., Розынов, Б. В., and Гущин, И. С. (1981) Структура и свойства гистаминвысвобождающих пептидов из яда шершня *Vespa orientalis Биоорган химия* **7**, 1467–1477
584. Buku, A. (1999) Mast cell degranulating (MCD) peptide: a prototypic peptide in allergy and inflammation *Peptides* **20**, 415–420
585. Wanandy, T., Gueven, N., Davies, N. W., Brown, S. G., and Wiese, M. D. (2015) Pilosulins: a review of the structure and mode of action of venom peptides from an Australian ant Myrmecia pilosula *Toxicon* **98**, 54–61
586. Moore, S., Smyth, W. F., Gault, V. A., O'Kane, E., and McClean, S. (2009) Mass spectrometric characterisation and quantitation of selected low molecular mass compounds from the venom of Haplopelma lividum (Theraphosidae) *Rapid Commun Mass Spectrom* **23**, 1747–1755
587. Tani, N., Kazuma, K., Ohtsuka, Y., Shigeri, Y., Masuko, K., Konno, K. *et al.* (2019) Mass spectrometry analysis and biological characterization of the predatory ant Odontomachus monticola venom and venom sac components *Toxins (Basel)* **11**, 50
588. Bai, Z. T., Liu, T., Jiang, F., Cheng, M., Pang, X. Y., Hua, L. M. *et al.* (2010) Phenotypes and peripheral mechanisms underlying inflammatory pain-related behaviors induced by BmK I, a modulator of sodium channels *Exp Neurol* **226**, 159–172
589. Rowe, A. H., Xiao, Y., Scales, J., Linse, K. D., Rowe, M. P., Cummins, T. R. *et al.* (2011) Isolation and characterization of CvIV4: a pain inducing alpha-scorpion toxin *PLoS One* **6**, e23520
590. Cox, J. J., Reimann, F., Nicholas, A. K., Thornton, G., Roberts, E., Springell, K. *et al.* (2006) An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain *Nature* **444**, 894–898
591. Cintra-Francischinelli, M., Caccin, P., Chiavegato, A., Pizzo, P., Carmignoto, G., Angulo, Y. *et al.* (2010) Bothrops snake myotoxins induce a large efflux of ATP and potassium with spreading of cell damage and pain *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14140–14145
592. Zhang, C., Medzihradszky, K. F., Sanchez, E. E., Basbaum, A. I., and Julius, D. (2017) Lys49 myotoxin from the Brazilian lancehead pit viper elicits pain through regulated ATP release *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, E2524–E2532
593. Bohlen, C. J., Chesler, A. T., Sharif-Naeini, R., Medzihradszky, K. F., Zhou, S., King, D. *et al.* (2011) A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain *Nature* **479**, 410–414

594. Bohlen, C. J., Priel, A., Zhou, S., King, D., Siemens, J., and Julius, D. (2010) A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain *Cell* **141**, 834–845
595. Zhu, S., Peigneur, S., Gao, B., Luo, L., Jin, D., Zhao, Y. *et al.* (2011) Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins *Mol Cell Proteomics* **10**, M110.002832
596. Hakim, M. A., Jiang, W., Luo, L., Li, B., Yang, S., Song, Y. *et al.* (2015) Scorpion toxin, BmP01, induces pain by targeting TRPV1 channel *Toxins (Basel)* **7**, 3671–3687
597. Jordt, S. E., Tominaga, M., and Julius, D. (2000) Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 8134–8139
598. Chen, B., Hu, Z., Chen, X., and Zeng, X. (2024) Molecular mechanisms of two novel and selective TRPV1 channel activators *International journal of biological macromolecules* **275**, 133658
599. Rita Pereira, E. M., Souza, J. M., Carobin, N. V., Silva, J. F., Santos, D. C., Silva Júnior, C. A. *et al.* (2020) Phoneutria toxin PnTx3-5 inhibits TRPV1 channel with antinociceptive action in an orofacial pain model *Neuropharmacology* **162**, 107826
600. Hinman, A., Chuang, H. H., Bautista, D. M., and Julius, D. (2006) TRP channel activation by reversible covalent modification *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19564–19568
601. Tonello, R., Fusi, C., Materazzi, S., Marone, I. M., De Logu, F., Benemei, S. *et al.* (2017) The peptide Phα1β, from spider venom, acts as a TRPA1 channel antagonist with antinociceptive effects in mice *Br J Pharmacol* **174**, 57–69
602. Escoubas, P., De Weille, J. R., Lecoq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G. *et al.* (2000) Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na+ channels *J Biol Chem* **275**, 25116–25121
603. Er, S. Y., Cristofori-Armstrong, B., Escoubas, P., and Rash, L. D. (2017) Discovery and molecular interaction studies of a highly stable, tarantula peptide modulator of acid-sensing ion channel 1 *Neuropharmacology* **127**, 185–195
604. Chassagnon, I. R., McCarthy, C. A., Chin, Y. K., Pineda, S. S., Keramidas, A., Mobli, M. *et al.* (2017) Potent neuroprotection after stroke afforded by a double-knot spider-venom peptide that inhibits acid-sensing ion channel 1a *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**, 3750–3755
605. Chen, X., Kalbacher, H., and Gründer, S. (2005) The tarantula toxin psalmotoxin 1 inhibits acid-sensing ion channel (ASIC) 1a by increasing its apparent H+ affinity *J Gen Physiol* **126**, 71–79
606. Chen, X., Kalbacher, H., and Grunder, S. (2006) Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent *J Gen Physiol* **127**, 267–276
607. Baconguis, I., and Gouaux, E. (2012) Structural plasticity and dynamic selectivity of acid-sensing ion channel-spider toxin complexes *Nature* **489**, 400–405
608. Joeres, N., Augustinowski, K., Neuhof, A., Assmann, M., and Gründer, S. (2016) Functional and pharmacological characterization of two different ASIC1a/2a heteromers reveals their sensitivity to the spider toxin PcTx1 *Sci Rep* **6**, 27647
609. Sherwood, T. W., Lee, K. G., Gormley, M. G., and Askwith, C. C. (2011) Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death *J Neurosci* **31**, 9723–9734
610. Dawson, R. J., Benz, J., Stohler, P., Tetaz, T., Joseph, C., Huber, S. *et al.* (2012) Structure of the acid-sensing ion channel 1 in complex with the gating modifier Psalmotoxin 1 *Nat Commun* **3**, 936

611. Жданова, Л. Н., Адамович, Т. Б., Назимов, И. В., Гришин, Е. В., and Овчинников, Ю. А. (1977) Аминокислотная последовательность инсектотоксина И1 из яда среднеазиатского скорпиона Buthus epeus *Биоорган химия* **3**, 485–493
612. Арсеньев, А. С., Кондаков, В. И., Майоров, В. Н., Волкова, Т. М., Гришин, Е. В., Быстров, В. Ф. *et al.* (1983) Вторичная структура и отнесение сигналов в двумерных спектрах 1Н-ЯМР инсектотоксина I5A Buthus eupeus *Биоорган химия* **9**, 768–793
613. Arseniev, A. S., Kondakov, V. I., Maiorov, V. N., and Bystrov, V. F. (1984) NMR solution spatial structure of 'short' scorpion insectotoxin I5A *FEBS Lett* **165**, 57–62
614. DeBin, J. A., Maggio, J. E., and Strichartz, G. R. (1993) Purification and characterization of chlorotoxin, a chloride channel ligand from the venom of the scorpion *The American journal of physiology* **264**, C361–369
615. Maertens, C., Wei, L., Tytgat, J., Droogmans, G., and Nilius, B. (2000) Chlorotoxin does not inhibit volume-regulated, calcium-activated and cyclic AMP-activated chloride channels *Br J Pharmacol* **129**, 791–801
616. Fuller, M. D., Thompson, C. H., Zhang, Z. R., Freeman, C. S., Schay, E., Szakács, G. *et al.* (2007) State-dependent inhibition of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels by a novel peptide toxin *J Biol Chem* **282**, 37545–37555
617. Lippens, G., Najib, J., Wodak, S. J., and Tartar, A. (1995) NMR sequential assignments and solution structure of chlorotoxin, a small scorpion toxin that blocks chloride channels *Biochemistry* **34**, 13–21
618. Adjadj, E., Naudat, V., Quiniou, E., Wouters, D., Sautière, P., and Craescu, C. T. (1997) Solution structure of Lqh-8/6, a toxin-like peptide from a scorpion venom--structural heterogeneity induced by proline cis/trans isomerization *Eur J Biochem* **246**, 218–227
619. Huys, I., Waelkens, E., and Tytgat, J. (2004) Structure-function study of a chlorotoxin-chimer and its activity on Kv1.3 channels *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **803**, 67–73
620. Гришин, Е. В., Волкова, Т. М., and Солдатова, Л. Н. (1982) Изучение токсических компонентов яда кавказского подвида скорпиона Buthus eupeus *Биоорган химия* **8**, 155–164
621. Veiseh, M., Gabikian, P., Bahrami, S. B., Veiseh, O., Zhang, M., Hackman, R. C. *et al.* (2007) Tumor paint: a chlorotoxin:Cy5.5 bioconjugate for intraoperative visualization of cancer foci *Cancer research* **67**, 6882–6888
622. Fu, Y. J., Yin, L. T., Wang, W., Chai, B. F., and Liang, A. H. (2005) Synthesis, expression and purification of a type of chlorotoxin-like peptide from the scorpion, Buthus martensii Karsch, and its acute toxicity analysis *Biotechnology letters* **27**, 1597–1603
623. Soroceanu, L., Gillespie, Y., Khazaeli, M. B., and Sontheimer, H. (1998) Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors *Cancer research* **58**, 4871–4879
624. Mamelak, A. N., and Jacoby, D. B. (2007) Targeted delivery of antitumoral therapy to glioma and other malignancies with synthetic chlorotoxin (TM-601) *Expert opinion on drug delivery* **4**, 175–186
625. Soroceanu, L., Manning, T. J., Jr., and Sontheimer, H. (1999) Modulation of glioma cell migration and invasion using Cl(-) and K(+) ion channel blockers *J Neurosci* **19**, 5942–5954
626. Fu, Y. J., An, N., Chan, K. G., Wu, Y. B., Zheng, S. H., and Liang, A. H. (2011) A model of BmK CT in inhibiting glioma cell migration via matrix metalloproteinase-2 from experimental and molecular dynamics simulation study *Biotechnology letters* **33**, 1309–1317
627. Rjeibi, I., Mabrouk, K., Mosrati, H., Berenguer, C., Mejdoub, H., Villard, C. *et al.* (2011) Purification, synthesis and characterization of AaCtx, the first chlorotoxin-like peptide from Androctonus australis scorpion venom *Peptides* **32**, 656–663

628. Sontheimer, H. (2008) An unexpected role for ion channels in brain tumor metastasis *Experimental biology and medicine (Maywood, NJ)* **233**, 779–791
629. Deshane, J., Garner, C. C., and Sontheimer, H. (2003) Chlorotoxin inhibits glioma cell invasion via matrix metalloproteinase-2 *J Biol Chem* **278**, 4135–4144
630. Kesavan, K., Ratliff, J., Johnson, E. W., Dahlberg, W., Asara, J. M., Misra, P. *et al.* (2010) Annexin A2 is a molecular target for TM601, a peptide with tumor-targeting and anti-angiogenic effects *J Biol Chem* **285**, 4366–4374
631. McGonigle, S., Majumder, U., Kolber-Simonds, D., Wu, J., Hart, A., Noland, T. *et al.* (2019) Neuropilin-1 drives tumor-specific uptake of chlorotoxin *Cell communication and signaling : CCS* **17**, 67
632. Thompson, C. H., Olivetti, P. R., Fuller, M. D., Freeman, C. S., McMaster, D., French, R. J. *et al.* (2009) Isolation and characterization of a high affinity peptide inhibitor of ClC-2 chloride channels *J Biol Chem* **284**, 26051–26062
633. Buisine, E., Wieruszeski, J. M., Lippens, G., Wouters, D., Tartar, A., and Sautiere, P. (1997) Characterization of a new family of toxin-like peptides from the venom of the scorpion Leiurus quinquestriatus hebraeus. 1H-NMR structure of leiuropeptide II *J Pept Res* **49**, 545–555
634. Wullschleger, B., Kuhn-Nentwig, L., Tromp, J., Kampfer, U., Schaller, J., Schurch, S. *et al.* (2004) CSTX-13, a highly synergistically acting two-chain neurotoxic enhancer in the venom of the spider Cupiennius salei (Ctenidae) *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11251–11256
635. Clémençon, B., Kuhn-Nentwig, L., Langenegger, N., Kopp, L., Peigneur, S., Tytgat, J. *et al.* (2020) Neurotoxin merging: A strategy deployed by the venom of the spider Cupiennius salei to potentiate toxicity on insects *Toxins (Basel)* **12**, 250
636. Кияткин, Н., Дулубова, И. Е., Волкова, Т. М., Чеховская, И. А., Липкин, А. В., and Гришин, Е. В. (1992) Структурный анализ белкового компонента яда паука каракурта, взаимодействующего с α-латротоксином *Докл Акад наук СССР* **323**, 178–180
637. Kiyatkin, N., Dulubova, I., Chekhovskaya, I., Lipkin, A., and Grishin, E. (1992) Structure of the low molecular weight protein copurified with alpha-latrotoxin *Toxicon* **30**, 771–774
638. Volkova, T. M., Pluzhnikov, K. A., Woll, P. G., and Grishin, E. V. (1995) Low molecular weight components from black widow spider venom *Toxicon* **33**, 483–489
639. Gasparini, S., Kiyatkin, N., Drevet, P., Boulain, J. C., Tacnet, F., Ripoche, P. *et al.* (1994) The low molecular weight protein which co-purifies with alpha-latrotoxin is structurally related to crustacean hyperglycemic hormones *J Biol Chem* **269**, 19803–19809
640. Johnson, J. H., Bloomquist, J. R., Krapcho, K. J., Kral, R. M., Jr., Trovato, R., Eppler, K. G. *et al.* (1998) Novel insecticidal peptides from Tegenaria agrestis spider venom may have a direct effect on the insect central nervous system *Arch Insect Biochem Physiol* **38**, 19–31
641. Undheim, E. A., Grimm, L. L., Low, C. F., Morgenstern, D., Herzig, V., Zobel-Thropp, P. *et al.* (2015) Weaponization of a hormone: Convergent recruitment of hyperglycemic hormone into the venom of arthropod predators *Structure (London, England : 1993)* **23**, 1283–1292
642. Bode, F., Sachs, F., and Franz, M. R. (2001) Tarantula peptide inhibits atrial fibrillation *Nature* **409**, 35–36
643. Suchyna, T. M., Tape, S. E., Koeppe, R. E., 2nd, Andersen, O. S., Sachs, F., and Gottlieb, P. A. (2004) Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers *Nature* **430**, 235–240

644. Gnanasambandam, R., Ghatak, C., Yasmann, A., Nishizawa, K., Sachs, F., Ladokhin, A. S. *et al.* (2017) GsMTx4: mechanism of inhibiting mechanosensitive ion channels *Biophys J* **112**, 31–45
645. Pan, N. C., Zhang, T., Hu, S., Liu, C., and Wang, Y. (2021) Fast desensitization of acetylcholine receptors induced by a spider toxin *Channels (Austin, Tex)* **15**, 507–515
646. Mourão, C. B. F., Brand, G. D., Fernandes, J. P. C., Prates, M. V., Bloch, C., Jr., Barbosa, J. *et al.* (2020) Head-to-tail cyclization after interaction with trypsin: A scorpion venom peptide that resembles plant cyclotides *J Med Chem* **63**, 9500–9511
647. Liang, S. P., and Pan, X. (1995) A lectin-like peptide isolated from the venom of the Chinese bird spider Selenocosmia huwena *Toxicon* **33**, 875–882
648. Lü, S., Liang, S., and Gu, X. (1999) Three-dimensional structure of Selenocosmia huwena lectin-I (SHL-I) from the venom of the spider Selenocosmia huwena by 2D-NMR *Journal of protein chemistry* **18**, 609–617
649. Siebert, H. C., Lu, S. Y., Wechselberger, R., Born, K., Eckert, T., Liang, S. *et al.* (2009) A lectin from the Chinese bird-hunting spider binds sialic acids *Carbohydrate research* **344**, 1515–1525
650. Choi, S. J., Parent, R., Guillaume, C., Deregnaucourt, C., Delarbre, C., Ojcius, D. M. *et al.* (2004) Isolation and characterization of Psalmopeotoxin I and II: two novel antimalarial peptides from the venom of the tarantula Psalmopoeus cambridgei *FEBS Lett* **572**, 109–117
651. Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodriguez, M. H., and Possani, L. D. (2000) Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom *FEBS Lett* **471**, 165–168
652. Carballar-Lejarazu, R., Rodriguez, M. H., de la Cruz Hernandez-Hernandez, F., Ramos-Castaneda, J., Possani, L. D., Zurita-Ortega, M. *et al.* (2008) Recombinant scorpine: a multifunctional antimicrobial peptide with activity against different pathogens *Cell Mol Life Sci* **65**, 3081–3092
653. Vita, C., Vizzavona, J., Drakopoulou, E., Zinn-Justin, S., Gilquin, B., and Ménez, A. (1998) Novel miniproteins engineered by the transfer of active sites to small natural scaffolds *Biopolymers* **47**, 93–100
654. Zhao, R., Kennedy, K., De Blas, G. A., Orta, G., Pavarotti, M. A., Arias, R. J. *et al.* (2018) Role of human Hv1 channels in sperm capacitation and white blood cell respiratory burst established by a designed peptide inhibitor *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E11847–e11856
655. Rogowski, R. S., Krueger, B. K., Collins, J. H., and Blaustein, M. P. (1994) Tityustoxin K alpha blocks voltage-gated noninactivating K+ channels and unblocks inactivating K+ channels blocked by alpha-dendrotoxin in synaptosomes *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1475–1479
656. Vassilevski, A. A., Sachkova, M. Y., Ignatova, A. A., Kozlov, S. A., Feofanov, A. V., and Grishin, E. V. (2013) Spider toxins comprising disulfide-rich and linear amphipathic domains: a new class of molecules identified in the lynx spider Oxyopes takobius *FEBS J* **280**, 6247–6261
657. Kuzmenkov, A. I., Fedorova, I. M., Vassilevski, A. A., and Grishin, E. V. (2013) Cysteine-rich toxins from Lachesana tarabaevi spider venom with amphiphilic C-terminal segments *Biochim Biophys Acta* **1828**, 724–731
658. Oparin, P. B., Nadezhdin, K. D., Berkut, A. A., Arseniev, A. S., Grishin, E. V., and Vassilevski, A. A. (2016) Structure of purotoxin-2 from wolf spider: modular design and membrane-assisted mode of action in arachnid toxins *Biochem J* **473**, 3113–3126
659. Kuhn-Nentwig, L., Fedorova, I. M., Luscher, B. P., Kopp, L. S., Trachsel, C., Schaller, J. *et al.* (2012) A venom-derived neurotoxin, CsTx-1, from the spider Cupiennius salei exhibits cytolytic activities *J Biol Chem* **287**, 25640–25649

660. Soudani, N., Gharbi-Chihi, J., Srairi-Abid, N., Yazidi, C. M., Planells, R., Margotat, A. *et al.* (2005) Isolation and molecular characterization of LVP1 lipolysis activating peptide from scorpion Buthus occitanus tunetanus *Biochim Biophys Acta* **1747**, 47–56
661. Vassilevski, A. A., Fedorova, I. M., Maleeva, E. E., Korolkova, Y. V., Efimova, S. S., Samsonova, O. V. *et al.* (2010) Novel class of spider toxin: active principle from the yellow sac spider Cheiracanthium punctorium venom is a unique two-domain polypeptide *J Biol Chem* **285**, 32293–32302
662. Zhu, S., and Tytgat, J. (2004) The scorpine family of defensins: gene structure, alternative polyadenylation and fold recognition *Cell Mol Life Sci* **61**, 1751–1763
663. Zhu, S., Gao, B., Aumelas, A., del Carmen Rodriguez, M., Lanz-Mendoza, H., Peigneur, S. *et al.* (2010) MeuTXKbeta1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity *Biochim Biophys Acta* **1804**, 872–883
664. Diego-Garcia, E., Schwartz, E. F., D'Suze, G., Gonzalez, S. A., Batista, C. V., Garcia, B. I. *et al.* (2007) Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components *Peptides* **28**, 31–37
665. Matsushita, N., Miyashita, M., Ichiki, Y., Ogura, T., Sakuradani, E., Nakagawa, Y. *et al.* (2009) Purification and cDNA cloning of LaIT2, a novel insecticidal toxin from venom of the scorpion Liocheles australasiae *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 2769–2772
666. Flores-Solis, D., Toledano, Y., Rodriguez-Lima, O., Cano-Sanchez, P., Ramirez-Cordero, B. E., Landa, A. *et al.* (2016) Solution structure and antiparasitic activity of scorpine-like peptides from Hoffmannihadrurus gertschi *FEBS Lett* **590**, 2286–2296
667. Zhu, S., and Gao, B. (2006) Molecular characterization of a new scorpion venom lipolysis activating peptide: Evidence for disulfide bridge-mediated functional switch of peptides *FEBS Lett* **580**, 6825–6836
668. Chai, S. C., Armugam, A., Strong, P. N., and Jeyaseelan, K. (2012) Charaterization of bumarsin, a 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme reductase inhibitor from Mesobuthus martensii Karsch venom *Toxicon* **60**, 272–279
669. Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., and Barton, G. J. (2015) JPred4: a protein secondary structure prediction server *Nucleic Acids Res* **43**, W389–394
670. Bae, C., Anselmi, C., Kalia, J., Jara-Oseguera, A., Schwieters, C. D., Krepkiy, D. *et al.* (2016) Structural insights into the mechanism of activation of the TRPV1 channel by a membrane-bound tarantula toxin *Elife* **5**,
671. Cao, E., Liao, M., Cheng, Y., and Julius, D. (2013) TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms *Nature* **504**, 113–118
672. Gao, Y., Cao, E., Julius, D., and Cheng, Y. (2016) TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action *Nature* **534**, 347–351
673. Kubista, H., Mafra, R. A., Chong, Y., Nicholson, G. M., Beirao, P. S., Cruz, J. S. *et al.* (2007) CSTX-1, a toxin from the venom of the hunting spider Cupiennius salei, is a selective blocker of L-type calcium channels in mammalian neurons *Neuropharmacology* **52**, 1650–1662
674. Kaiser, E. (1956) Enzymatic activity of spider venoms In *Venoms*, Buckley EE, and Porges N, eds. American Association for the Advancement of Science, 91–93
675. da Silveira, R. B., Wille, A. C., Chaim, O. M., Appel, M. H., Silva, D. T., Franco, C. R. *et al.* (2007) Identification, cloning, expression and functional characterization of an astacin-like metalloprotease toxin from Loxosceles intermedia (brown spider) venom *Biochem J* **406**, 355–363
676. Devaraja, S., Nagaraju, S., Mahadeswaraswamy, Y. H., Girish, K. S., and Kemparaju, K. (2008) A low molecular weight serine protease: Purification and characterization from Hippasa agelenoides (funnel web) spider venom gland extract *Toxicon* **52**, 130–138

677. Trevisan-Silva, D., Bednaski, A. V., Gremski, L. H., Chaim, O. M., Veiga, S. S., and Senff-Ribeiro, A. (2013) Differential metalloprotease content and activity of three Loxosceles spider venoms revealed using two-dimensional electrophoresis approaches *Toxicon* **76**, 11–22
678. Nystrom, G. S., Ellsworth, S. A., and Rokyta, D. R. (2023) The remarkably enzyme-rich venom of the Big Bend Scorpion (Diplocentrus whitei) *Toxicon* **226**, 107080
679. Schanbacher, F. L., Lee, C. K., Wilson, I. B., Howell, D. E., and Odell, G. V. (1973) Purification and characterization of tarantula, Dugesiella hentzi (Girard) venom hyaluronidase *Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry* **44**, 389–396
680. Biner, O., Trachsel, C., Moser, A., Kopp, L., Langenegger, N., Kämpfer, U. *et al.* (2015) Isolation, N-glycosylations and function of a hyaluronidase-like enzyme from the venom of the spider Cupiennius salei *PLoS One* **10**, e0143963
681. Rodríguez-Rios, L., Díaz-Peña, L. F., Lazcano-Pérez, F., Arreguín-Espinosa, R., Rojas-Molina, A., and García-Arredondo, A. (2017) Hyaluronidase-like enzymes are a frequent component of venoms from theraphosid spiders *Toxicon* **136**, 34–43
682. Pessini, A. C., Takao, T. T., Cavalheiro, E. C., Vichnewski, W., Sampaio, S. V., Giglio, J. R. *et al.* (2001) A hyaluronidase from Tityus serrulatus scorpion venom: isolation, characterization and inhibition by flavonoids *Toxicon* **39**, 1495–1504
683. Foradori, M. J., Smith, S. C., Smith, E., and Wells, R. E. (2005) Survey for potentially necrotizing spider venoms, with special emphasis on Cheiracanthium mildei *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **141**, 32–39
684. Nagaraju, S., Mahadeswaraswamy, Y. H., Girish, K. S., and Kemparaju, K. (2006) Venom from spiders of the genus Hippasa: biochemical and pharmacological studies *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **144**, 1–9
685. Zamudio, F. Z., Conde, R., Arevalo, C., Becerril, B., Martin, B. M., Valdivia, H. H. *et al.* (1997) The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion Pandinus imperator *J Biol Chem* **272**, 11886–11894
686. Valdez-Cruz, N. A., Batista, C. V., and Possani, L. D. (2004) Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A from the venom of the scorpion Anuroctonus phaiodactylus *Eur J Biochem* **271**, 1453–1464
687. Krayem, N., Parsiegla, G., Gaussier, H., Louati, H., Jallouli, R., Mansuelle, P. *et al.* (2018) Functional characterization and FTIR-based 3D modeling of full length and truncated forms of Scorpio maurus venom phospholipase A(2) *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1862**, 1247–1261
688. Montecucco, C., Gutierrez, J. M., and Lomonte, B. (2008) Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action *Cell Mol Life Sci* **65**, 2897–2912
689. (1978) *Arthropod Venoms*, Springer,
690. da Silveira, R. B., Chaim, O. M., Mangili, O. C., Gremski, W., Dietrich, C. P., Nader, H. B. *et al.* (2007) Hyaluronidases in Loxosceles intermedia (Brown spider) venom are endo-beta-N-acetyl-d-hexosaminidases hydrolases *Toxicon* **49**, 758–768
691. Feng, L., Gao, R., and Gopalakrishnakone, P. (2008) Isolation and characterization of a hyaluronidase from the venom of Chinese red scorpion Buthus martensi *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **148**, 250–257
692. Ferrer, V. P., de Mari, T. L., Gremski, L. H., Trevisan Silva, D., da Silveira, R. B., Gremski, W. *et al.* (2013) A novel hyaluronidase from brown spider (Loxosceles intermedia) venom (Dietrich's Hyaluronidase): from cloning to functional characterization *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2206

693. Tu, A. T., and Hendon, R. R. (1983) Characterization of lizard venom hyaluronidase and evidence for its action as a spreading factor *Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry* **76**, 377–383
694. Wahby, A. F., Mahdy el, S. M., El-Mezayen, H. A., Salama, W. H., Abdel-Aty, A. M., and Fahmy, A. S. (2012) Egyptian horned viper Cerastes cerastes venom hyaluronidase: purification, partial characterization and evidence for its action as a spreading factor *Toxicon* **60**, 1380–1389
695. Feitosa, L., Gremski, W., Veiga, S. S., Elias, M. C., Graner, E., Mangili, O. C. *et al.* (1998) Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (Loxosceles intermedia) venom *Toxicon* **36**, 1039–1051
696. Nagaraju, S., Girish, K. S., Fox, J. W., and Kemparaju, K. (2007) 'Partitagin' a hemorrhagic metalloprotease from Hippasa partita spider venom: role in tissue necrosis *Biochimie* **89**, 1322–1331
697. Markland, F. S., Jr., and Swenson, S. (2013) Snake venom metalloproteinases *Toxicon* **62**, 3–18
698. Forrester, L. J., Barrett, J. T., and Campbell, B. J. (1978) Red blood cell lysis induced by the venom of the brown recluse spider: the role of sphingomyelinase D *Arch Biochem Biophys* **187**, 355–365
699. Tambourgi, D. V., Gonçalves-de-Andrade, R. M., and van den Berg, C. W. (2010) Loxoscelism: From basic research to the proposal of new therapies *Toxicon* **56**, 1113–1119
700. Lajoie, D. M., Zobel-Thropp, P. A., Kumirov, V. K., Bandarian, V., Binford, G. J., and Cordes, M. H. (2013) Phospholipase D toxins of brown spider venom convert lysophosphatidylcholine and sphingomyelin to cyclic phosphates *PLoS One* **8**, e72372
701. Sundman, A. K., Binford, G. J., Montfort, W. R., and Cordes, M. H. J. (2026) Spider venom phospholipase D toxin structure: Interfacial binding site, mechanism, activation, and head group preference *Proc Natl Acad Sci U S A* **123**, e2513997123
702. Tambourgi, D. V., Magnoli, F. C., Von Eickstedt, V. R., Benedetti, Z. C., Petricevich, V. L., and da Silva, W. D. (1995) Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from Loxosceles intermedia spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway *J Immunol* **155**, 4459–4466
703. Tambourgi, D. V., Magnoli, F. C., van den Berg, C. W., Morgan, B. P., de Araujo, P. S., Alves, E. W. *et al.* (1998) Sphingomyelinases in the venom of the spider Loxosceles intermedia are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis *Biochem Biophys Res Commun* **251**, 366–373
704. Fernandes Pedrosa Mde, F., Junqueira de Azevedo Ide, L., Gonçalves-de-Andrade, R. M., van den Berg, C. W., Ramos, C. R., Ho, P. L. *et al.* (2002) Molecular cloning and expression of a functional dermonecrotic and haemolytic factor from Loxosceles laeta venom *Biochem Biophys Res Commun* **298**, 638–645
705. Tambourgi, D. V., de, F. F. P. M., van den Berg, C. W., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Ferracini, M., Paixão-Cavalcante, D. *et al.* (2004) Molecular cloning, expression, function and immunoreactivities of members of a gene family of sphingomyelinases from Loxosceles venom glands *Molecular immunology* **41**, 831–840
706. da Silveira, R. B., Pigozzo, R. B., Chaim, O. M., Appel, M. H., Dreyfuss, J. L., Toma, L. *et al.* (2006) Molecular cloning and functional characterization of two isoforms of dermonecrotic toxin from Loxosceles intermedia (brown spider) venom gland *Biochimie* **88**, 1241–1253
707. Murakami, M. T., Fernandes-Pedrosa, M. F., Tambourgi, D. V., and Arni, R. K. (2005) Structural basis for metal ion coordination and the catalytic mechanism of sphingomyelinases D *J Biol Chem* **280**, 13658–13664

708. de Giuseppe, P. O., Ullah, A., Silva, D. T., Gremski, L. H., Wille, A. C., Chaves Moreira, D. *et al.* (2011) Structure of a novel class II phospholipase D: catalytic cleft is modified by a disulphide bridge *Biochem Biophys Res Commun* **409**, 622–627
709. Lajoie, D. M., Roberts, S. A., Zobel-Thropp, P. A., Delahaye, J. L., Bandarian, V., Binford, G. J. *et al.* (2015) Variable substrate preference among phospholipase D toxins from sicariid spiders *J Biol Chem* **290**, 10994–11007
710. Vuitika, L., Chaves-Moreira, D., Caruso, I., Lima, M. A., Matsubara, F. H., Murakami, M. T. *et al.* (2016) Active site mapping of Loxosceles phospholipases D: Biochemical and biological features *Biochim Biophys Acta* **1861**, 970–979
711. Tambourgi, D. V., Morgan, B. P., de Andrade, R. M., Magnoli, F. C., and van Den Berg, C. W. (2000) Loxosceles intermedia spider envenomation induces activation of an endogenous metalloproteinase, resulting in cleavage of glycophorins from the erythrocyte surface and facilitating complement-mediated lysis *Blood* **95**, 683–691
712. Tambourgi, D. V., De Sousa Da Silva, M., Billington, S. J., Gonçalves De Andrade, R. M., Magnoli, F. C., Songer, J. G. *et al.* (2002) Mechanism of induction of complement susceptibility of erythrocytes by spider and bacterial sphingomyelinases *Immunology* **107**, 93–101
713. Tambourgi, D. V., Paixão-Cavalcante, D., Gonçalves de Andrade, R. M., Fernandes-Pedrosa Mde, F., Magnoli, F. C., Paul Morgan, B. *et al.* (2005) Loxosceles sphingomyelinase induces complement-dependent dermonecrosis, neutrophil infiltration, and endogenous gelatinase expression *The Journal of investigative dermatology* **124**, 725–731
714. van den Berg, C. W., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Magnoli, F. C., and Tambourgi, D. V. (2007) Loxosceles spider venom induces the release of thrombomodulin and endothelial protein C receptor: implications for the pathogenesis of intravascular coagulation as observed in loxoscelism *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **5**, 989–995
715. Tambourgi, D. V., Pedrosa, M. F., de Andrade, R. M., Billington, S. J., Griffiths, M., and van den Berg, C. W. (2007) Sphingomyelinases D induce direct association of C1q to the erythrocyte membrane causing complement mediated autologous haemolysis *Molecular immunology* **44**, 576–582
716. Paixão-Cavalcante, D., van den Berg, C. W., Gonçalves-de-Andrade, R. M., Fernandes-Pedrosa Mde, F., Okamoto, C. K., and Tambourgi, D. V. (2007) Tetracycline protects against dermonecrosis induced by Loxosceles spider venom *The Journal of investigative dermatology* **127**, 1410–1418
717. Borchani, L., Sassi, A., Shahbazzadeh, D., Strub, J. M., Tounsi-Guetteti, H., Boubaker, M. S. *et al.* (2011) Heminecrolysin, the first hemolytic dermonecrotic toxin purified from scorpion venom *Toxicon* **58**, 130–139
718. Bernheimer, A. W., Campbell, B. J., and Forrester, L. J. (1985) Comparative toxinology of Loxosceles reclusa and Corynebacterium pseudotuberculosis *Science* **228**, 590–591
719. Cordes, M. H., and Binford, G. J. (2006) Lateral gene transfer of a dermonecrotic toxin between spiders and bacteria *Bioinformatics (Oxford, England)* **22**, 264–268
720. Binford, G. J., Cordes, M. H., and Wells, M. A. (2005) Sphingomyelinase D from venoms of Loxosceles spiders: evolutionary insights from cDNA sequences and gene structure *Toxicon* **45**, 547–560
721. Frontali, N., Ceccarelli, B., Gorio, A., Mauro, A., Siekevitz, P., Tzeng, M. C. *et al.* (1976) Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junctions *The Journal of cell biology* **68**, 462–479
722. Ушкарев, Ю. А., and Гришин, Е. В. (1986) Нейротоксин каракурта и его взаимодействие с рецепторами из мозга крыс *Биоорган химия* **12**, 71–80

723. Красноперов, В. Г., Шамотиенко, О. Г., and Гришин, Е. В. (1990) Специфичный для ракообразных нейротоксин из яда паука каракурта Latrodectus mactans tredecimguttatus *Биоорган химия* **16**, 1567–1569
724. Пашков, В. Н., Ковалевская, Г. И., Красноперов, В. Г., and Булгаков, О. В. (1989) Выделение α-латротоксина из яда паука каракурта с помощью моноклональных антител *Биоорган химия* **15**, 1281–1283
725. Ковалевская, Г. И., Пашков, В. Н., Булгаков, О. В., Федорова, И. М., Магазаник, Л. Г., and Гришин, Е. В. (1990) Идентификация и выделение белкового инсектотоксина (α-латроинсектотоксина) из яда паука Latrodectus mactans tredecimguttatus *Биоорган химия* **16**, 1013–1018
726. Magazanik, L. G., Fedorova, I. M., Kovalevskaya, G. I., Pashkov, V. N., Bulgakov, O. V., and Grishin, E. V. (1992) Selective presynaptic insectotoxin (alpha-latroinsectotoxin) isolated from black widow spider venom *Neuroscience* **46**, 181–188
727. Kiyatkin, N. I., Dulubova, I. E., Chekhovskaya, I. A., and Grishin, E. V. (1990) Cloning and structure of cDNA encoding alpha-latrotoxin from black widow spider venom *FEBS Lett* **270**, 127–131
728. Kiyatkin, N., Dulubova, I., and Grishin, E. (1993) Cloning and structural analysis of alpha-latroinsectotoxin cDNA. Abundance of ankyrin-like repeats *Eur J Biochem* **213**, 121–127
729. Dulubova, I. E., Krasnoperov, V. G., Khvotchev, M. V., Pluzhnikov, K. A., Volkova, T. M., Grishin, E. V. *et al.* (1996) Cloning and structure of delta-latroinsectotoxin, a novel insect-specific member of the latrotoxin family: functional expression requires C-terminal truncation *J Biol Chem* **271**, 7535–7543
730. Волынский, К. Е., Волкова, Т. М., Галкина, Т. Г., Красноперов, В. Г., А., П. К., Хвощев, М. В. *et al.* (1999) Молекулярное клонирование и определение первичной структуры фрагмента кДНК α-латрокрустотоксина из яда паука каракурта *Биоорган химия* **25**, 25–30
731. Данилевич, В. Н., Лукьянов, С. А., and Гришин, Е. В. (1999) Клонирование и структура гена, кодирующего α-латрокрустотоксин в составе ядовитых желез паука каракурта *Биоорган химия* **25**, 537–547
732. Haney, R. A., Ayoub, N. A., Clarke, T. H., Hayashi, C. Y., and Garb, J. E. (2014) Dramatic expansion of the black widow toxin arsenal uncovered by multi-tissue transcriptomics and venom proteomics *BMC Genomics* **15**, 366
733. Bhere, K. V., Haney, R. A., Ayoub, N. A., and Garb, J. E. (2014) Gene structure, regulatory control, and evolution of black widow venom latrotoxins *FEBS Lett* **588**, 3891–3897
734. Chen, M., Blum, D., Engelhard, L., Raunser, S., Wagner, R., and Gatsogiannis, C. (2021) Molecular architecture of black widow spider neurotoxins *Nat Commun* **12**, 6956
735. Лунев, А. В., Демин, В. В., Зайцев, О. И., Спадар, С. И., and Гришин, Е. В. (1991) Электронная микроскопия α-латротоксина из яда паука каракурта Latrodectus mactans tredecimguttatus *Биоорган химия* **17**, 1021–1026
736. Orlova, E. V., Rahman, M. A., Gowen, B., Volynski, K. E., Ashton, A. C., Manser, C. *et al.* (2000) Structure of alpha-latrotoxin oligomers reveals that divalent cation-dependent tetramers form membrane pores *Nat Struct Biol* **7**, 48–53
737. Klink, B. U., Alavizargar, A., Kalyankumar, K. S., Chen, M., Heuer, A., and Gatsogiannis, C. (2024) Structural basis of alpha-latrotoxin transition to a cation-selective pore *Nat Commun* **15**, 8551
738. Volynski, K. E., Meunier, F. A., Lelianova, V. G., Dudina, E. E., Volkova, T. M., Rahman, M. A. *et al.* (2000) Latrophilin, neurexin, and their signaling-deficient mutants facilitate alpha -latrotoxin insertion into membranes but are not involved in pore formation *J Biol Chem* **275**, 41175–41183

739. Ushkaryov, Y. A., Volynski, K. E., and Ashton, A. C. (2004) The multiple actions of black widow spider toxins and their selective use in neurosecretion studies *Toxicon* **43**, 527–542
740. Ushkaryov, Y. A., Rohou, A., and Sugita, S. (2008) alpha-Latrotoxin and its receptors *Handbook of experimental pharmacology* 10.1007/978-3-540-74805-2_7171–206
741. Petrenko, A. G., Kovalenko, V. A., Shamotienko, O. G., Surkova, I. N., Tarasyuk, T. A., Ushkaryov Yu, A. *et al.* (1990) Isolation and properties of the alpha-latrotoxin receptor *Embo j* **9**, 2023–2027
742. Ushkaryov, Y. A., Petrenko, A. G., Geppert, M., and Südhof, T. C. (1992) Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the alpha-latrotoxin receptor and laminin *Science* **257**, 50–56
743. Sugita, S., Khvochtev, M., and Südhof, T. C. (1999) Neurexins are functional alpha-latrotoxin receptors *Neuron* **22**, 489–496
744. Davletov, B. A., Krasnoperov, V., Hata, Y., Petrenko, A. G., and Südhof, T. C. (1995) High affinity binding of alpha-latrotoxin to recombinant neurexin I alpha *J Biol Chem* **270**, 23903–23905
745. Davletov, B. A., Shamotienko, O. G., Lelianova, V. G., Grishin, E. V., and Ushkaryov, Y. A. (1996) Isolation and biochemical characterization of a Ca2+-independent alpha-latrotoxin-binding protein *J Biol Chem* **271**, 23239–23245
746. Krasnoperov, V. G., Beavis, R., Chepurny, O. G., Little, A. R., Plotnikov, A. N., and Petrenko, A. G. (1996) The calcium-independent receptor of alpha-latrotoxin is not a neurexin *Biochem Biophys Res Commun* **227**, 868–875
747. Lelianova, V. G., Davletov, B. A., Sterling, A., Rahman, M. A., Grishin, E. V., Totty, N. F. *et al.* (1997) Alpha-latrotoxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors *J Biol Chem* **272**, 21504–21508
748. Hamann, J., Aust, G., Araç, D., Engel, F. B., Formstone, C., Fredriksson, R. *et al.* (2015) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G protein-coupled receptors *Pharmacol Rev* **67**, 338–367
749. Ichtchenko, K., Bittner, M. A., Krasnoperov, V., Little, A. R., Chepurny, O., Holz, R. W. *et al.* (1999) A novel ubiquitously expressed alpha-latrotoxin receptor is a member of the CIRL family of G-protein-coupled receptors *J Biol Chem* **274**, 5491–5498
750. Mee, C. J., Tomlinson, S. R., Perestenko, P. V., De Pomerai, D., Duce, I. R., Usherwood, P. N. *et al.* (2004) Latrophilin is required for toxicity of black widow spider venom in Caenorhabditis elegans *Biochem J* **378**, 185–191
751. Krasnoperov, V., Bittner, M. A., Mo, W., Buryanovsky, L., Neubert, T. A., Holz, R. W. *et al.* (2002) Protein-tyrosine phosphatase-sigma is a novel member of the functional family of alpha-latrotoxin receptors *J Biol Chem* **277**, 35887–35895
752. Tobaben, S., Südhof, T. C., and Stahl, B. (2002) Genetic analysis of alpha-latrotoxin receptors reveals functional interdependence of CIRL/latrophilin 1 and neurexin 1 alpha *J Biol Chem* **277**, 6359–6365
753. Ichtchenko, K., Khvotchev, M., Kiyatkin, N., Simpson, L., Sugita, S., and Sudhof, T. C. (1998) alpha-latrotoxin action probed with recombinant toxin: receptors recruit alpha-latrotoxin but do not transduce an exocytotic signal *EMBO J* **17**, 6188–6199
754. Capogna, M., Volynski, K. E., Emptage, N. J., and Ushkaryov, Y. A. (2003) The alpha-latrotoxin mutant LTXN4C enhances spontaneous and evoked transmitter release in CA3 pyramidal neurons *J Neurosci* **23**, 4044–4053
755. Lang, J., Ushkaryov, Y., Grasso, A., and Wollheim, C. B. (1998) Ca2+-independent insulin exocytosis induced by alpha-latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor *Embo j* **17**, 648–657

756. Fischbach, M. A., and Walsh, C. T. (2006) Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal Peptide antibiotics: logic, machinery, and mechanisms *Chemical reviews* **106**, 3468–3496
757. Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sonderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S. *et al.* (2019) SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks *Nat Biotechnol* 10.1038/s41587-019-0036-z
758. Canaff, L., Bennett, H. P., and Hendy, G. N. (1999) Peptide hormone precursor processing: getting sorted? *Molecular and cellular endocrinology* **156**, 1–6
759. Bradbury, A. F., Finnie, M. D., and Smyth, D. G. (1982) Mechanism of C-terminal amide formation by pituitary enzymes *Nature* **298**, 686–688
760. Delgado-Prudencio, G., Possani, L. D., Becerril, B., and Ortiz, E. (2019) The dual α-amidation system in scorpion venom glands *Toxins (Basel)* **11**, 425
761. Langenegger, N., Koua, D., Schürch, S., Heller, M., Nentwig, W., and Kuhn-Nentwig, L. (2018) Identification of a precursor processing protease from the spider Cupiennius salei essential for venom neurotoxin maturation *J Biol Chem* **293**, 2079–2090
762. Volynski, K. E., Nosyreva, E. D., Ushkaryov, Y. A., and Grishin, E. V. (1999) Functional expression of alpha-latrotoxin in baculovirus system *FEBS Lett* **442**, 25–28
763. Heck, S. D., Siok, C. J., Krapcho, K. J., Kelbaugh, P. R., Thadeio, P. F., Welch, M. J. *et al.* (1994) Functional consequences of posttranslational isomerization of Ser46 in a calcium channel toxin *Science* **266**, 1065–1068
764. Kuwada, M., Teramoto, T., Kumagaye, K. Y., Nakajima, K., Watanabe, T., Kawai, T. *et al.* (1994) Omega-agatoxin-TK containing D-serine at position 46, but not synthetic omega-[L-Ser46]agatoxin-TK, exerts blockade of P-type calcium channels in cerebellar Purkinje neurons *Mol Pharmacol* **46**, 587–593
765. Branton, W. D., Rudnick, M. S., Zhou, Y., Eccleston, E. D., Fields, G. B., and Bowers, L. D. (1993) Fatty acylated toxin structure *Nature* **365**, 496–497
766. Bódi, J., Nishio, H., Zhou, Y., Branton, W. D., Kimura, T., and Sakakibara, S. (1995) Synthesis of an O-palmitoylated 44-residue peptide amide (PLTX II) blocking presynaptic calcium channels in Drosophila *Peptide research* **8**, 228–235
767. Zhou, Y., Zhao, M., Fields, G. B., Wu, C. F., and Branton, W. D. (2013) δ/ω-Plectoxin-Pt1a: an excitatory spider toxin with actions on both Ca(2+) and Na(+) channels *PLoS One* **8**, e64324
768. Verano-Braga, T., Dutra, A. A., León, I. R., Melo-Braga, M. N., Roepstorff, P., Pimenta, A. M. *et al.* (2013) Moving pieces in a venomic puzzle: unveiling post-translationally modified toxins from Tityus serrulatus *J Proteome Res* **12**, 3460–3470
769. Sanchez-Herrero, J. F., Frias-Lopez, C., Escuer, P., Hinojosa-Alvarez, S., Arnedo, M. A., Sanchez-Gracia, A. *et al.* (2019) The draft genome sequence of the spider Dysdera silvatica (Araneae, Dysderidae): A valuable resource for functional and evolutionary genomic studies in chelicerates *Gigascience* **8**,
770. Yu, N., Han, C., and Liu, Z. (2020) In silico identification of the neuropeptidome of the pond wolf spider Pardosa pseudoannulata *Gen Comp Endocrinol* **285**, 113271
771. Babb, P. L., Lahens, N. F., Correa-Garhwal, S. M., Nicholson, D. N., Kim, E. J., Hogenesch, J. B. *et al.* (2017) The Nephila clavipes genome highlights the diversity of spider silk genes and their complex expression *Nat Genet* **49**, 895–903
772. Sanggaard, K. W., Bechsgaard, J. S., Fang, X., Duan, J., Dyrlund, T. F., Gupta, V. *et al.* (2014) Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk *Nat Commun* **5**, 3765
773. Schwager, E. E., Sharma, P. P., Clarke, T., Leite, D. J., Wierschin, T., Pechmann, M. *et al.* (2017) The house spider genome reveals an ancient whole-genome duplication during arachnid evolution *BMC Biol* **15**, 62

774. Haney, R. A., Matte, T., Forsyth, F. S., and Garb, J. E. (2019) Alternative transcription at venom genes and its role as a complementary mechanism for the generation of venom complexity in the common house spider *Front Ecol Evol* **7**,
775. Zhu, S., and Gao, B. (2006) Molecular characterization of a possible progenitor sodium channel toxin from the Old World scorpion Mesobuthus martensii *FEBS Lett* **580**, 5979–5987
776. Miwa, J. M., Ibanez-Tallon, I., Crabtree, G. W., Sanchez, R., Sali, A., Role, L. W. *et al.* (1999) lynx1, an endogenous toxin-like modulator of nicotinic acetylcholine receptors in the mammalian CNS *Neuron* **23**, 105–114
777. Aerts, A. M., Francois, I. E., Cammue, B. P., and Thevissen, K. (2008) The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins *Cell Mol Life Sci* **65**, 2069–2079
778. Zhu, S., Peigneur, S., Gao, B., Umetsu, Y., Ohki, S., and Tytgat, J. (2014) Experimental conversion of a defensin into a neurotoxin: implications for origin of toxic function *Mol Biol Evol* **31**, 546–559
779. Zhu, S., Gao, B., Deng, M., Yuan, Y., Luo, L., Peigneur, S. *et al.* (2010) Drosotoxin, a selective inhibitor of tetrodotoxin-resistant sodium channels *Biochem Pharmacol* **80**, 1296–1302
780. Ohno, S. (1970) *Evolution by Gene Duplication*, Springer-Verlag, Heidelberg
781. Hargreaves, A. D., Swain, M. T., Hegarty, M. J., Logan, D. W., and Mulley, J. F. (2014) Restriction and recruitment-gene duplication and the origin and evolution of snake venom toxins *Genome Biol Evol* **6**, 2088–2095
782. Copley, S. D. (2014) An evolutionary perspective on protein moonlighting *Biochemical Society transactions* **42**, 1684–1691
783. Casewell, N. R., Huttley, G. A., and Wüster, W. (2012) Dynamic evolution of venom proteins in squamate reptiles *Nat Commun* **3**, 1066
784. Williams, K. (1997) Interactions of polyamines with ion channels *Biochem J* **325 (Pt 2)**, 289–297
785. Cordes, M. H. J., and Binford, G. J. (2018) Evolutionary dynamics of origin and loss in the deep history of phospholipase D toxin genes *BMC evolutionary biology* **18**, 194
786. Gendreau, K. L., Haney, R. A., Schwager, E. E., Wierschin, T., Stanke, M., Richards, S. *et al.* (2017) House spider genome uncovers evolutionary shifts in the diversity and expression of black widow venom proteins associated with extreme toxicity *BMC Genomics* **18**, 178
787. Young, E. F., Martin, D. W., and Geren, C. R. (1984) Neurotoxic action of the venom of the common American house spider *Physiological Zoology* **57**, 521–529
788. Garb, J. E., and Hayashi, C. Y. (2013) Molecular evolution of α-latrotoxin, the exceptionally potent vertebrate neurotoxin in black widow spider venom *Mol Biol Evol* **30**, 999–1014
789. Nei, M., and Rooney, A. P. (2005) Concerted and birth-and-death evolution of multigene families *Annual review of genetics* **39**, 121–152
790. Näsvall, J., Sun, L., Roth, J. R., and Andersson, D. I. (2012) Real-time evolution of new genes by innovation, amplification, and divergence *Science* **338**, 384–387
791. van der Meijden, A., Lobo Coelho, P., Sousa, P., and Herrel, A. (2013) Choose your weapon: defensive behavior is associated with morphology and performance in scorpions *PLoS One* **8**, e78955
792. Mebs, D. (2001) Toxicity in animals. Trends in evolution? *Toxicon* **39**, 87–96
793. Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A., and Grishin, E. V. (2009) Molecular diversity of spider venom *Biochemistry (Mosc)* **74**, 1505–1534
794. Nakashima, K., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Nakai, M., Ogawa, T., Shimohigashi, Y. *et al.* (1995) Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae

snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5605–5609
795. Duda, T. F., Jr., and Palumbi, S. R. (1999) Molecular genetics of ecological diversification: duplication and rapid evolution of toxin genes of the venomous gastropod Conus *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6820–6823
796. Bucciarelli, G. M., Alsalek, F., Kats, L. B., Green, D. B., and Shaffer, H. B. (2022) Toxic relationships and arms-race coevolution revisited *Annual review of animal biosciences* **10**, 63–80
797. Chen, J., Deng, M., He, Q., Meng, E., Jiang, L., Liao, Z. *et al.* (2008) Molecular diversity and evolution of cystine knot toxins of the tarantula Chilobrachys jingzhao *Cell Mol Life Sci* **65**, 2431–2444
798. Davies, M. S., Baganoff, M. P., Grishin, E. V., Lanthorn, T. H., Volkova, T. M., Watson, G. B. *et al.* (1992) Polyamine spider toxins are potent un-competitive antagonists of rat cortex excitatory amino acid receptors *Eur J Pharmacol* **227**, 51–56
799. O'Connor, V. M., Shamotienko, O., Grishin, E., and Betz, H. (1993) On the structure of the 'synaptosecretosome'. Evidence for a neurexin/synaptotagmin/syntaxin/Ca2+ channel complex *FEBS Lett* **326**, 255–260
800. Elleman, A. V., and Du Bois, J. (2022) Chemical and biological tools for the study of voltage-gated sodium channels in electrogenesis and nociception *Chembiochem* **23**, e202100625
801. Massensini, A. R., Suckling, J., Brammer, M. J., Moraes-Santos, T., Gomez, M. V., and Romano-Silva, M. A. (2002) Tracking sodium channels in live cells: confocal imaging using fluorescently labeled toxins *Journal of neuroscience methods* **116**, 189–196
802. Ondrus, A. E., Lee, H. L., Iwanaga, S., Parsons, W. H., Andresen, B. M., Moerner, W. E. *et al.* (2012) Fluorescent saxitoxins for live cell imaging of single voltage-gated sodium ion channels beyond the optical diffraction limit *Chemistry & biology* **19**, 902–912
803. Bingham, J. P., Bian, S., Tan, Z. Y., Takacs, Z., and Moczydlowski, E. (2006) Synthesis of a biotin derivative of iberiotoxin: binding interactions with streptavidin and the BK Ca2+-activated K+ channel expressed in a human cell line *Bioconjug Chem* **17**, 689–699
804. Kuzmenkov, A. I., and Vassilevski, A. A. (2018) Labelled animal toxins as selective molecular markers of ion channels: Applications in neurobiology and beyond *Neurosci Lett* **679**, 15–23
805. Beneski, D. A., and Catterall, W. A. (1980) Covalent labeling of protein components of the sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 639–643
806. Garcia-Calvo, M., Knaus, H. G., McManus, O. B., Giangiacomo, K. M., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1994) Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle *J Biol Chem* **269**, 676–682
807. Vázquez, J., Feigenbaum, P., Katz, G., King, V. F., Reuben, J. P., Roy-Contancin, L. *et al.* (1989) Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in sarcolemmal membranes from bovine aortic smooth muscle. Evidence for a direct association with the high conductance calcium-activated potassium channel *J Biol Chem* **264**, 20902–20909
808. Vázquez, J., Feigenbaum, P., King, V. F., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1990) Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in synaptic plasma membranes from rat brain. Evidence for a direct association with an inactivating, voltage-dependent, potassium channel *J Biol Chem* **265**, 15564–15571
809. Koschak, A., Bugianesi, R. M., Mitterdorfer, J., Kaczorowski, G. J., Garcia, M. L., and 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
810. Fraser, S. P., Onkal, R., Theys, M., Bosmans, F., and Djamgoz, M. B. A. (2021) Neonatal Na(V) 1.5 channels: pharmacological distinctiveness of a cancer-related voltage-gated sodium channel splice variant *Br J Pharmacol* 10.1111/bph.15668
811. Turner, T. J., Adams, M. E., and Dunlap, K. (1992) Calcium channels coupled to glutamate release identified by omega-Aga-IVA *Science* **258**, 310–313
812. Turner, T. J., Adams, M. E., and Dunlap, K. (1993) Multiple Ca2+ channel types coexist to regulate synaptosomal neurotransmitter release *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 9518–9522
813. Takahashi, T., and Momiyama, A. (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission *Nature* **366**, 156–158
814. Mintz, I. M., Sabatini, B. L., and Regehr, W. G. (1995) Calcium control of transmitter release at a cerebellar synapse *Neuron* **15**, 675–688
815. MacKinnon, R. (1991) Determination of the subunit stoichiometry of a voltage-activated potassium channel *Nature* **350**, 232–235
816. Das, S., Gilchrist, J., Bosmans, F., and Van Petegem, F. (2016) Binary architecture of the Nav1.2-β2 signaling complex *Elife* **5**,
817. Stewart, R. G., Marquis, M. J., Jo, S., Harris, B. J., Aberra, A. S., Cook, V. *et al.* (2025) A Kv2 inhibitor combination reveals native neuronal conductances consistent with Kv2/KvS heteromers *Elife* **13**,
818. Jaimovich, E., Ildefonse, M., Barhanin, J., Rougier, O., and Lazdunski, M. (1982) Centruroides toxin, a selective blocker of surface Na+ channels in skeletal muscle: voltage-clamp analysis and biochemical characterization of the receptor *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 3896–3900
819. Angelides, K. J., and Nutter, T. J. (1983) Preparation and characterization of fluorescent scorpion toxins from Leiurus quinquestriatus quinquestriatus as probes of the sodium channel of excitable cells *J Biol Chem* **258**, 11948–11957
820. Tseng, G. N., Sonawane, K. D., Korolkova, Y. V., Zhang, M., Liu, J., Grishin, E. V. *et al.* (2007) Probing the outer mouth structure of the HERG channel with peptide toxin footprinting and molecular modeling *Biophys J* **92**, 3524–3540
821. Kudryashova, K. S., Nekrasova, O. V., Kuzmenkov, A. I., Vassilevski, A. A., Ignatova, A. A., Korolkova, Y. V. *et al.* (2013) Fluorescent system based on bacterial expression of hybrid KcsA channels designed for Kv1.3 ligand screening and study *Analytical and bioanalytical chemistry* **405**, 2379–2389
822. Pragl, B., Koschak, A., Trieb, M., Obermair, G., Kaufmann, W. A., Gerster, U. *et al.* (2002) Synthesis, characterization, and application of Cy-dye- and Alexa-dye-labeled hongotoxin(1) analogues. The first high affinity fluorescence probes for voltage-gated K+ channels *Bioconjug Chem* **13**, 416–425
823. Hafidi, A., Beurg, M., and Dulon, D. (2005) Localization and developmental expression of BK channels in mammalian cochlear hair cells *Neuroscience* **130**, 475–484
824. Joe, E. H., and Angelides, K. J. (1993) Clustering and mobility of voltage-dependent sodium channels during myelination *J Neurosci* **13**, 2993–3005
825. Tilley, D. C., Eum, K. S., Fletcher-Taylor, S., Austin, D. C., Dupré, C., Patrón, L. A. *et al.* (2014) Chemoselective tarantula toxins report voltage activation of wild-type ion channels in live cells *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E4789–4796
826. Montnach, J., Blömer, L. A., Lopez, L., Filipis, L., Meudal, H., Lafoux, A. *et al.* (2022) In vivo spatiotemporal control of voltage-gated ion channels by using photoactivatable peptidic toxins *Nat Commun* **13**, 417

827. Ermolyuk, Y. S., Alder, F. G., Surges, R., Pavlov, I. Y., Timofeeva, Y., Kullmann, D. M. *et al.* (2013) Differential triggering of spontaneous glutamate release by P/Q-, N- and R-type Ca2+ channels *Nat Neurosci* **16**, 1754–1763
828. Lübbert, M., Goral, R. O., Keine, C., Thomas, C., Guerrero-Given, D., Putzke, T. *et al.* (2019) Ca(V)2.1 α(1) subunit expression regulates presynaptic Ca(V)2.1 abundance and synaptic strength at a central synapse *Neuron* **101**, 260–273.e266
829. Wai, D. C. C., Naseem, M. U., Mocsár, G., Babu Reddiar, S., Pan, Y., Csoti, A. *et al.* (2022) A fluorescent peptide toxin for selective visualization of the voltage-gated potassium channel K(V)1.3 *Bioconjug Chem* **33**, 2197–2212
830. Baudat, R., Montnach, J., Benoit, E., Zoukimian, C., Carvalhosa, C., Beroud, R. *et al.* (2025) Cyanine 5-huwentoxin-IV as a novel imaging probe to detect hNa(v)1.7 channel overexpressed in non-small cell lung cancer *Biochem Pharmacol* **242**, 117203
831. Changeux, J. P., Kasai, M., and Lee, C. Y. (1970) Use of a snake venom toxin to characterize the cholinergic receptor protein *Proc Natl Acad Sci U S A* **67**, 1241–1247
832. Chang, C. C. (1999) Looking back on the discovery of alpha-bungarotoxin *Journal of biomedical science* **6**, 368–375
833. Miller, C. (1995) The charybdotoxin family of K+ channel-blocking peptides *Neuron* **15**, 5–10
834. Liman, E. R., Tytgat, J., and Hess, P. (1992) Subunit stoichiometry of a mammalian K+ channel determined by construction of multimeric cDNAs *Neuron* **9**, 861–871
835. Doyle, D. A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L. *et al.* (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K+ conduction and selectivity *Science* **280**, 69–77
836. Sanguinetti, M. C., and Tristani-Firouzi, M. (2006) hERG potassium channels and cardiac arrhythmia *Nature* **440**, 463–469
837. Korolkova, Y. V., Bocharov, E. V., Angelo, K., Maslennikov, I. V., Grinenko, O. V., Lipkin, A. V. *et al.* (2002) New binding site on common molecular scaffold provides HERG channel specificity of scorpion toxin BeKm-1 *J Biol Chem* **277**, 43104–43109
838. Zhang, M., Korolkova, Y. V., Liu, J., Jiang, M., Grishin, E. V., and Tseng, G. N. (2003) BeKm-1 is a HERG-specific toxin that shares the structure with ChTx but the mechanism of action with ErgTx1 *Biophys J* **84**, 3022–3036
839. Liu, J., Zhang, M., Jiang, M., and Tseng, G. N. (2002) Structural and functional role of the extracellular s5-p linker in the HERG potassium channel *J Gen Physiol* **120**, 723–737
840. Wang, W., and MacKinnon, R. (2017) Cryo-EM structure of the open human Ether-a-go-go-related K(+) channel hERG *Cell* **169**, 422–430 e410
841. Zhao, Y., Chen, Z., Cao, Z., Li, W., and Wu, Y. (2019) Diverse structural features of potassium channels characterized by scorpion toxins as molecular probes *Molecules* **24**,
842. Thapa, P., Stewart, R., Sepela, R. J., Vivas, O., Parajuli, L. K., Lillya, M. *et al.* (2021) EVAP: A two-photon imaging tool to study conformational changes in endogenous Kv2 channels in live tissues *J Gen Physiol* **153**,
843. Randall, A., and Tsien, R. W. (1995) Pharmacological dissection of multiple types of Ca2+ channel currents in rat cerebellar granule neurons *J Neurosci* **15**, 2995–3012
844. Reid, C. A., Clements, J. D., and Bekkers, J. M. (1997) Nonuniform distribution of Ca2+ channel subtypes on presynaptic terminals of excitatory synapses in hippocampal cultures *J Neurosci* **17**, 2738–2745
845. Li, L., Bischofberger, J., and Jonas, P. (2007) Differential gating and recruitment of P/Q-, N-, and R-type Ca2+ channels in hippocampal mossy fiber boutons *J Neurosci* **27**, 13420–13429

846. Bucurenciu, I., Bischofberger, J., and Jonas, P. (2010) A small number of open Ca2+ channels trigger transmitter release at a central GABAergic synapse *Nat Neurosci* **13**, 19–21
847. Myers, B. R., Bohlen, C. J., and Julius, D. (2008) A yeast genetic screen reveals a critical role for the pore helix domain in TRP channel gating *Neuron* **58**, 362–373
848. Grandl, J., Kim, S. E., Uzzell, V., Bursulaya, B., Petrus, M., Bandell, M. *et al.* (2010) Temperature-induced opening of TRPV1 ion channel is stabilized by the pore domain *Nat Neurosci* **13**, 708–714
849. Du, J., Reznikov, L. R., Price, M. P., Zha, X. M., Lu, Y., Moninger, T. O. *et al.* (2014) Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 8961–8966
850. Baconguis, I., Bohlen, C. J., Goehring, A., Julius, D., and Gouaux, E. (2014) X-ray structure of acid-sensing ion channel 1-snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel *Cell* **156**, 717–729
851. Missler, M., and Südhof, T. C. (1998) Neurexins: three genes and 1001 products *Trends Genet* **14**, 20–26
852. Ichtchenko, K., Hata, Y., Nguyen, T., Ullrich, B., Missler, M., Moomaw, C. *et al.* (1995) Neuroligin 1: a splice site-specific ligand for beta-neurexins *Cell* **81**, 435–443
853. Südhof, T. C. (2017) Synaptic neurexin complexes: a molecular code for the logic of neural circuits *Cell* **171**, 745–769
854. Südhof, T. C. (2018) Towards an understanding of synapse formation *Neuron* **100**, 276–293
855. Sugita, S., Ichtchenko, K., Khvotchev, M., and Südhof, T. C. (1998) alpha-Latrotoxin receptor CIRL/latrophilin 1 (CL1) defines an unusual family of ubiquitous G-protein-linked receptors. G-protein coupling not required for triggering exocytosis *J Biol Chem* **273**, 32715–32724
856. Volynski, K. E., Silva, J. P., Lelianova, V. G., Atiqur Rahman, M., Hopkins, C., and Ushkaryov, Y. A. (2004) Latrophilin fragments behave as independent proteins that associate and signal on binding of LTX(N4C) *Embo j* **23**, 4423–4433
857. Anderson, G. R., Maxeiner, S., Sando, R., Tsetsenis, T., Malenka, R. C., and Südhof, T. C. (2017) Postsynaptic adhesion GPCR latrophilin-2 mediates target recognition in entorhinal-hippocampal synapse assembly *The Journal of cell biology* **216**, 3831–3846
858. Vysokov, N. V., Silva, J. P., Lelianova, V. G., Suckling, J., Cassidy, J., Blackburn, J. K. *et al.* (2018) Proteolytically released Lasso/teneurin-2 induces axonal attraction by interacting with latrophilin-1 on axonal growth cones *Elife* **7**,
859. Boucard, A. A., Ko, J., and Südhof, T. C. (2012) High affinity neurexin binding to cell adhesion G-protein-coupled receptor CIRL1/latrophilin-1 produces an intercellular adhesion complex *J Biol Chem* **287**, 9399–9413
860. Ushkaryov, Y. A., Lelianova, V., and Vysokov, N. V. (2019) Catching Latrophilin with Lasso: a universal mechanism for axonal attraction and synapse formation *Frontiers in neuroscience* **13**, 257
861. Fitches, E., Edwards, M. G., Mee, C., Grishin, E., Gatehouse, A. M., Edwards, J. P. *et al.* (2004) Fusion proteins containing insect-specific toxins as pest control agents: snowdrop lectin delivers fused insecticidal spider venom toxin to insect haemolymph following oral ingestion *J Insect Physiol* **50**, 61–71
862. Fitches, E. C., Bell, H. A., Powell, M. E., Back, E., Sargiotti, C., Weaver, R. J. *et al.* (2010) Insecticidal activity of scorpion toxin (ButaIT) and snowdrop lectin (GNA) containing fusion proteins towards pest species of different orders *Pest management science* **66**, 74–83

863. Nakasu, E. Y., Edwards, M. G., Fitches, E., Gatehouse, J. A., and Gatehouse, A. M. (2014) Transgenic plants expressing ω-ACTX-Hv1a and snowdrop lectin (GNA) fusion protein show enhanced resistance to aphids *Frontiers in plant science* **5**, 673
864. Stewart, L. M., Hirst, M., López Ferber, M., Merryweather, A. T., Cayley, P. J., and Possee, R. D. (1991) Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene *Nature* **352**, 85–88
865. Gershburg, E., Stockholm, D., Froy, O., Rashi, S., Gurevitz, M., and Chejanovsky, N. (1998) Baculovirus-mediated expression of a scorpion depressant toxin improves the insecticidal efficacy achieved with excitatory toxins *FEBS Lett* **422**, 132–136
866. Sparks, T. C., Crossthwaite, A. J., Nauen, R., Banba, S., Cordova, D., Earley, F. *et al.* (2020) Insecticides, biologics and nematicides: Updates to IRAC's mode of action classification - a tool for resistance management *Pesticide biochemistry and physiology* **167**, 104587
867. Bilgo, E., Lovett, B., Fang, W., Bende, N., King, G. F., Diabate, A. *et al.* (2017) Improved efficacy of an arthropod toxin expressing fungus against insecticide-resistant malaria-vector mosquitoes *Sci Rep* **7**, 3433
868. Lovett, B., Bilgo, E., Millogo, S. A., Ouattarra, A. K., Sare, I., Gnambani, E. J. *et al.* (2019) Transgenic Metarhizium rapidly kills mosquitoes in a malaria-endemic region of Burkina Faso *Science* **364**, 894–897
869. Fang, W., Vega-Rodríguez, J., Ghosh, A. K., Jacobs-Lorena, M., Kang, A., and St Leger, R. J. (2011) Development of transgenic fungi that kill human malaria parasites in mosquitoes *Science* **331**, 1074–1077
870. Miljanich, G. P. (2004) Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain *Current medicinal chemistry* **11**, 3029–3040
871. Lauria, P. S. S., Villarreal, C. F., and Casais, E. S. L. L. (2020) Pain modulatory properties of Phoneutria nigriventer crude venom and derived peptides: A double-edged sword *Toxicon* **185**, 120–128
872. de Souza, A. H., da Rosa, L. G., Uliano, M. R., da Silva Prado, L., Ferraz, A. G., Conter, L. U. *et al.* (2019) Evaluation of DNA damage in spinal cord and mutagenic effect of a Phα1β recombinant toxin with analgesic properties from the Phoneutria nigriventer spider *Basic & clinical pharmacology & toxicology* **124**, 615–620
873. Dib-Hajj, S. D., Rush, A. M., Cummins, T. R., Hisama, F. M., Novella, S., Tyrrell, L. *et al.* (2005) Gain-of-function mutation in Nav1.7 in familial erythromelalgia induces bursting of sensory neurons *Brain* **128**, 1847–1854
874. Revell, J. D., Lund, P. E., Linley, J. E., Metcalfe, J., Burmeister, N., Sridharan, S. *et al.* (2013) Potency optimization of Huwentoxin-IV on hNav1.7: a neurotoxin TTX-S sodium-channel antagonist from the venom of the Chinese bird-eating spider Selenocosmia huwena *Peptides* **44**, 40–46
875. Minassian, N. A., Gibbs, A., Shih, A. Y., Liu, Y., Neff, R. A., Sutton, S. W. *et al.* (2013) Analysis of the structural and molecular basis of voltage-sensitive sodium channel inhibition by the spider toxin huwentoxin-IV (μ-TRTX-Hh2a) *J Biol Chem* **288**, 22707–22720
876. Adams, G. L., Pall, P. S., Grauer, S. M., Zhou, X., Ballard, J. E., Vavrek, M. *et al.* (2022) Development of ProTx-II analogues as highly selective peptide blockers of Na(v)1.7 for the treatment of pain *J Med Chem* **65**, 485–496
877. Torres-Perez, J. V., Adamek, P., Palecek, J., Vizcaychipi, M., Nagy, I., and Varga, A. (2018) The NAv1.7 blocker protoxin II reduces burn injury-induced spinal nociceptive processing *J Mol Med (Berl)* **96**, 75–84
878. Flinspach, M., Xu, Q., Piekarz, A. D., Fellows, R., Hagan, R., Gibbs, A. *et al.* (2017) Insensitivity to pain induced by a potent selective closed-state Nav1.7 inhibitor *Sci Rep* **7**, 39662

879. Kingwell, K. (2019) Nav1.7 withholds its pain potential *Nature reviews Drug discovery* 10.1038/d41573-019-00065-0
880. Minett, M. S., Pereira, V., Sikandar, S., Matsuyama, A., Lolignier, S., Kanellopoulos, A. H. *et al.* (2015) Endogenous opioids contribute to insensitivity to pain in humans and mice lacking sodium channel Nav1.7 *Nat Commun* **6**, 8967
881. Mueller, A., Starobova, H., Morgan, M., Dekan, Z., Cheneval, O., Schroeder, C. I. *et al.* (2019) Antiallodynic effects of the selective NaV1.7 inhibitor Pn3a in a mouse model of acute postsurgical pain: evidence for analgesic synergy with opioids and baclofen *Pain* **160**, 1766–1780
882. McDermott, L. A., Weir, G. A., Themistocleous, A. C., Segerdahl, A. R., Blesneac, I., Baskozos, G. *et al.* (2019) Defining the functional role of Na(V)1.7 in human nociception *Neuron* **101**, 905–919.e908
883. Goodwin, G., and McMahon, S. B. (2021) The physiological function of different voltage-gated sodium channels in pain *Nat Rev Neurosci* **22**, 263–274
884. Xiong, Z. G., Zhu, X. M., Chu, X. P., Minami, M., Hey, J., Wei, W. L. *et al.* (2004) Neuroprotection in ischemia: blocking calcium-permeable acid-sensing ion channels *Cell* **118**, 687–698
885. Woodruff, T. M., Thundyil, J., Tang, S. C., Sobey, C. G., Taylor, S. M., and Arumugam, T. V. (2011) Pathophysiology, treatment, and animal and cellular models of human ischemic stroke *Mol Neurodegener* **6**, 11
886. Li, M., Inoue, K., Branigan, D., Kratzer, E., Hansen, J. C., Chen, J. W. *et al.* (2010) Acid-sensing ion channels in acidosis-induced injury of human brain neurons *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 1247–1260
887. McCarthy, C. A., Rash, L. D., Chassagnon, I. R., King, G. F., and Widdop, R. E. (2015) PcTx1 affords neuroprotection in a conscious model of stroke in hypertensive rats via selective inhibition of ASIC1a *Neuropharmacology* **99**, 650–657
888. Redd, M. A., Scheuer, S. E., Saez, N. J., Yoshikawa, Y., Chiu, H. S., Gao, L. *et al.* (2021) Therapeutic inhibition of acid-sensing ion channel 1a recovers heart function after ischemia-reperfusion injury *Circulation* **144**, 947–960
889. Gataullina, S., and Dulac, O. (2017) From genotype to phenotype in Dravet disease *Seizure* **44**, 58–64
890. Ogiwara, I., Miyamoto, H., Morita, N., Atapour, N., Mazaki, E., Inoue, I. *et al.* (2007) Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation *J Neurosci* **27**, 5903–5914
891. Richards, K. L., Milligan, C. J., Richardson, R. J., Jancovski, N., Grunnet, M., Jacobson, L. H. *et al.* (2018) Selective Na(V)1.1 activation rescues Dravet syndrome mice from seizures and premature death *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, E8077–e8085
892. Nunes, K. P., Wynne, B. M., Cordeiro, M. N., Borges, M. H., Richardson, M., Leite, R. *et al.* (2012) Increased cavernosal relaxation by Phoneutria nigriventer toxin, PnTx2-6, via activation at NO/cGMP signaling *International journal of impotence research* **24**, 69–76
893. Wang, D., Starr, R., Chang, W. C., Aguilar, B., Alizadeh, D., Wright, S. L. *et al.* (2020) Chlorotoxin-directed CAR T cells for specific and effective targeting of glioblastoma *Science translational medicine* **12**,
894. Butte, P. V., Mamelak, A., Parrish-Novak, J., Drazin, D., Shweikeh, F., Gangalum, P. R. *et al.* (2014) Near-infrared imaging of brain tumors using the Tumor Paint BLZ-100 to achieve near-complete resection of brain tumors *Neurosurgical focus* **36**, E1
895. Cohen, G., Burks, S. R., and Frank, J. A. (2018) Chlorotoxin — A multimodal imaging platform for targeting glioma tumors *Toxins (Basel)* **10**, 496

896. Graf, N., Mokhtari, T. E., Papayannopoulos, I. A., and Lippard, S. J. (2012) Platinum(IV)-chlorotoxin (CTX) conjugates for targeting cancer cells *Journal of inorganic biochemistry* **110**, 58–63
897. Park, T., Min, K. A., Cheong, H., Moon, C., and Shin, M. C. (2019) Genetic engineering and characterisation of chlorotoxin-fused gelonin for enhanced glioblastoma therapy *Journal of drug targeting* **27**, 950–958
898. Sun, C., Fang, C., Stephen, Z., Veiseh, O., Hansen, S., Lee, D. *et al.* (2008) Tumor-targeted drug delivery and MRI contrast enhancement by chlorotoxin-conjugated iron oxide nanoparticles *Nanomedicine (London, England)* **3**, 495–505
899. Stephen, Z. R., Chiarelli, P. A., Revia, R. A., Wang, K., Kievit, F., Dayringer, C. *et al.* (2019) Time-resolved MRI assessment of convection-enhanced delivery by targeted and nontargeted nanoparticles in a human glioblastoma mouse model *Cancer research* **79**, 4776–4786
900. Veiseh, O., Kievit, F. M., Fang, C., Mu, N., Jana, S., Leung, M. C. *et al.* (2010) Chlorotoxin bound magnetic nanovector tailored for cancer cell targeting, imaging, and siRNA delivery *Biomaterials* **31**, 8032–8042
901. Costa, P. M., Cardoso, A. L., Mendonça, L. S., Serani, A., Custódia, C., Conceição, M. *et al.* (2013) Tumor-targeted chlorotoxin-coupled nanoparticles for nucleic acid delivery to glioblastoma cells: A promising system for glioblastoma treatment *Molecular therapy Nucleic acids* **2**, e100
902. Patil, C. G., Walker, D. G., Miller, D. M., Butte, P., Morrison, B., Kittle, D. S. *et al.* (2019) Phase 1 safety, pharmacokinetics, and fluorescence imaging study of Tozuleristide (BLZ-100) in adults with newly diagnosed or recurrent gliomas *Neurosurgery* **85**, E641–e649
903. Chandy, K. G., Wulff, H., Beeton, C., Pennington, M., Gutman, G. A., and Cahalan, M. D. (2004) K+ channels as targets for specific immunomodulation *Trends Pharmacol Sci* **25**, 280–289
904. Feske, S., Skolnik, E. Y., and Prakriya, M. (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity *Nat Rev Immunol* **12**, 532–547
905. Lebrun, B., Romi-Lebrun, R., Martin-Eauclaire, M. F., Yasuda, A., Ishiguro, M., Oyama, Y. *et al.* (1997) A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K+ channels, isolated from Heterometrus spinnifer (Scorpionidae) venom *Biochem J* **328 (Pt 1)**, 321–327
906. Zhang, H., Du, M., Xie, J., Liu, X., Sun, J., Wang, W. *et al.* (2016) Autocrine-based selection of drugs that target ion channels from combinatorial venom peptide libraries *Angewandte Chemie (International ed in English)* **55**, 9306–9310
907. Tanner, M. R., Tajhya, R. B., Huq, R., Gehrmann, E. J., Rodarte, K. E., Atik, M. A. *et al.* (2017) Prolonged immunomodulation in inflammatory arthritis using the selective Kv1.3 channel blocker HsTX1[R14A] and its PEGylated analog *Clin Immunol* **180**, 45–57
908. Nicolazzo, J. A., Pan, Y., Di Stefano, I., Choy, K. H. C., Reddiar, S. B., Low, Y. L. *et al.* (2022) Blockade of microglial Kv1.3 potassium channels by the peptide HsTX1[R14A] attenuates lipopolysaccharide-mediated neuroinflammation *J Pharm Sci* **111**, 638–647
909. Reddiar, S. B., de Veer, M., Paterson, B. M., Sepehrizadeh, T., Wai, D. C. C., Csoti, A. *et al.* (2023) A biodistribution study of the radiolabeled Kv1.3-blocking peptide DOTA-HsTX1[R14A] demonstrates brain uptake in a mouse model of neuroinflammation *Mol Pharm* **20**, 255–266
910. Pan, Y., Kagawa, Y., Sun, J., Lucas, D. S. D., Takechi, R., Mamo, J. C. L. *et al.* (2023) Peripheral administration of the Kv1.3-blocking peptide HsTX1[R14A] improves cognitive performance in senescence accelerated SAMP8 mice *Neurotherapeutics* **20**, 1198–1214

911. Wang, R. E., Wang, Y., Zhang, Y., Gabrelow, C., Zhang, Y., Chi, V. *et al.* (2016) Rational design of a Kv1.3 channel-blocking antibody as a selective immunosuppressant *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 11501–11506
912. Vassilevski, A. A., and Grishin, E. V. (2011) Novel active principles from spider venom *Acta chimica Slovenica* **58**, 717–723
913. Кузьменков, А. И., Гришин, Е. В., and Василевский, А. А. (2015) Разнообразие лигандов калиевых каналов и место токсинов скорпионов среди них *Успехи биол химии* **55**, 289–350
914. Andreev, Y. A., Vassilevski, A. A., and Kozlov, S. A. (2012) Molecules to selectively target receptors for treatment of pain and neurogenic inflammation *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* **6**, 35–45
915. Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A., and Grishin, E. V. (2008) Antimicrobial peptide precursor structures suggest effective production strategies *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* **2**, 58–63
916. Reese, M. G., Eeckman, F. H., Kulp, D., and Haussler, D. (1997) Improved splice site detection in Genie *J Comput Biol* **4**, 311–323
917. Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., and von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites *Protein engineering* **10**, 1–6
918. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 *Mol Biol Evol* **30**, 2725–2729
919. Firoz, A., Malik, A., Afzal, O., and Jha, V. (2010) ContPro: A web tool for calculating amino acid contact distances in protein from 3D -structures at different distance threshold *Bioinformation* **5**, 55–57
920. Miles, A. J., Ramalli, S. G., and Wallace, B. A. (2022) DichroWeb, a website for calculating protein secondary structure from circular dichroism spectroscopic data *Protein Sci* **31**, 37–46
921. Keller, R. L. J. (2004) *The Computer Aided Resonance Assignment Tutorial*, CANTINA Verlag, Goldau, Switzerland
922. Guntert, P., and Buchner, L. (2015) Combined automated NOE assignment and structure calculation with CYANA *Journal of biomolecular NMR* **62**, 453–471
923. Suloway, C., Pulokas, J., Fellmann, D., Cheng, A., Guerra, F., Quispe, J. *et al.* (2005) Automated molecular microscopy: the new Leginon system *J Struct Biol* **151**, 41–60
924. Zheng, S. Q., Palovcak, E., Armache, J. P., Verba, K. A., Cheng, Y., and Agard, D. A. (2017) MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy *Nat Methods* **14**, 331–332
925. Zhang, K. (2016) Gctf: Real-time CTF determination and correction *J Struct Biol* **193**, 1–12
926. Kimanius, D., Forsberg, B. O., Scheres, S. H., and Lindahl, E. (2016) Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2 *Elife* **5**,
927. Heymann, J. B. (2018) Guidelines for using Bsoft for high resolution reconstruction and validation of biomolecular structures from electron micrographs *Protein Sci* **27**, 159–171
928. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 486–501
929. Afonine, P. V., Poon, B. K., Read, R. J., Sobolev, O. V., Terwilliger, T. C., Urzhumtsev, A. *et al.* (2018) Real-space refinement in PHENIX for cryo-EM and crystallography *Acta Crystallogr D Struct Biol* **74**, 531–544
930. Laskowski, R. A., Jablonska, J., Pravda, L., Varekova, R. S., and Thornton, J. M. (2018) PDBsum: Structural summaries of PDB entries *Protein Sci* **27**, 129–134

931. Abramson, J., Adler, J., Dunger, J., Evans, R., Green, T., Pritzel, A. *et al.* (2024) Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3 *Nature* **630**, 493–500
932. Beaven, G. H., and Holiday, E. R. (1952) Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids *Advances in protein chemistry* **7**, 319–386
933. Anthis, N. J., and Clore, G. M. (2013) Sequence-specific determination of protein and peptide concentrations by absorbance at 205 nm *Protein Sci* **22**, 851–858
934. Provencher, S. W. (1982) CONTIN: A general purpose constrained regularization program for inverting noisy linear algebraic and integral equations *Comput Phys Commun* **27**, 229–242
935. Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions *Journal of biomolecular NMR* **2**, 661–665
936. Lescop, E., Schanda, P., and Brutscher, B. (2007) A set of BEST triple-resonance experiments for time-optimized protein resonance assignment *J Magn Reson* **187**, 163–169
937. Solyom, Z., Schwarten, M., Geist, L., Konrat, R., Willbold, D., and Brutscher, B. (2013) BEST-TROSY experiments for time-efficient sequential resonance assignment of large disordered proteins *Journal of biomolecular NMR* **55**, 311–321
938. Wüthrich, K. (1986) *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Wiley, New York ; Chichester
939. Kovalchuk, S. I., Jensen, O. N., and Rogowska-Wrzesinska, A. (2019) FlashPack: Fast and Simple Preparation of Ultrahigh-performance Capillary Columns for LC-MS *Mol Cell Proteomics* **18**, 383–390
940. Ma, B., Zhang, K., Hendrie, C., Liang, C., Li, M., Doherty-Kirby, A. *et al.* (2003) PEAKS: powerful software for peptide de novo sequencing by tandem mass spectrometry *Rapid Commun Mass Spectrom* **17**, 2337–2342
941. Ornstein, L. (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**, 321–349
942. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227**, 680–685
943. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory,
944. Twomey, E. C., Yelshanskaya, M. V., Vassilevski, A. A., and Sobolevsky, A. I. (2018) Mechanisms of channel block in calcium-permeable AMPA receptors *Neuron* **99**, 956–968 e954
945. Egorov, T. A. (1997) Identification of cysteine residues and disulfide bonds in proteins In *Protein Structure Analysis: Preparation, Characterization, and Microsequencing*, Kamp RM, Choli-Papadopoulou T, and Wittmann-Liebold B, eds. Springer, 259–268
946. Coin, I., Beyermann, M., and Bienert, M. (2007) Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences *Nat Protoc* **2**, 3247–3256
947. Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Pease, L. R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction *Gene* **77**, 51–59
948. Nekrasova, O. V., Ignatova, A. A., Nazarova, A. I., Feofanov, A. V., Korolkova, Y. V., Boldyreva, E. F. *et al.* (2009) Recombinant Kv channels at the membrane of Escherichia coli bind specifically agitoxin2 *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* **4**, 83–91
949. Gasparian, M. E., Ostapchenko, V. G., Schulga, A. A., Dolgikh, D. A., and Kirpichnikov, M. P. (2003) Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in Escherichia coli *Protein expression and purification* **31**, 133–139

950. Goehring, A., Lee, C. H., Wang, K. H., Michel, J. C., Claxton, D. P., Baconguis, I. *et al.* (2014) Screening and large-scale expression of membrane proteins in mammalian cells for structural studies *Nat Protoc* **9**, 2574–2585
951. Kawate, T., and Gouaux, E. (2006) Fluorescence-detection size-exclusion chromatography for precrystallization screening of integral membrane proteins *Structure (London, England : 1993)* **14**, 673–681
952. Hwang, T. L., and Shaka, A. J. (1995) Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients *J Magn Reson A* **112**, 275–279
953. Dumont, J. N. (1972) Oogenesis in Xenopus laevis (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals *Journal of morphology* **136**, 153–179
954. Vorobjev, V. S. (1991) Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue *Journal of neuroscience methods* **38**, 145–150
955. Krishtal, O. A., and Pidoplichko, V. I. (1980) A receptor for protons in the nerve cell membrane *Neuroscience* **5**, 2325–2327
956. Regan, L. J. (1991) Voltage-dependent calcium currents in Purkinje cells from rat cerebellar vermis *J Neurosci* **11**, 2259–2269
957. Ishibashi, H., Rhee, J. S., and Akaike, N. (1995) Regional difference of high voltage-activated Ca2+ channels in rat CNS neurones *Neuroreport* **6**, 1621–1624
958. Avery, R. B., and Johnston, D. (1996) Multiple channel types contribute to the low-voltage-activated calcium current in hippocampal CA3 pyramidal neurons *J Neurosci* **16**, 5567–5582
959. Buldakova, S. L., Vorobjev, V. S., Sharonova, I. N., Samoilova, M. V., and Magazanik, L. G. (1999) Characterization of AMPA receptor populations in rat brain cells by the use of subunit-specific open channel blocking drug, IEM-1460 *Brain Res* **846**, 52–58
960. Roederer, M. (2002) Compensation in flow cytometry *Current protocols in cytometry* **Chapter 1**, Unit 1.14
961. Russo, C. J., and Passmore, L. A. (2014) Electron microscopy: Ultrastable gold substrates for electron cryomicroscopy *Science* **346**, 1377–1380
962. Wiegand, I., Hilpert, K., and Hancock, R. E. (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances *Nat Protoc* **3**, 163–175
963. Schachter, J., and Wyrick, P. B. (1994) Culture and isolation of Chlamydia trachomatis *Methods in enzymology* **236**, 377–390
964. Kernisant, M., Gear, R. W., Jasmin, L., Vit, J. P., and Ohara, P. T. (2008) Chronic constriction injury of the infraorbital nerve in the rat using modified syringe needle *Journal of neuroscience methods* **172**, 43–47
965. Sievers, F., and Higgins, D. G. (2014) Clustal omega *Current protocols in bioinformatics* **48**, 3.13.11–13.13.16
966. Saitou, N., and Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees *Mol Biol Evol* **4**, 406–425
967. Tamura, K., Nei, M., and Kumar, S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 11030–11035
968. Nei, M., and Gojobori, T. (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions *Mol Biol Evol* **3**, 418–426
969. Yang, Z. (2007) PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood *Mol Biol Evol* **24**, 1586–1591
970. Xu, B., and Yang, Z. (2013) PAMLX: a graphical user interface for PAML *Mol Biol Evol* **30**, 2723–2724

971. Webb, B., and Sali, A. (2016) Comparative protein structure modeling using MODELLER *Current protocols in bioinformatics* **54**, 5.6.1–5.6.37
972. Chen, X., Wang, Q., Ni, F., and 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 U S A* **107**, 11352–11357
973. Berendsen, H. J. C., van der Spoel, D., and van Drunen, R. (1995) GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation *Comput Phys Commun* **91**, 43–56
974. Schuler, L. D., Daura, X., and van Gunsteren, W. F. (2001) An improved GROMOS96 force field for aliphatic hydrocarbons in the condensed phase *J Comput Chem* **22**, 1205–1218
975. Lindorff-Larsen, K., Piana, S., Palmo, K., Maragakis, P., Klepeis, J. L., Dror, R. O. *et al.* (2010) Improved side-chain torsion potentials for the Amber ff99SB protein force field *Proteins* **78**, 1950–1958
976. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., and Hermans, J. (1981) Interaction models for water in relation to protein hydration In *Intermolecular Forces*, Pullman B, ed. Springer, Dordrecht, 331–342
977. Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water *J Chem Phys* **79**, 926–935
978. Bussi, G., Donadio, D., and Parrinello, M. (2007) Canonical sampling through velocity rescaling *J Chem Phys* **126**, 014101
979. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., and Haak, J. R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath *J Chem Phys* **81**, 3684–3690
980. Kumari, R., Kumar, R., and Lynn, A. (2014) g_mmpbsa--a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations *Journal of chemical information and modeling* **54**, 1951–1962
981. Efremov, R. G., Gulyaev, D. I., Vergoten, G., and Modyanov, N. N. (1992) Application of three-dimensional molecular hydrophobicity potential to the analysis of spatial organization of membrane domains in proteins: I. Hydrophobic properties of transmembrane segments of Na+, K(+)-ATPase *Journal of protein chemistry* **11**, 665–675
982. Efremov, R. G., Chugunov, A. O., Pyrkov, T. V., Priestle, J. P., Arseniev, A. S., and Jacoby, E. (2007) Molecular lipophilicity in protein modeling and drug design *Current medicinal chemistry* **14**, 393–415
983. Ghose, A. K., Viswanadhan, V. N., and Wendoloski, J. J. (1998) Prediction of hydrophobic (lipophilic) properties of small organic molecules using fragmental methods: an analysis of ALOGP and CLOGP methods *J Phys Chem A* **102**, 3762–3772
984. Pyrkov, T. V., Chugunov, A. O., Krylov, N. A., Nolde, D. E., and Efremov, R. G. (2009) PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, 1201–1202
985. Koromyslova, A. D., Chugunov, A. O., and Efremov, R. G. (2014) Deciphering fine molecular details of proteins' structure and function with a Protein Surface Topography (PST) method *Journal of chemical information and modeling* **54**, 1189–1199
986. Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O. *et al.* (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold *Nature* **596**, 583–589
987. Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G. *et al.* (2022) AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models *Nucleic Acids Res* **50**, D439–D444

988. Evans, R., O'Neill, M., Pritzel, A., Antropova, N., Senior, A., Green, T. *et al.* (2022) Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer *bioRxiv* 10.1101/2021.10.04.4630342021.2010.2004.463034
989. Hamada, C. (2018) Statistical analysis for toxicity studies *J Toxicol Pathol* **31**, 15–22
990. Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A., Egorov, T. A., and Grishin, E. V. (2010) Purification and characterization of biologically active peptides from spider venoms *Methods Mol Biol* **615**, 87–100
991. Blombäck, B. (1967) Derivatives of glutamine in peptides *Methods in enzymology* **11**, 398–411
992. El-Faham, A., and Albericio, F. (2011) Peptide coupling reagents, more than a letter soup *Chemical reviews* **111**, 6557–6602
993. Dawson, P. E., Muir, T. W., Clark-Lewis, I., and Kent, S. B. (1994) Synthesis of proteins by native chemical ligation *Science* **266**, 776–779
994. Amorim, F. G., Cordeiro, F. A., Pinheiro-Júnior, E. L., Boldrini-França, J., and Arantes, E. C. (2018) Microbial production of toxins from the scorpion venom: properties and applications *Applied microbiology and biotechnology* **102**, 6319–6331
995. Rivera-de-Torre, E., Rimbault, C., Jenkins, T. P., Sørensen, C. V., Damsbo, A., Saez, N. J. *et al.* (2021) Strategies for heterologous expression, synthesis, and purification of animal venom toxins *Frontiers in bioengineering and biotechnology* **9**, 811905
996. Lebendiker, M., and Danieli, T. (2017) Purification of proteins fused to maltose-binding protein *Methods Mol Biol* **1485**, 257–273
997. McCoy, J., and La Ville, E. (2001) Expression and purification of thioredoxin fusion proteins *Current protocols in protein science* **Chapter 6**, Unit 6.7
998. Kadokura, H., Katzen, F., and Beckwith, J. (2003) Protein disulfide bond formation in prokaryotes *Annu Rev Biochem* **72**, 111–135
999. LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., and McCoy, J. M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm *Biotechnology (N Y)* **11**, 187–193
1000. Odintsova, T. I., Vassilevski, A. A., Slavokhotova, A. A., Musolyamov, A. K., Finkina, E. I., Khadeeva, N. V. *et al.* (2009) A novel antifungal hevein-type peptide from Triticum kiharae seeds with a unique 10-cysteine motif *Febs j* **276**, 4266–4275
1001. Jeong, H., Barbe, V., Lee, C. H., Vallenet, D., Yu, D. S., Choi, S. H. *et al.* (2009) Genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21(DE3) *J Mol Biol* **394**, 644–652
1002. Bessette, P. H., Aslund, F., Beckwith, J., and Georgiou, G. (1999) Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13703–13708
1003. Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., and Berkmen, M. (2012) SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm *Microbial cell factories* **11**, 56
1004. Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R. *et al.* (2009) Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review *Methods in enzymology* **463**, 439–473
1005. Waugh, D. S. (2011) An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags *Protein expression and purification* **80**, 283–293
1006. Witkop, B. (1968) Chemical cleavage of proteins. Selective fragmentations and modifications reveal structure *Science* **162**, 318–326
1007. Andreev, Y. A., Kozlov, S. A., Vassilevski, A. A., and Grishin, E. V. (2010) Cyanogen bromide cleavage of proteins in salt and buffer solutions *Analytical biochemistry* **407**, 144–146

1008. Kim, Y. T., Nishii, W., Matsushima, M., Inoue, H., Ito, H., Park, S. J. *et al.* (2008) Substrate specificities of porcine and bovine enteropeptidases toward the peptide Val-(Asp)4-Lys-Ile-Val-Gly and its analogs *Biosci Biotechnol Biochem* **72**, 905–908
1009. Gasparian, M. E., Bychkov, M. L., Dolgikh, D. A., and Kirpichnikov, M. P. (2011) Strategy for improvement of enteropeptidase efficiency in tag removal processes *Protein expression and purification* **79**, 191–196
1010. Krieg, P. A., and Melton, D. A. (1984) Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs *Nucleic Acids Res* **12**, 7057–7070
1011. Wilkins, M. R., Gasteiger, E., Gooley, A. A., Herbert, B. R., Molloy, M. P., Binz, P. A. *et al.* (1999) High-throughput mass spectrometric discovery of protein post-translational modifications *J Mol Biol* **289**, 645–657
1012. Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server In *The Proteomics Protocols Handbook*, Walker JM, ed. Humana Press, Totowa, NJ 571–607
1013. Kuzmenkov, A. I., Krylov, N. A., Chugunov, A. O., Grishin, E. V., and Vassilevski, A. A. (2016) Kalium: a database of potassium channel toxins from scorpion venom *Database : the journal of biological databases and curation* **2016**,
1014. Tabakmakher, V. M., Krylov, N. A., Kuzmenkov, A. I., Efremov, R. G., and Vassilevski, A. A. (2019) Kalium 2.0, a comprehensive database of polypeptide ligands of potassium channels *Scientific data* **6**, 73
1015. Krylov, N. A., Tabakmakher, V. M., Yureva, D. A., Vassilevski, A. A., and Kuzmenkov, A. I. (2023) Kalium 3.0 is a comprehensive depository of natural, artificial, and labeled polypeptides acting on potassium channels *Protein Sci* **32**, e4776
1016. Kovařík, F., Fet, V., Gantenbein, B., Graham, M. R., Yağmur, E. A., Šťáhlavský, F. *et al.* (2022) A revision of the genus Mesobuthus Vachon, 1950, with a description of 14 new species (Scorpiones: Buthidae) *Euscorpius*
1017. Conesa, A., Gotz, S., Garcia-Gomez, J. M., Terol, J., Talon, M., and Robles, M. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**, 3674–3676
1018. Legros, C., Schulze, C., Garcia, M. L., Bougis, P. E., Martin-Eauclaire, M. F., and Pongs, O. (2002) Engineering-specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channels into KcsA *Biochemistry* **41**, 15369–15375
1019. Gao, B., Peigneur, S., Tytgat, J., and Zhu, S. (2010) A potent potassium channel blocker from Mesobuthus eupeus scorpion venom *Biochimie* **92**, 1847–1853
1020. Gao, B., Peigneur, S., Dalziel, J., Tytgat, J., and Zhu, S. (2011) Molecular divergence of two orthologous scorpion toxins affecting potassium channels *Comparative biochemistry and physiology Part A, Molecular & integrative physiology* **159**, 313–321
1021. Romi-Lebrun, R., Lebrun, B., Martin-Eauclaire, M. F., Ishiguro, M., Escoubas, P., Wu, F. Q. *et al.* (1997) Purification, characterization, and synthesis of three novel toxins from the Chinese scorpion Buthus martensi, which act on K+ channels *Biochemistry* **36**, 13473–13482
1022. Kuzmenkov, A. I., Vassilevski, A. A., Kudryashova, K. S., Nekrasova, O. V., Peigneur, S., Tytgat, J. *et al.* (2015) Variability of potassium channel blockers in Mesobuthus eupeus scorpion venom with focus on Kv1.1: An integrated transcriptomic and proteomic study *J Biol Chem* **290**, 12195–12209
1023. Kuzmenkov, A. I., Nekrasova, O. V., Peigneur, S., Tabakmakher, V. M., Gigolaev, A. M., Fradkov, A. F. *et al.* (2018) K(V)1.2 channel-specific blocker from Mesobuthus eupeus scorpion venom: Structural basis of selectivity *Neuropharmacology* **143**, 228–238
1024. Кузьменков, А. И., Пеньёр, С., Титгат, Я., and Василевский, А. А. (2019) Фармакологическая характеристика пептидных лигандов калиевых каналов

MeKTx13-2 и MeKTx 13-3 из яда скорпиона Mesobuthus eupeus *Рос физиол журн* **105**, 1452–1462
1025. Dudina, E. E., Korolkova, Y. V., Bocharova, N. E., Koshelev, S. G., Egorov, T. A., Huys, I. *et al.* (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
1026. Abdel-Mottaleb, Y., Clynen, E., Jalali, A., Bosmans, F., Vatanpour, H., Schoofs, L. *et al.* (2006) The first potassium channel toxin from the venom of the Iranian scorpion Odonthobuthus doriae *FEBS Lett* **580**, 6254–6258
1027. Kuzmenkov, A. I., Peigneur, S., Chugunov, A. O., Tabakmakher, V. M., Efremov, R. G., Tytgat, J. *et al.* (2017) C-Terminal residues in small potassium channel blockers OdK1 and OSK3 from scorpion venom fine-tune the selectivity *Biochimica et biophysica acta Proteins and proteomics* **1865**, 465–472
1028. Renisio, J. G., Romi-Lebrun, R., Blanc, E., Bornet, O., Nakajima, T., and Darbon, H. (2000) Solution structure of BmKTX, a K+ blocker toxin from the Chinese scorpion Buthus Martensi *Proteins* **38**, 70–78
1029. Calderon, R. O., Attema, B., and DeVries, G. H. (1995) Lipid composition of neuronal cell bodies and neurites from cultured dorsal root ganglia *J Neurochem* **64**, 424–429
1030. Fitzner, D., Bader, J. M., Penkert, H., Bergner, C. G., Su, M., Weil, M. T. *et al.* (2020) Cell-type- and brain-region-resolved mouse brain lipidome *Cell reports* **32**, 108132
1031. Chen, Z., Hu, Y., Hu, J., Yang, W., Sabatier, J. M., De Waard, M. *et al.* (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
1032. Han, S., Yi, H., Yin, S. J., Chen, Z. Y., Liu, H., Cao, Z. J. *et al.* (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
1033. Luna-Ramírez, K., Bartok, A., Restano-Cassulini, R., Quintero-Hernández, V., Coronas, F. I., Christensen, J. *et al.* (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
1034. Wang, X., Umetsu, Y., Gao, B., Ohki, S., and Zhu, S. (2015) Mesomartoxin, a new K(v)1.2-selective scorpion toxin interacting with the channel selectivity filter *Biochem Pharmacol* **93**, 232–239
1035. M'Barek, S., Mosbah, A., Sandoz, G., Fajloun, Z., Olamendi-Portugal, T., Rochat, H. *et al.* (2003) Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from Pandinus imperator that acts on K+ channels *Eur J Biochem* **270**, 3583–3592
1036. Gigolaev, A. M., Kuzmenkov, A. I., Peigneur, S., Tabakmakher, V. M., Pinheiro-Junior, E. L., Chugunov, A. O. *et al.* (2020) Tuning scorpion toxin selectivity: switching from K(V)1.1 to K(V)1.3 *Front Pharmacol* **11**, 1010
1037. Табакмахер, В. М., Кузьменков, А. И., Гиголаев, А. М., Пиньейро-Жуниор, Э. Л., Пеньёр, С., Ефремов, Р. Г. *et al.* (2021) Искусственный пептидный лиганд калиевого канала KV1.1 с высокой селективностью *Рос физиол журн* **107**, 584–604
1038. Гиголаев, А. М., Пиньейро-Жуниор, Э. Л., Пеньёр, С., Титгат, Я., and Василевский, А. А. (2022) Высокоаффинный KV1.2-селективный пептид *Рос физиол журн* **108**, 1627–1638
1039. Campos, M. L., Lião, L. M., Alves, E. S. F., Migliolo, L., Dias, S. C., and Franco, O. L. (2018) A structural perspective of plant antimicrobial peptides *Biochem J* **475**, 3359–3375
1040. Nolde, S. B., Vassilevski, A. A., Rogozhin, E. A., Barinov, N. A., Balashova, T. A., Samsonova, O. V. *et al.* (2011) Disulfide-stabilized helical hairpin structure and activity

of a novel antifungal peptide EcAMP1 from seeds of barnyard grass (Echinochloa crus-galli) *J Biol Chem* **286**, 25145–25153
1041. Oparin, P. B., Mineev, K. S., Dunaevsky, Y. E., Arseniev, A. S., Belozersky, M. A., Grishin, E. V. *et al.* (2012) Buckwheat trypsin inhibitor with helical hairpin structure belongs to a new family of plant defence peptides *Biochem J* **446**, 69–77
1042. Опарин, П. Б. (2014) *α-Гарпинины — защитные пептиды растений*, ИБХ РАН
1043. Möller, C., Rahmankhah, S., Lauer-Fields, J., Bubis, J., Fields, G. B., and Marí, F. (2005) A novel conotoxin framework with a helix-loop-helix (Cs alpha/alpha) fold *Biochemistry* **44**, 15986–15996
1044. Utkina, L. L., Andreev, Y. A., Rogozhin, E. A., Korostyleva, T. V., Slavokhotova, A. A., Oparin, P. B. *et al.* (2013) Genes encoding 4-Cys antimicrobial peptides in wheat Triticum kiharae Dorof. et Migush.: multimodular structural organization, instraspecific variability, distribution and role in defence *Febs j* **280**, 3594–3608
1045. Nirthanan, S., Pil, J., Abdel-Mottaleb, Y., Sugahara, Y., Gopalakrishnakone, P., Joseph, J. S. *et al.* (2005) Assignment of voltage-gated potassium channel blocking activity to kappa-KTx1.3, a non-toxic homologue of kappa-hefutoxin-1, from Heterometrus spinifer venom *Biochem Pharmacol* **69**, 669–678
1046. Selvakumar, P., Fernández-Mariño, A. I., Khanra, N., He, C., Paquette, A. J., Wang, B. *et al.* (2022) Structures of the T cell potassium channel Kv1.3 with immunoglobulin modulators *Nat Commun* **13**, 3854
1047. Imperial, J. S., Chen, P., Sporning, A., Terlau, H., Daly, N. L., Craik, D. J. *et al.* (2008) Tyrosine-rich conopeptides affect voltage-gated K+ channels *J Biol Chem* **283**, 23026–23032
1048. Orts, D. J., Peigneur, S., Madio, B., Cassoli, J. S., Montandon, G. G., Pimenta, A. M. *et al.* (2013) Biochemical and electrophysiological characterization of two sea anemone type 1 potassium toxins from a geographically distant population of Bunodosoma caissarum *Marine drugs* **11**, 655–679
1049. ElFessi-Magouri, R., Peigneur, S., Othman, H., Srairi-Abid, N., ElAyeb, M., Tytgat, J. *et al.* (2015) Characterization of Kbot21 reveals novel side chain interactions of scorpion toxins inhibiting voltage-gated potassium channels *PLoS One* **10**, e0137611
1050. Berkut, A. A., Usmanova, D. R., Peigneur, S., Oparin, P. B., Mineev, K. S., Odintsova, T. I. *et al.* (2014) Structural similarity between defense peptide from wheat and scorpion neurotoxin permits rational functional design *J Biol Chem* **289**, 14331–14340
1051. Berkut, A. A., Chugunov, A. O., Mineev, K. S., Peigneur, S., Tabakmakher, V. M., Krylov, N. A. *et al.* (2019) Protein surface topography as a tool to enhance the selective activity of a potassium channel blocker *J Biol Chem* **294**, 18349–18359
1052. Tabakmakher, V. M., Gigolaev, A. M., Peigneur, S., Krylov, N. A., Tytgat, J., Chugunov, A. O. *et al.* (2021) Potassium channel blocker crafted by α-hairpinin scaffold engineering *Biophys J* **120**, 2471–2481
1053. Gigolaev, A. M., Lushpa, V. A., Pinheiro-Junior, E. L., Tabakmakher, V. M., Peigneur, S., Ignatova, A. A. *et al.* (2022) Artificial pore blocker acts specifically on voltage-gated potassium channel isoform K(V)1.6 *J Biol Chem* **298**, 102467
1054. Vandendriessche, T., Kopljar, I., Jenkins, D. P., Diego-Garcia, E., Abdel-Mottaleb, Y., Vermassen, E. *et al.* (2012) Purification, molecular cloning and functional characterization of HelaTx1 (Heterometrus laoticus): the first member of a new κ-KTX subfamily *Biochem Pharmacol* **83**, 1307–1317
1055. Drakopoulou, E., Zinn-Justin, S., Guenneugues, M., Gilqin, B., Menez, A., and Vita, C. (1996) Changing the structural context of a functional beta-hairpin. Synthesis and characterization of a chimera containing the curaremimetic loop of a snake toxin in the scorpion alpha/beta scaffold *J Biol Chem* **271**, 11979–11987

1056. Narahashi, T. (2008) Tetrodotoxin: a brief history *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* **84**, 147–154
1057. Catterall, W. A., Ray, R., and Morrow, C. S. (1976) Membrane potential dependent binding of scorpion toxin to action potential Na+ ionophore *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 2682–2686
1058. Suetterlin, K., Mannikko, R., and Hanna, M. G. (2014) Muscle channelopathies: recent advances in genetics, pathophysiology and therapy *Curr Opin Neurol* **27**, 583–590
1059. Cavel-Greant, D., Lehmann-Horn, F., and Jurkat-Rott, K. (2012) The impact of permanent muscle weakness on quality of life in periodic paralysis: a survey of 66 patients *Acta Myol* **31**, 126–133
1060. Matthews, E., Portaro, S., Ke, Q., Sud, R., Haworth, A., Davis, M. B. *et al.* (2011) Acetazolamide efficacy in hypokalemic periodic paralysis and the predictive role of genotype *Neurology* **77**, 1960–1964
1061. Jurkat-Rott, K., Weber, M. A., Fauler, M., Guo, X. H., Holzherr, B. D., Paczulla, A. *et al.* (2009) K+-dependent paradoxical membrane depolarization and Na+ overload, major and reversible contributors to weakness by ion channel leaks *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4036–4041
1062. Matthews, E., Labrum, R., Sweeney, M. G., Sud, R., Haworth, A., Chinnery, P. F. *et al.* (2009) Voltage sensor charge loss accounts for most cases of hypokalemic periodic paralysis *Neurology* **72**, 1544–1547
1063. Cannon, S. C. (2010) Voltage-sensor mutations in channelopathies of skeletal muscle *J Physiol* **588**, 1887–1895
1064. Yang, N., and Horn, R. (1995) Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels *Neuron* **15**, 213–218
1065. Catterall, W. A. (2012) Voltage-gated sodium channels at 60: structure, function and pathophysiology *J Physiol* **590**, 2577–2589
1066. Starace, D. M., and Bezanilla, F. (2004) A proton pore in a potassium channel voltage sensor reveals a focused electric field *Nature* **427**, 548–553
1067. Tombola, F., Pathak, M. M., and Isacoff, E. Y. (2005) Voltage-sensing arginines in a potassium channel permeate and occlude cation-selective pores *Neuron* **45**, 379–388
1068. Sokolov, S., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2007) Gating pore current in an inherited ion channelopathy *Nature* **446**, 76–78
1069. Struyk, A. F., and Cannon, S. C. (2007) A Na+ channel mutation linked to hypokalemic periodic paralysis exposes a proton-selective gating pore *J Gen Physiol* **130**, 11–20
1070. Struyk, A. F., Markin, V. S., Francis, D., and Cannon, S. C. (2008) Gating pore currents in DIIS4 mutations of NaV1.4 associated with periodic paralysis: saturation of ion flux and implications for disease pathogenesis *J Gen Physiol* **132**, 447–464
1071. Sokolov, S., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2008) Depolarization-activated gating pore current conducted by mutant sodium channels in potassium-sensitive normokalemic periodic paralysis *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 19980–19985
1072. Mannikko, R., Shenkarev, Z. O., Thor, M. G., Berkut, A. A., Myshkin, M. Y., Paramonov, A. S. *et al.* (2018) Spider toxin inhibits gating pore currents underlying periodic paralysis *Proc Natl Acad Sci U S A* **115**, 4495–4500
1073. Jurkat-Rott, K., Mitrovic, N., Hang, C., Kouzmekine, A., Iaizzo, P., Herzog, J. *et al.* (2000) Voltage-sensor sodium channel mutations cause hypokalemic periodic paralysis type 2 by enhanced inactivation and reduced current *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9549–9554
1074. Kuzmenkin, A., Muncan, V., Jurkat-Rott, K., Hang, C., Lerche, H., Lehmann-Horn, F. *et al.* (2002) Enhanced inactivation and pH sensitivity of Na(+) channel mutations causing hypokalaemic periodic paralysis type II *Brain* **125**, 835–843

1075. Sokolov, S., Scheuer, T., and Catterall, W. A. (2010) Ion permeation and block of the gating pore in the voltage sensor of NaV1.4 channels with hypokalemic periodic paralysis mutations *J Gen Physiol* **136**, 225–236
1076. Jurkat-Rott, K., Groome, J., and Lehmann-Horn, F. (2012) Pathophysiological role of omega pore current in channelopathies *Front Pharmacol* **3**, 112
1077. Мышкин, М. Ю., Парамонов, А. С., Кульбацкий, Д. С., Люкманова, Е. Н., Кирпичников, М. П., and Шенкарёв, З. О. (2017) Подход "разделяй и властвуй" для структурных исследований мультидоменных ионных каналов на примере изолированных потенциал-чувствительных доменов каналов KV2.1 и NAV1.4 человека *Биоорган химия* **43**, 608–619
1078. Cai, T., Luo, J., Meng, E., Ding, J., Liang, S., Wang, S. *et al.* (2015) Mapping the interaction site for the tarantula toxin hainantoxin-IV (β-TRTX-Hn2a) in the voltage sensor module of domain II of voltage-gated sodium channels *Peptides* **68**, 148–156
1079. Pan, X., Li, Z., Zhou, Q., Shen, H., Wu, K., Huang, X. *et al.* (2018) Structure of the human voltage-gated sodium channel Na(v)1.4 in complex with β1 *Science* **362**,
1080. Xiao, Y., Blumenthal, K., and Cummins, T. R. (2014) Gating-pore currents demonstrate selective and specific modulation of individual sodium channel voltage-sensors by biological toxins *Mol Pharmacol* **86**, 159–167
1081. Shen, H., Li, Z., Jiang, Y., Pan, X., Wu, J., Cristofori-Armstrong, B. *et al.* (2018) Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins *Science* **362**,
1082. Billen, B., Vassilevski, A., Nikolsky, A., Tytgat, J., and Grishin, E. (2008) Two novel sodium channel inhibitors from Heriaeus melloteei spider venom differentially interacting with mammalian channel's isoforms *Toxicon* **52**, 309–317
1083. Никольский, А. С., Биллен, Б., Василевский, А. А., Филькин, С. Ю., Титгат, Я., and Гришин, Е. В. (2009) Потенциал-зависимые натриевые каналы — мишени действия токсинов из яда паука Heriaeus melloteei *Биол мембраны* **26**, 249–257
1084. Berkut, A. A., Peigneur, S., Myshkin, M. Y., Paramonov, A. S., Lyukmanova, E. N., Arseniev, A. S. *et al.* (2015) Structure of membrane-active toxin from crab spider Heriaeus melloteei suggests parallel evolution of sodium channel gating modifiers in Araneomorphae and Mygalomorphae *J Biol Chem* **290**, 492–504
1085. Myshkin, M. Y., Mannikko, R., Krumkacheva, O. A., Kulbatskii, D. S., Chugunov, A. O., Berkut, A. A. *et al.* (2019) Cell-free expression of sodium channel domains for pharmacology studies. Noncanonical spider toxin binding site in the second voltage-sensing domain of human Na(v)1.4 channel *Front Pharmacol* **10**, 953
1086. Мышкин, М. Ю., Парамонов, А. С., Кульбацкий, Д. С., Суркова, Е. А., Беркут, А. А., Василевский, А. А. *et al.* (2021) Потенциалчувствительный домен из третьего повтора канала скелетных мышц человека NaV1.4 — новая мишень действия «вольт-сенсорных» токсинов из ядов пауков *Acta Naturae* **13**, 134–139
1087. Cohen, C. J., Bale, T. A., Ertel, E. A., Warren, V. A., and Smith, M. M. (1993) μ-Aga-IV: a spider toxin specific for insect Na channels *Biophys J* **64**, A4, M–PM–B1
1088. Billen, B., Vassilevski, A., Nikolsky, A., Debaveye, S., Tytgat, J., and Grishin, E. (2010) Unique bell-shaped voltage-dependent modulation of Na+ channel gating by novel insect-selective toxins from the spider Agelena orientalis *J Biol Chem* **285**, 18545–18554
1089. Li, H. M., Zhao, T., Jin, L., Wang, M., Zhang, Y., and Wang, D. C. (1999) A series of bioactivity-variant neurotoxins from scorpion Buthus martensii Karsch: purification, crystallization and crystallographic analysis *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **55**, 341–344
1090. Benkhadir, K., Kharrat, R., Cestele, S., Mosbah, A., Rochat, H., El Ayeb, M. *et al.* (2004) Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal

role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels *Peptides* **25**, 151–161
1091. Arnon, T., Potikha, T., Sher, D., Elazar, M., Mao, W., Tal, T. *et al.* (2005) BjalphaIT: a novel scorpion alpha-toxin selective for insects--unique pharmacological tool *Insect biochemistry and molecular biology* **35**, 187–195
1092. Houming Wu, G. W., Xiaolin Huang, Fahu He, Shaokai Jiang (1999) Purification, characterization and structural study of the neuro-peptides from scorpion Buthus martensi Karsch *Pure Appl Chem* **71**, 1157–1162
1093. Borchani, L., Stankiewicz, M., Kopeyan, C., Mansuelle, P., Kharrat, R., Cestele, S. *et al.* (1997) Purification, structure and activity of three insect toxins from Buthus occitanus tunetanus venom *Toxicon* **35**, 365–382
1094. Luo, M. J., Xiong, Y. M., Wang, M., Wang, D. C., and Chi, C. W. (1997) Purification and sequence determination of a new neutral mammalian neurotoxin from the scorpion Buthus martensii Karsch *Toxicon* **35**, 723–731
1095. Cao, Z. Y., Mi, Z. M., Cheng, G. F., Shen, W. Q., Xiao, X., Liu, X. M. *et al.* (2004) Purification and characterization of a new peptide with analgesic effect from the scorpion Buthus martensi Karch *J Pept Res* **64**, 33–41
1096. Martin, M. F., and Rochat, H. (1984) Purification of thirteen toxins active on mice from the venom of the North African scorpion Buthus occitanus tunetanus *Toxicon* **22**, 279–291
1097. Волкова, Т. М., Гарсиа, А. Ф., Тележинская, И. Н., Потапенко, Н. А., and Гришин, Е. В. (1984) Аминокислотная последовательность двух нейротоксинов из яда скорпиона Buthus eupeus *Биоорган химия* **10**, 979–982
1098. Волкова, Т. М., Гарсиа, А. Ф., Тележинская, И. Н., Потапенко, Н. А., and Гришин, Е. В. (1985) Изучение нейротоксинов из яда среднеазиатского скорпиона Buthus eupeus *Биоорган химия* **11**, 1445–1456
1099. Landon, C., Cornet, B., Bonmatin, J. M., Kopeyan, C., Rochat, H., Vovelle, F. *et al.* (1996) 1H-NMR-derived secondary structure and the overall fold of the potent anti-mammal and anti-insect toxin III from the scorpion Leiurus quinquestriatus quinquestriatus *Eur J Biochem* **236**, 395–404
1100. Tugarinov, V., Kustanovich, I., Zilberberg, N., Gurevitz, M., and Anglister, J. (1997) Solution structures of a highly insecticidal recombinant scorpion alpha-toxin and a mutant with increased activity *Biochemistry* **36**, 2414–2424
1101. Krimm, I., Gilles, N., Sautière, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Gordon, D. *et al.* (1999) NMR structures and activity of a novel alpha-like toxin from the scorpion Leiurus quinquestriatus hebraeus *J Mol Biol* **285**, 1749–1763
1102. Zhu, S., Bosmans, F., and Tytgat, J. (2004) Adaptive evolution of scorpion sodium channel toxins *J Mol Evol* **58**, 145–153
1103. Weinberger, H., Moran, Y., Gordon, D., Turkov, M., Kahn, R., and Gurevitz, M. (2010) Positions under positive selection--key for selectivity and potency of scorpion alpha-toxins *Mol Biol Evol* **27**, 1025–1034
1104. Gurevitz, M., Gordon, D., Ben-Natan, S., Turkov, M., and Froy, O. (2001) Diversification of neurotoxins by C-tail 'wiggling': a scorpion recipe for survival *Faseb j* **15**, 1201–1205
1105. Mason, P. E., Neilson, G. W., Dempsey, C. E., Barnes, A. C., and Cruickshank, J. M. (2003) The hydration structure of guanidinium and thiocyanate ions: implications for protein stability in aqueous solution *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4557–4561
1106. Zhu, J., Tong, X., Cao, C., Wu, G., Zhang, N., and Wu, H. (2010) Solution structure of BmKalphaTx11, a toxin from the venom of the Chinese scorpion Buthus martensii Karsch *Biochem Biophys Res Commun* **391**, 627–633

1107. Torrance, G. M., Leader, D. P., Gilbert, D. R., and Milner-White, E. J. (2009) A novel main chain motif in proteins bridged by cationic groups: the niche *J Mol Biol* **385**, 1076–1086
1108. Watson, J. D., and Milner-White, E. J. (2002) A novel main-chain anion-binding site in proteins: the nest. A particular combination of phi,psi values in successive residues gives rise to anion-binding sites that occur commonly and are found often at functionally important regions *J Mol Biol* **315**, 171–182
1109. Richardson, J. S., Getzoff, E. D., and Richardson, D. C. (1978) The beta bulge: a common small unit of nonrepetitive protein structure *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 2574–2578
1110. Lee, C. W., Bae, C., Lee, J., Ryu, J. H., Kim, H. H., Kohno, T. *et al.* (2012) Solution structure of kurtoxin: a gating modifier selective for Cav3 voltage-gated Ca(2+) channels *Biochemistry* **51**, 1862–1873
1111. Chugunov, A. O., Koromyslova, A. D., Berkut, A. A., Peigneur, S., Tytgat, J., Polyansky, A. A. *et al.* (2013) Modular organization of alpha-toxins from scorpion venom mirrors domain structure of their targets, sodium channels *J Biol Chem* **288**, 19014–19027
1112. Vreugdenhil, M., Hoogland, G., van Veelen, C. W., and Wadman, W. J. (2004) Persistent sodium current in subicular neurons isolated from patients with temporal lobe epilepsy *Eur J Neurosci* **19**, 2769–2778
1113. Wolff, M., Johannesen, K. M., Hedrich, U. B. S., Masnada, S., Rubboli, G., Gardella, E. *et al.* (2017) Genetic and phenotypic heterogeneity suggest therapeutic implications in SCN2A-related disorders *Brain* **140**, 1316–1336
1114. Mantegazza, M., Cestele, S., and Catterall, W. A. (2021) Sodium channelopathies of skeletal muscle and brain *Physiol Rev* **101**, 1633–1689
1115. Tikhonova, T. B., Sharkov, A. A., Zhorov, B. S., and Vassilevski, A. A. (2024) Diverse biophysical mechanisms in voltage-gated sodium channel Na(v)1.4 variants associated with myotonia *FASEB J* **38**, e23883
1116. Dib-Hajj, S. D., Yang, Y., Black, J. A., and Waxman, S. G. (2013) The Na(V)1.7 sodium channel: from molecule to man *Nat Rev Neurosci* **14**, 49–62
1117. Kuldyushev, N. A., Berkut, A. A., Peigneur, S., Tytgat, J., Grishin, E. V., and Vassilevski, A. A. (2017) Design of sodium channel ligands with defined selectivity - a case study in scorpion alpha-toxins *FEBS Lett* **591**, 3414–3420
1118. Kuldyushev, N. A., Mineev, K. S., Berkut, A. A., Peigneur, S., Arseniev, A. S., Tytgat, J. *et al.* (2018) Refined structure of BeM9 reveals arginine hand, an overlooked structural motif in scorpion toxins affecting sodium channels *Proteins* **86**, 1117–1122
1119. Mineev, K. S., Kuzmenkov, A. I., Arseniev, A. S., and Vassilevski, A. A. (2021) Structure of MeuNaTxalpha-1 toxin from scorpion venom highlights the importance of the nest motif *Proteins* 10.1002/prot.26074
1120. Черных, М. А., Кульдюшев, Н. А., Пеньёр, С., Беркут, А. А., Титгат, Я., Ефремов, Р. Г. *et al.* (2021) Производное нейротоксина скорпиона BeM9, селективное в отношении потенциал-чувствительных натриевых каналов насекомых *Биоорган химия* **47**, 495–505
1121. Mineev, K. S., Chernykh, M. A., Motov, V. V., Prudnikova, D. A., Pavlenko, D. M., Kuzmenkov, A. I. *et al.* (2023) A scorpion toxin affecting sodium channels shows double cis-trans isomerism *FEBS Lett* **597**, 2358–2368
1122. Hucho, T., and Levine, J. D. (2007) Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology *Neuron* **55**, 365–376
1123. Waxman, S. G., and Zamponi, G. W. (2014) Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets *Nat Neurosci* **17**, 153–163
1124. Isensee, J., and Hucho, T. (2019) High-content imaging of immunofluorescently labeled TRPV1-positive sensory neurons *Methods Mol Biol* **1987**, 111–124

1125. Andres, C., Meyer, S., Dina, O. A., Levine, J. D., and Hucho, T. (2010) Quantitative automated microscopy (QuAM) elucidates growth factor specific signalling in pain sensitization *Molecular pain* **6**, 98
1126. Isensee, J., Diskar, M., Waldherr, S., Buschow, R., Hasenauer, J., Prinz, A. *et al.* (2014) Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons *Journal of cell science* **127**, 216–229
1127. Isensee, J., Schild, C., Schwede, F., and Hucho, T. (2017) Crosstalk from cAMP to ERK1/2 emerges during postnatal maturation of nociceptive neurons and is maintained during aging *Journal of cell science* **130**, 2134–2146
1128. Cardoso, F. C., Dekan, Z., Rosengren, K. J., Erickson, A., Vetter, I., Deuis, J. R. *et al.* (2015) Identification and characterization of ProTx-III [μ-TRTX-Tp1a], a new voltage-gated sodium channel inhibitor from venom of the tarantula Thrixopelma pruriens *Mol Pharmacol* **88**, 291–303
1129. Zou, X., Wu, Y., Chen, J., Zhao, F., Zhang, F., Yu, B. *et al.* (2017) Activation of sodium channel by a novel α-scorpion toxin, BmK NT2, stimulates ERK1/2 and CERB phosphorylation through a Ca(2+) dependent pathway in neocortical neurons *International journal of biological macromolecules* **104**, 70–77
1130. van Cann, M., Kuzmenkov, A., Isensee, J., Andreev-Andrievskiy, A., Peigneur, S., Khusainov, G. *et al.* (2021) Scorpion toxin MeuNaTxα-1 sensitizes primary nociceptors by selective modulation of voltage-gated sodium channels *Febs j* **288**, 2418–2435
1131. Logunov, D. V. (2013) A new species of the genus Alopecosa Simon, 1885 (Aranei: Lycosidae) from south-east Kazakhstan *Arthropoda Selecta* **22**, 163–169
1132. Fisyunov, A., Pluzhnikov, K., Molyavka, A., Grishin, E., Lozovaya, N., and Krishtal, O. (2005) Novel spider toxin slows down the activation kinetics of P-type Ca2+ channels in Purkinje neurons of rat *Toxicology* **207**, 129–136
1133. Pluzhnikov, K., Vassilevski, A., Korolkova, Y., Fisyunov, A., Iegorova, O., Krishtal, O. *et al.* (2007) omega-Lsp-IA, a novel modulator of P-type Ca2+ channels *Toxicon* **50**, 993–1004
1134. North, R. A. (2002) Molecular physiology of P2X receptors *Physiol Rev* **82**, 1013–1067
1135. Mansoor, S. E., Lu, W., Oosterheert, W., Shekhar, M., Tajkhorshid, E., and Gouaux, E. (2016) X-ray structures define human P2X(3) receptor gating cycle and antagonist action *Nature* **538**, 66–71
1136. Chen, C. C., Akopian, A. N., Sivilotti, L., Colquhoun, D., Burnstock, G., and Wood, J. N. (1995) A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons *Nature* **377**, 428–431
1137. Cockayne, D. A., Hamilton, S. G., Zhu, Q. M., Dunn, P. M., Zhong, Y., Novakovic, S. *et al.* (2000) Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice *Nature* **407**, 1011–1015
1138. Souslova, V., Cesare, P., Ding, Y., Akopian, A. N., Stanfa, L., Suzuki, R. *et al.* (2000) Warm-coding deficits and aberrant inflammatory pain in mice lacking P2X3 receptors *Nature* **407**, 1015–1017
1139. Shinoda, M., Ozaki, N., Asai, H., Nagamine, K., and Sugiura, Y. (2005) Changes in P2X3 receptor expression in the trigeminal ganglion following monoarthritis of the temporomandibular joint in rats *Pain* **116**, 42–51
1140. Guedon, J. M., Longo, G., Majuta, L. A., Thomspon, M. L., Fealk, M. N., and Mantyh, P. W. (2016) Dissociation between the relief of skeletal pain behaviors and skin hypersensitivity in a model of bone cancer pain *Pain* **157**, 1239–1247
1141. Yegutkin, G. G., Guerrero-Toro, C., Kilinc, E., Koroleva, K., Ishchenko, Y., Abushik, P. *et al.* (2016) Nucleotide homeostasis and purinergic nociceptive signaling in rat meninges in migraine-like conditions *Purinergic Signal* **12**, 561–574

1142. Abdulqawi, R., Dockry, R., Holt, K., Layton, G., McCarthy, B. G., Ford, A. P. *et al.* (2015) P2X3 receptor antagonist (AF-219) in refractory chronic cough: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 study *Lancet* **385**, 1198–1205
1143. Pijacka, W., Moraes, D. J., Ratcliffe, L. E., Nightingale, A. K., Hart, E. C., da Silva, M. P. *et al.* (2016) Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension *Nat Med* **22**, 1151–1159
1144. Garceau, D., and Chauret, N. (2019) BLU-5937: A selective P2X3 antagonist with potent anti-tussive effect and no taste alteration *Pulm Pharmacol Ther* **56**, 56–62
1145. Giniatullin, R., and Nistri, A. (2013) Desensitization properties of P2X3 receptors shaping pain signaling *Front Cell Neurosci* **7**, 245
1146. Sokolova, E., Skorinkin, A., Moiseev, I., Agrachev, A., Nistri, A., and Giniatullin, R. (2006) Experimental and modeling studies of desensitization of P2X3 receptors *Mol Pharmacol* **70**, 373–382
1147. Pankratov Yu, V., Lalo, U. V., Dashkin, A. N., and Krishtal, A. (2001) Heterogeneity of the functional expression of P2X3 and P2X2/3 receptors in the primary nociceptive neurons of rat *Neurochem Res* **26**, 993–1000
1148. Ford, K. K., Matchett, M., Krause, J. E., and Yu, W. (2005) The P2X3 antagonist P1, P5-di[inosine-5'] pentaphosphate binds to the desensitized state of the receptor in rat dorsal root ganglion neurons *J Pharmacol Exp Ther* **315**, 405–413
1149. Lazarowski, E. R., Shea, D. A., Boucher, R. C., and Harden, T. K. (2003) Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule *Mol Pharmacol* **63**, 1190–1197
1150. Seminario-Vidal, L., Lazarowski, E. R., and Okada, S. F. (2009) Assessment of extracellular ATP concentrations *Methods Mol Biol* **574**, 25–36
1151. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., and Charpentier, E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity *Science* **337**, 816–821
1152. Shinoda, M., Kawashima, K., Ozaki, N., Asai, H., Nagamine, K., and Sugiura, Y. (2007) P2X3 receptor mediates heat hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain *The journal of pain* **8**, 588–597
1153. Kinnamon, S., and Finger, T. (2022) The role of ATP and purinergic receptors in taste signaling *Handbook of experimental pharmacology* **275**, 91–107
1154. Richards, D., Gever, J. R., Ford, A. P., and Fountain, S. J. (2019) Action of MK-7264 (gefapixant) at human P2X3 and P2X2/3 receptors and in vivo efficacy in models of sensitisation *Br J Pharmacol* **176**, 2279–2291
1155. Chan, A. C., and Carter, P. J. (2010) Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation *Nat Rev Immunol* **10**, 301–316
1156. Mazzuca, M., Heurteaux, C., Alloui, A., Diochot, S., Baron, A., Voilley, N. *et al.* (2007) A tarantula peptide against pain via ASIC1a channels and opioid mechanisms *Nat Neurosci* **10**, 943–945
1157. Li, P., Zhang, Z., Liao, Q., Meng, E., Mwangi, J., Lai, R. *et al.* (2020) LCTX-F2, a novel potentiator of coagulation factors from the spider venom of Lycosa singoriensis *Front Pharmacol* **11**, 896
1158. Yuan, F., Li, S., Huang, B., Hu, Y., Zeng, X., Peng, Y. *et al.* (2023) Molecular mechanism by which spider-driving peptide potentiates coagulation factors *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **166**, 115421
1159. Du, C., Yuan, F., Zhang, Z., He, Z., Liu, G., Hou, W. *et al.* (2025) Spider-derived peptide LCTx-F2 suppresses ASIC channels by occupying the acidic pocket *J Biol Chem* **301**, 108286

1160. Grishin, E. V., Savchenko, G. A., Vassilevski, A. A., Korolkova, Y. V., Boychuk, Y. A., Viatchenko-Karpinski, V. Y. *et al.* (2010) Novel peptide from spider venom inhibits P2X3 receptors and inflammatory pain *Ann Neurol* **67**, 680–683
1161. Savchenko, G. A., Volkova, T. M., Vasilevskii, A. A., Korol'kova, Y. V., Grishin, E. V., A., B. Y. *et al.* (2011) Purinergic membrane receptors as targets for the effect of purotoxin 1, a component of venom of spiders from the Geolycosa genus *Neurophysiology* **42**, 387–391
1162. Kabanova, N. V., Vassilevski, A. A., Rogachevskaja, O. A., Bystrova, M. F., Korolkova, Y. V., Pluzhnikov, K. A. *et al.* (2012) Modulation of P2X3 receptors by spider toxins *Biochim Biophys Acta* **1818**, 2868–2875
1163. Oparin, P., Khokhlova, O., Cherkashin, A., Nadezhdin, K., Palikov, V., Palikova, Y. *et al.* (2025) Potent painkiller from spider venom antagonizes P2X3 receptors without dysgeusia *Mol Ther* **33**, 771–785
1164. Chudakov, D. M., Matz, M. V., Lukyanov, S., and Lukyanov, K. A. (2010) Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues *Physiol Rev* **90**, 1103–1163
1165. Auguste, P., Hugues, M., Gravé, B., Gesquière, J. C., Maes, P., Tartar, A. *et al.* (1990) Leiurotoxin I (scyllatoxin), a peptide ligand for Ca2(+)-activated K+ channels. Chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization *J Biol Chem* **265**, 4753–4759
1166. Choquet, D., and Korn, H. (1992) Mechanism of 4-aminopyridine action on voltage-gated potassium channels in lymphocytes *J Gen Physiol* **99**, 217–240
1167. Karlsson, E., Eaker, D., and Ponterius, G. (1972) Modification of amino groups in Naja naja neurotoxins and the preparation of radioactive derivatives *Biochim Biophys Acta* **257**, 235–248
1168. Chandna, R., Tae, H. S., Seymour, V. A. L., Chathrath, S., Adams, D. J., and Kini, R. M. (2019) Drysdalin, an antagonist of nicotinic acetylcholine receptors highlights the importance of functional rather than structural conservation of amino acid residues *FASEB bioAdvances* **1**, 115–131
1169. Baranov, M. S., Lukyanov, K. A., Borissova, A. O., Shamir, J., Kosenkov, D., Slipchenko, L. V. *et al.* (2012) Conformationally locked chromophores as models of excited-state proton transfer in fluorescent proteins *Journal of the American Chemical Society* **134**, 6025–6032
1170. Utkin, Y. N., Weise, C., Kasheverov, I. E., Andreeva, T. V., Kryukova, E. V., Zhmak, M. N. *et al.* (2012) Azemiopsin from Azemiops feae viper venom, a novel polypeptide ligand of nicotinic acetylcholine receptor *J Biol Chem* **287**, 27079–27086
1171. Denisova, K. R., Orlov, N. A., Yakimov, S. A., Kryukova, E. A., Dolgikh, D. A., Kirpichnikov, M. P. *et al.* (2022) GFP-margatoxin, a genetically encoded fluorescent ligand to probe affinity of Kv1.3 channel blockers *International journal of molecular sciences* **23**,
1172. Primak, A. L., Orlov, N. A., Peigneur, S., Tytgat, J., Ignatova, A. A., Denisova, K. R. *et al.* (2023) AgTx2-GFP, fluorescent blocker targeting pharmacologically important K(v)1.x (x = 1, 3, 6) channels *Toxins (Basel)* **15**, 229
1173. Ignatova, A. A., Kryukova, E. V., Novoseletsky, V. N., Kazakov, O. V., Orlov, N. A., Korabeynikova, V. N. *et al.* (2024) New high-affinity peptide ligands for Kv1.2 channel: selective blockers and fluorescent probes *Cells* **13**,
1174. Iunusova, V. A., Orlov, N. A., Nekrasova, O. V., Feofanov, A. V., Vassilevski, A. A., and Kuzmenkov, A. I. (2025) Targeting prokaryotic ion channel by a chimera of fluorescent protein and artificial peptide toxin *Biochim Biophys Acta Biomembr* **1867**, 184458
1175. Kuzmenkov, A. I., Nekrasova, O. V., Kudryashova, K. S., Peigneur, S., Tytgat, J., Stepanov, A. V. *et al.* (2016) Fluorescent protein-scorpion toxin chimera is a convenient molecular tool for studies of potassium channels *Sci Rep* **6**, 33314

1176. Kasheverov, I. E., Kuzmenkov, A. I., Kudryavtsev, D. S., Chudetskiy, I. S., Shelukhina, I. V., Barykin, E. P. *et al.* (2021) Snake toxins labeled by green fluorescent protein or its synthetic chromophore are new probes for nicotinic acetylcholine receptors *Front Mol Biosci* **8**, 753283
1177. Кузьменков, А. И., Чудецкий, И. С., Кудрявцев, Д. С., Кашеверов, И. Е., Цетлин, В. И., and Василевский, А. А. (2025) Молекулярные зонды для визуализации никотинового ацетилхолинового рецептора на основе трехпетельных токсинов змей и красного флуоресцентного белка *Биоорган химия* **51**, 853–862
1178. Dubovskii, P. V., Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A., Feofanov, A. V., Grishin, E. V., and Efremov, R. G. (2015) Latarcins: versatile spider venom peptides *Cell Mol Life Sci* **72**, 4501–4522
1179. Kuzmenkov, A. I., Sachkova, M. Y., Kovalchuk, S. I., Grishin, E. V., and Vassilevski, A. A. (2016) Lachesana tarabaevi, an expert in membrane-active toxins *Biochem J* **473**, 2495–2506
1180. Epand, R. F., Maloy, W. L., Ramamoorthy, A., and Epand, R. M. (2010) Probing the "charge cluster mechanism" in amphipathic helical cationic antimicrobial peptides *Biochemistry* **49**, 4076–4084
1181. Conlon, J. M. (2011) Structural diversity and species distribution of host-defense peptides in frog skin secretions *Cell Mol Life Sci* **68**, 2303–2315
1182. Vignal, E., Chavanieu, A., Roch, P., Chiche, L., Grassy, G., Calas, B. *et al.* (1998) Solution structure of the antimicrobial peptide ranalexin and a study of its interaction with perdeuterated dodecylphosphocholine micelles *Eur J Biochem* **253**, 221–228
1183. Park, S., Park, S. H., Ahn, H. C., Kim, S., Kim, S. S., Lee, B. J. *et al.* (2001) Structural study of novel antimicrobial peptides, nigrocins, isolated from Rana nigromaculata *FEBS Lett* **507**, 95–100
1184. Nicolas, P., Vanhoye, D., and Amiche, M. (2003) Molecular strategies in biological evolution of antimicrobial peptides *Peptides* **24**, 1669–1680
1185. Dubovskii, P. V., Vassilevski, A. A., Samsonova, O. V., Egorova, N. S., Kozlov, S. A., Feofanov, A. V. *et al.* (2011) Novel lynx spider toxin shares common molecular architecture with defense peptides from frog skin *FEBS J* **278**, 4382–4393
1186. Goraya, J., Knoop, F. C., and Conlon, J. M. (1998) Ranatuerins: antimicrobial peptides isolated from the skin of the American bullfrog, Rana catesbeiana *Biochem Biophys Res Commun* **250**, 589–592
1187. Suzuki, S., Ohe, Y., Okubo, T., Kakegawa, T., and Tatemoto, K. (1995) Isolation and characterization of novel antimicrobial peptides, rugosins A, B and C, from the skin of the frog, Rana rugosa *Biochem Biophys Res Commun* **212**, 249–254
1188. Jin, L. L., Li, Q., Song, S. S., Feng, K., Zhang, D. B., Wang, Q. Y. *et al.* (2009) Characterization of antimicrobial peptides isolated from the skin of the Chinese frog, Rana dybowskii *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **154**, 174–178
1189. Wright, G. D. (2007) The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity *Nat Rev Microbiol* **5**, 175–186
1190. Ganz, T., and Lehrer, R. I. (1995) Defensins *Pharmacol Ther* **66**, 191–205
1191. Senn, L., Hammerschlag, M. R., and Greub, G. (2005) Therapeutic approaches to Chlamydia infections *Expert Opin Pharmacother* **6**, 2281–2290
1192. Atkinson, T. P., Balish, M. F., and Waites, K. B. (2008) Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of Mycoplasma pneumoniae infections *FEMS Microbiol Rev* **32**, 956–973
1193. McGowin, C. L., and Totten, P. A. (2017) The unique microbiology and molecular pathogenesis of Mycoplasma genitalium *J Infect Dis* **216**, S382–S388

1194. Unemo, M., Bradshaw, C. S., Hocking, J. S., de Vries, H. J. C., Francis, S. C., Mabey, D. *et al.* (2017) Sexually transmitted infections: challenges ahead *Lancet Infect Dis* **17**, e235–e279
1195. Fassi Fehri, L., Wroblewski, H., and Blanchard, A. (2007) Activities of antimicrobial peptides and synergy with enrofloxacin against Mycoplasma pulmonis *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 468–474
1196. Huang, G. T., Zhang, H. B., Kim, D., Liu, L., and Ganz, T. (2002) A model for antimicrobial gene therapy: demonstration of human beta-defensin 2 antimicrobial activities in vivo *Hum Gene Ther* **13**, 2017–2025
1197. Lazarev, V. N., Parfenova, T. M., Gularyan, S. K., Misyurina, O. Y., Akopian, T. A., and Govorun, V. M. (2002) Induced expression of melittin, an antimicrobial peptide, inhibits infection by Chlamydia trachomatis and Mycoplasma hominis in a HeLa cell line *Int J Antimicrob Agents* **19**, 133–137
1198. Lazarev, V. N., Stipkovits, L., Biro, J., Miklodi, D., Shkarupeta, M. M., Titova, G. A. *et al.* (2004) Induced expression of the antimicrobial peptide melittin inhibits experimental infection by Mycoplasma gallisepticum in chickens *Microbes Infect* **6**, 536–541
1199. Lazarev, V. N., Shkarupeta, M. M., Titova, G. A., Kostrjukova, E. S., Akopian, T. A., and Govorun, V. M. (2005) Effect of induced expression of an antimicrobial peptide melittin on Chlamydia trachomatis and Mycoplasma hominis infections in vivo *Biochem Biophys Res Commun* **338**, 946–950
1200. Lazarev, V. N., Polina, N. F., Shkarupeta, M. M., Kostrjukova, E. S., Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A. *et al.* (2011) Spider venom peptides for gene therapy of Chlamydia infection *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 5367–5369
1201. Polina, N. F., Shkarupeta, M. M., Popenko, A. S., Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A., Grishin, E. V. *et al.* (2012) Cyto-insectotoxin 1a from Lachesana tarabaevi spider venom inhibits Chlamydia trachomatis infection *Probiotics Antimicrob Proteins* **4**, 208–216
1202. Lazarev, V. N., Shkarupeta, M. M., Polina, N. F., Kostrjukova, E. S., Vassilevski, A. A., Kozlov, S. A. *et al.* (2013) Antimicrobial peptide from spider venom inhibits Chlamydia trachomatis infection at an early stage *Arch Microbiol* **195**, 173–179
1203. Полина, Н. Ф. (2015) *Биологическая активность антимикробных пептидов из яда паука Lachesana tarabaevi на модели инфекции Chlamydia trachomatis*, НИИ ФХМ ФМБА
1204. Kuhn-Nentwig, L. (2003) Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods *Cell Mol Life Sci* **60**, 2651–2668
1205. Santos, A. D., Imperial, J. S., Chaudhary, T., Beavis, R. C., Chait, B. T., Hunsperger, J. P. *et al.* (1992) Heterodimeric structure of the spider toxin omega-agatoxin IA revealed by precursor analysis and mass spectrometry *J Biol Chem* **267**, 20701–20705
1206. Kuhn-Nentwig, L., Schaller, J., Kampfer, U., Imboden, H., Malli, H., and Nentwig, W. (2000) A lysine rich C-terminal tail is directly involved in the toxicity of CSTX-1, a neurotoxic peptide from the venom of the spider Cupiennius salei *Arch Insect Biochem Physiol* **44**, 101–111
1207. Huang, Y., Huang, J., and Chen, Y. (2010) Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: relationships of structure and function *Protein Cell* **1**, 143–152
1208. Villegas, E., Adachi-Akahane, S., Bosmans, F., Tytgat, J., Nakajima, T., and Corzo, G. (2008) Biochemical characterization of cysteine-rich peptides from Oxyopes sp. venom that block calcium ion channels *Toxicon* **52**, 228–236
1209. Cordeiro Mdo, N., de Figueiredo, S. G., Valentim Ado, C., Diniz, C. R., von Eickstedt, V. R., Gilroy, J. *et al.* (1993) Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider Phoneutria nigriventer (Keys) *Toxicon* **31**, 35–42

1210. Richardson, M., Pimenta, A. M., Bemquerer, M. P., Santoro, M. M., Beirao, P. S., Lima, M. E. *et al.* (2006) Comparison of the partial proteomes of the venoms of Brazilian spiders of the genus Phoneutria *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **142**, 173–187
1211. Qiao, P., Zuo, X. P., Chai, Z. F., and Ji, Y. H. (2004) The cDNA and genomic DNA organization of a novel toxin SHT-I from spider Ornithoctonus huwena *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **36**, 656–660
1212. Pineda, S. S., Wilson, D., Mattick, J. S., and King, G. F. (2012) The lethal toxin from Australian funnel-web spiders is encoded by an intronless gene *PLoS One* **7**, e43699
1213. Krapcho, K. J., Kral, R. M., Jr., Vanwagenen, B. C., Eppler, K. G., and Morgan, T. K. (1995) Characterization and cloning of insecticidal peptides from the primitive weaving spider Diguetia canities *Insect Biochem Mol Biol* **25**, 991–1000
1214. Araya, R. A., Maurstad, M. F., Wilson, D., Rash, L. D., Mobli, M., Jakobsen, K. S. *et al.* (2026) Ancient origin and dynamic evolution of bivalent spider toxins *Mol Biol Evol* 10.1093/molbev/msag076
1215. Данилевич, В. Н., and Гришин, Е. В. (2000) Хромосомные гены нейротоксинов паука каракурта не содержат инронов *Биоорган химия* **26**, 933–939
1216. Banyai, L., and Patthy, L. (2004) Evidence that human genes of modular proteins have retained significantly more ancestral introns than their fly or worm orthologues *FEBS Lett* **565**, 127–132
1217. Vinogradov, A. E. (2004) Compactness of human housekeeping genes: selection for economy or genomic design? *Trends Genet* **20**, 248–253
1218. Zhang, L., Falla, T., Wu, M., Fidai, S., Burian, J., Kay, W. *et al.* (1998) Determinants of recombinant production of antimicrobial cationic peptides and creation of peptide variants in bacteria *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 674–680
1219. Kozlov, S. A., and Grishin, E. V. (2007) The universal algorithm of maturation for secretory and excretory protein precursors *Toxicon* **49**, 721–726
1220. Vogel, C., Bashton, M., Kerrison, N. D., Chothia, C., and Teichmann, S. A. (2004) Structure, function and evolution of multidomain proteins *Curr Opin Struct Biol* **14**, 208–216
1221. Toke, O., Banoczi, Z., Kiraly, P., Heinzmann, R., Burck, J., Ulrich, A. S. *et al.* (2011) A kinked antimicrobial peptide from Bombina maxima. I. Three-dimensional structure determined by NMR in membrane-mimicking environments *Eur Biophys J* **40**, 447–462
1222. Beschiaschvili, G., and Seelig, J. (1990) Melittin binding to mixed phosphatidylglycerol/phosphatidylcholine membranes *Biochemistry* **29**, 52–58
1223. Wieprecht, T., Dathe, M., Beyermann, M., Krause, E., Maloy, W. L., MacDonald, D. L. *et al.* (1997) Peptide hydrophobicity controls the activity and selectivity of magainin 2 amide in interaction with membranes *Biochemistry* **36**, 6124–6132
1224. Wu, D. D., and Zhang, Y. P. (2013) Evolution and function of de novo originated genes *Mol Phylogenet Evol* **67**, 541–545
1225. Froy, O., Sagiv, T., Poreh, M., Urbach, D., Zilberberg, N., and Gurevitz, M. (1999) Dynamic diversification from a putative common ancestor of scorpion toxins affecting sodium, potassium, and chloride channels *J Mol Evol* **48**, 187–196
1226. Alami, M., Ceard, B., Legros, C., Bougis, P. E., and Martin-Eauclaire, M. F. (2006) Genomic characterisation of the toxin Amm VIII from the scorpion Androctonus mauretanicus mauretanicus *Toxicon* **47**, 531–536
1227. Sachkova, M. Y., Slavokhotova, A. A., Grishin, E. V., and Vassilevski, A. A. (2014) Genes and evolution of two-domain toxins from lynx spider venom *FEBS Lett* **588**, 740–745
1228. Nadezhdin, K. D., Romanovskaia, D. D., Sachkova, M. Y., Oparin, P. B., Kovalchuk, S. I., Grishin, E. V. *et al.* (2017) Modular toxin from the lynx spider Oxyopes takobius: Structure of spiderine domains in solution and membrane-mimicking environment *Protein Sci* **26**, 611–616

1229. Luddecke, T., Hurka, S., Dresler, J., Lubcke, T., von Wirth, V., Lochnit, G. *et al.* (2025) Comparative venomics suggests an evolutionary adaption of spider venom from predation to defense *Commun Biol* **8**, 1496
1230. Zhang, Y., Chen, J., Tang, X., Wang, F., Jiang, L., Xiong, X. *et al.* (2010) Transcriptome analysis of the venom glands of the Chinese wolf spider Lycosa singoriensis *Zoology (Jena)* **113**, 10–18
1231. Schalle, J., Kampfer, U., Schurch, S., Kuhn-Nentwig, L., Haeberli, S., and Nentwig, W. (2001) CSTX-9, a toxic peptide from the spider Cupiennius salei: amino acid sequence, disulphide bridge pattern and comparison with other spider toxins containing the cystine knot structure *Cell Mol Life Sci* **58**, 1538–1545
1232. Chua, M., and Betz, W. J. (1991) Characterization of ion channels on the surface membrane of adult rat skeletal muscle *Biophys J* **59**, 1251–1260
1233. Wehner, F., Bondarava, M., ter Veld, F., Endl, E., Nurnberger, H. R., and Li, T. (2006) Hypertonicity-induced cation channels *Acta Physiol (Oxf)* **187**, 21–25
1234. Gerber, U., and Gahwiler, B. H. (1991) Cobalt blocks postsynaptic responses induced by neurotransmitters in the hippocampus in vitro *Neurosci Lett* **134**, 53–56
1235. Kleyman, T. R., and Cragoe, E. J., Jr. (1988) Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport *J Membr Biol* **105**, 1–21
1236. Tang, C. M., Presser, F., and Morad, M. (1988) Amiloride selectively blocks the low threshold (T) calcium channel *Science* **240**, 213–215
1237. Ecault, E., and Sauviat, M. P. (1991) Characterization of the palytoxin-induced sodium conductance in frog skeletal muscle *Br J Pharmacol* **102**, 523–529
1238. Wu, C. H. (2009) Palytoxin: membrane mechanisms of action *Toxicon* **54**, 1183–1189
1239. Artigas, P., and Gadsby, D. C. (2006) Ouabain affinity determining residues lie close to the Na/K pump ion pathway *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 12613–12618
1240. Bechinger, B., and Lohner, K. (2006) Detergent-like actions of linear amphipathic cationic antimicrobial peptides *Biochim Biophys Acta* **1758**, 1529–1539
1241. Jones, K. H., and Senft, J. A. (1985) An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide *J Histochem Cytochem* **33**, 77–79
1242. Cancherini, D. V., Franca, G. S., and de Souza, S. J. (2010) The role of exon shuffling in shaping protein-protein interaction networks *BMC Genomics* **11 Suppl 5**, S11
1243. Akiva, P., Toporik, A., Edelheit, S., Peretz, Y., Diber, A., Shemesh, R. *et al.* (2006) Transcription-mediated gene fusion in the human genome *Genome Res* **16**, 30–36
1244. Sachkova, M. Y., Slavokhotova, A. A., Grishin, E. V., and Vassilevski, A. A. (2014) Structure of the yellow sac spider Cheiracanthium punctorium genes provides clues to evolution of insecticidal two-domain knottin toxins *Insect Mol Biol* **23**, 527–538
1245. Agwa, A. J., Blomster, L. V., Craik, D. J., King, G. F., and Schroeder, C. I. (2018) Efficient enzymatic ligation of inhibitor cystine knot spider venom peptides: Using sortase A to form double-knottins that probe voltage-gated sodium channel NaV1.7 *Bioconjug Chem* **29**, 3309–3319
1246. Twomey, E. C., Yelshanskaya, M. V., Grassucci, R. A., Frank, J., and Sobolevsky, A. I. (2016) Elucidation of AMPA receptor-stargazin complexes by cryo-electron microscopy *Science* **353**, 83–86
1247. Paoletti, P., Ellis-Davies, G. C. R., and Mourot, A. (2019) Optical control of neuronal ion channels and receptors *Nat Rev Neurosci* **20**, 514–532
1248. Laprell, L., Repak, E., Franckevicius, V., Hartrampf, F., Terhag, J., Hollmann, M. *et al.* (2015) Optical control of NMDA receptors with a diffusible photoswitch *Nat Commun* **6**, 8076

1249. Hartrampf, F. W. W., Barber, D. M., Gottschling, K., Leippe, P., Hollmann, M., and Trauner, D. (2017) Development of a photoswitchable antagonist of NMDA receptors *Tetrahedron* **73**, 4905–4912
1250. Geoffroy, C., Berraud-Pache, R., Cheron, N., McCort-Tranchepain, I., Doria, J., Paoletti, P. *et al.* (2024) Reversible control of native GluN2B-containing NMDA receptors with visible light *ACS Chem Neurosci* **15**, 3321–3343
1251. Stawski, P., Sumser, M., and Trauner, D. (2012) A photochromic agonist of AMPA receptors *Angewandte Chemie (International ed in English)* **51**, 5748–5751
1252. Barber, D. M., Liu, S. A., Gottschling, K., Sumser, M., Hollmann, M., and Trauner, D. (2017) Optical control of AMPA receptors using a photoswitchable quinoxaline-2,3-dione antagonist *Chem Sci* **8**, 611–615
1253. Leippe, P., Donthamsetti, P., Ko, T., Stanley, C., Isacoff, E., and Trauner, D. (2024) Cell-specific optical control of AMPA glutamate receptors with a photoswitchable tethered antagonist *Angewandte Chemie (International ed in English)* **63**, e202411181
1254. Bahring, R., Bowie, D., Benveniste, M., and Mayer, M. L. (1997) Permeation and block of rat GluR6 glutamate receptor channels by internal and external polyamines *J Physiol* **502 (Pt 3)**, 575–589
1255. Tikhonova, T. B., Barygin, O. I., Gmiro, V. E., Tikhonov, D. B., and Magazanik, L. G. (2008) Organic blockers escape from trapping in the AMPA receptor channels by leaking into the cytoplasm *Neuropharmacology* **54**, 653–664
1256. Twomey, E. C., and Sobolevsky, A. I. (2018) Structural mechanisms of gating in ionotropic glutamate receptors *Biochemistry* **57**, 267–276
1257. Nikolaev, M., Gataulina, E., Fedorova, I., Baleeva, N., Baranov, M., Vassilevski, A. *et al.* (2025) Optical control of calcium-permeable AMPA receptors by azobenzene-spermines *Br J Pharmacol* **182**, 5173–5191
1258. Gutman, G. A., Chandy, K. G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L. A. *et al.* (2005) International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels *Pharmacol Rev* **57**, 473–508