

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»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора химических наук

Москва — 2026

Работа выполнена в лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН)

Официальные оппоненты:

Островский Михаил Аркадьевич, д.б.н.,
академик РАН, заведующий кафедрой
молекулярной физиологии биологического
факультета МГУ, заведующий лабораторией
физико-химических основ рецепции
Института биохимической физики
им. Н.М. Эмануэля РАН

Кочетков Сергей Николаевич, д.х.н.,
академик РАН, заведующий лабораторией
молекулярных основ действия
физиологически активных соединений
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН

Кузнецов Никита Александрович, д.х.н.,
член-корр. РАН, заведующий лабораторией
генетических технологий
Института химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт цитологии
Российской академии наук

Защита диссертации состоится в 11 ч 11 ноября 2026 г. на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН по адресу: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ИБХ РАН и на сайте:
<https://www.ibch.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2026 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования:

В настоящее время сложилась область знаний, посвященная всестороннему исследованию природных токсинов — *токсикология*. Одним из основоположников этой области был академик Евгений Васильевич Гришин, учитель и наставник автора этих строк. До середины XX века главной движущей силой в исследованиях ядов была потребность в противоядиях. С 1970-х гг. фокус сместился на применение токсинов для изучения молекулярной организации нервной системы. α -Бунгаротоксин (α -BgTx) был использован для выделения никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR), а тетродотоксин (TTX), сакситоксин (STX) и токсины скорпионов — для характеристики потенциал-чувствительных натриевых (Na^+) каналов (Na_v). В XXI веке ведущие токсикологи занимаются поиском кандидатов в лекарства. Важнейшим достижением стала разработка анальгетика на основе токсина морского моллюска. Таким образом, актуальность изучения ядов и токсинов обусловлена возможностью получения на их основе уникальных исследовательских инструментов и создания лекарств.

Степень разработанности темы исследования:

Яду паукообразных в токсикологии отводится особое место. Мы уже упомянули токсины скорпионов, использованные для характеристики Na^+ каналов. Ацилполиамины из яда пауков-«кругопрядов» применяют для изучения глутаматных рецепторов (GluR). α -Латротоксин (α -LTX) из яда каракурта послужил раскрытию молекулярной организации синапсов и механизма секреции нейромедиаторов. Харибдотоксин (CTX) из яда желтого палестинского скорпиона помог в исследованиях строения калиевых (K^+) каналов, а ханатоксин 1 из яда чилийского розового птицеда — в изучении механизма их активации. Наконец, современная номенклатура кальциевых (Ca^{2+}) каналов основана на использовании ω -агатоксина IV из яда американского воронкового паука.

Яд паукообразных представляется наиболее богатым источником природных токсинов ввиду огромного видового (свыше 50 тысяч видов, способных производить яд) и молекулярного разнообразия (десятки и сотни компонентов в одном яде). 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. Это ионные каналы и нейрорецепторы, участвующие в передаче нервных импульсов, но и другие белки. В последнее время, в том числе с нашей подачи, популярна формула «к любому рецептору в нервной системе (или: к любому ионному каналу) найдется свой токсин».

Цель и задачи работы:

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 шести видов пауков и двух видов скорпионов. Установлена аминокислотная последовательность нескольких сотен токсинов паукообразных. Определена биологическая активность нескольких десятков токсинов. Получено несколько десятков рекомбинантных токсинов и их аналогов, изучена их биологическая активность, в том числе на молекулярных мишенях.

Открыто семейство защитных пептидов растений α -гарпининов, структурно сходных с токсинами скорпионов. Получены селективные блокаторы потенциал-чувствительных K^+ каналов (K_v). Впервые показано, что природные токсины способны ингибировать « ω -токи» в мутантных Na^+ каналах. Впервые получен лиганд потенциал-чувствительного домена (ПЧД) I повтора Na^+ каналов. Охарактеризована новая группа селективных модуляторов Na^+ каналов насекомых с уникальными фармакологическими свойствами. Показано, что токсины скорпионов способны активировать внутриклеточные сигнальные каскады нейронов. Получен уникальный «мягкий» ингибитор Ca^{2+} каналов Р-типа, замедляющий их активацию. Открыты пуротоксины — первые в мире природные селективные ингибиторы P2X3 рецепторов. 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, 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 светоправляемые поровые блокаторы GluR AMPA-типа.

Теоретическая и практическая значимость:

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 (α -NaTx), обнаружены особые структурные мотивы, определяющие укладку их «модуля специфичности». Предложены способы предсказания и изменения селективности α -NaTx.

Получены высокоаффинные и селективные лиганды ионных каналов и 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. Они могут быть использованы как молекулярные инструменты для изучения структуры и функции перечисленных белков, их физиологической роли и участия в заболеваниях. Создан новый класс молекулярных исследовательских инструментов — слитные конструкторы из флуоресцентных белков и нейротоксинов (FP-Tx). Показана их применимость для визуализации потенциал-чувствительных и лиганд-активируемых ионных каналов и поиска новых лигандов. На основе полученных структурных данных создан другой класс исследовательских инструментов — светуправляемые поровые блокаторы GluR AMPA-типа. Показана их применимость для управления функцией рецепторов на срезах мозга.

Блокаторы $K_v1.1$, 1.2 и 1.6 могут использоваться для создания лекарств от атаксии и эпилепсии. Блокаторы $K_v1.3$ в настоящее время разрабатываются для терапии 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. 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, 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 (МС), спектроскопии кругового дихроизма (КД). 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 применением 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 marikovskiyi*, *Agelena orientalis*, *Cheiracanthium punctatorium*, *Heriades melloteei*, *Lachesana tarabaei*, *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 Nm-3 — ингибитор активации Na^+ каналов, воздействующий на потенциал-чувствительный домен I повтора.
8. Nm-3 угнетает ω -токи, возникающие у мутантных Na^+ каналов $Nav1.4$ 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 Р-типа ($\text{Ca}_v2.1$), замедляющий процесс их активации.
15. Из яда пауков получены пуротоксины — селективные ингибиторы пуринергических рецепторов млекопитающих P2X_3 , проявляющие высокую антиноцицептивную активность в болевых моделях на животных.
16. Получены слитные конструкторы, 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 светууправляемые блокаторы Ca^{2+} -проницаемых глутаматных рецепторов АМРА-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. Многие результаты были проверены и подтверждены другими исследователями, о чем можно узнать по спискам цитирования соответствующих публикаций. Некоторые результаты находят практическую реализацию. Выдвинутые нами гипотезы благоприятно восприняты научным сообществом. Результаты докладывались на множестве российских и международных конференций.

Публикации и патенты

По результатам работы опубликовано 80 работ, включая 77 статей в рецензируемых научных журналах, а также 5 патентных заявок.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 581 странице, содержит 129 рисунков и 70 таблиц, имеет традиционную структуру и состоит из разделов: введения, основной части, включающей обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 1258 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Обзор литературы

Основные разделы касаются медицинского значения, молекулярного состава, низкомолекулярных и белковых компонентов яда паукообразных, а также многих групп пептидных компонентов: цитолитических и антимикробных пептидов, токсинов, воздействующих на K^+ , Na^+ , Ca^{2+} каналы, болевые рецепторы, двудоменных токсинов и ряда других. Кроме того, освещаются темы биосинтеза и эволюции токсинов паукообразных, токсинов как молекулярных инструментов исследования нервной системы, возможностей практического использования токсинов паукообразных.

2. Материалы и методы

Перечисляются использованные в работе программное обеспечение, приборы и материалы, подробно излагаются методы и методики.

3. Результаты и их обсуждение

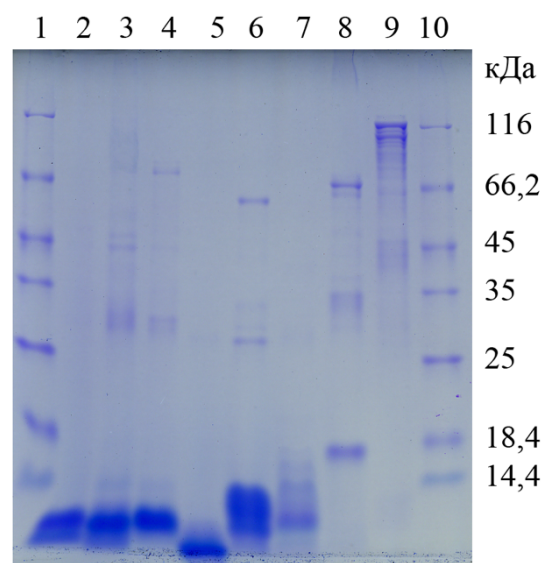
3.1. Молекулярный состав яда паукообразных и методы разделения

В большинстве случаев основным компонентом яда паукообразных — как количественно, так и функционально — служат небольшие белки (пептиды). На рисунке 1 приведена электрофореграмма цельных ядов скорпионов и пауков — объектов данной работы, а также традиционных объектов изучения различными лабораториями мира. Хорошо видно, что в большинстве случаев полипептидные компоненты мигрируют вблизи фронта в выбранных условиях электрофореза, т.е. характеризуется молекулярной массой (M_m) < 10 кДа. При этом обычно в составе яда обнаруживаются и белковые компоненты. Имеются важные исключения: так, в яде *L. tarabaevi* помимо небольших пептидов содержатся сравнительно более высокомолекулярные компоненты; у *Ch. puncturium* основной компонент имеет $M_m \approx 16$ кДа; главными компонентами яда *Latrodectus* служат крупные белки с $M_m > 100$ кДа.

Рисунок 1. Электрофоретическое разделение цельных ядов паукообразных.

Использован коммерчески доступный гель (Any kD Mini-PROTEAN TGX Precast Protein Gels, 15-well, 15 μ l, Bio-Rad Laboratories).

На дорожки 1 и 10 нанесены молекулярные стандарты (по 5 мкл Unstained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas), соответствующие M_m 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 marikovskiyi* (0,5 мкл яда, ≈ 100 мкг); 7 — *Lachesana tarabaevi* (20 нл яда, ≈ 4 мкг); 8 — *Cheiracanthium puncturium* (20 нл яда, ≈ 4 мкг); 9 — *Latrodectus dahli* (20 нл яда, ≈ 4 мкг).

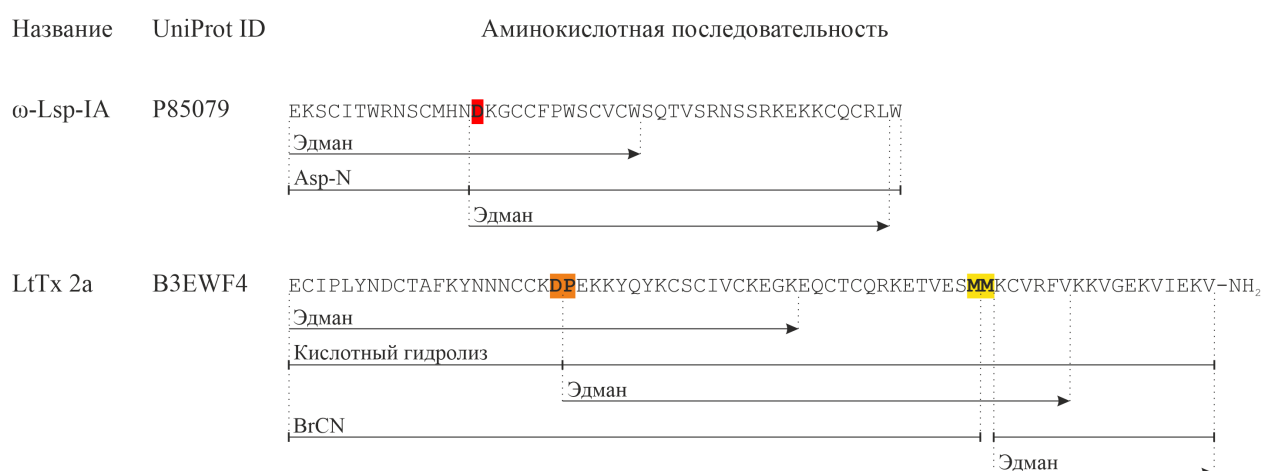


Поскольку основные компоненты яда пептиды, использовавшиеся в нашей работе методы выделения и очистки биомолекул можно отнести к области пептидомики. На первой стадии яд подвергается разделению на грубые фракции по Мм с помощью гель-фильтрации. На второй и (в случае необходимости) третьей стадии пептидные компоненты разделяются с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Чистоту полученных соединений мы обычно характеризуем с применением традиционных для пептидов методов: (а) аналитической ОФ-ВЭЖХ; (б) МС с методом ионизации — матрично-активированной лазерной десорбцией-ионизацией (МАЛДИ); (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 мы используем секвенирование по Эдману и tandemную МС (МС/МС). Если длина исследуемого полипептида превосходит 40–50 аминокислотных остатков (а.о.), приходится проводить фрагментацию. Из химических методов мы применяем гидролиз по остаткам метионина при помощи бромциана и кислотный гидролиз по связям Asp-Pro. Что касается энзиматических методов, то мы используем трипсин, Arg-C, Lys-C, Asp-N, Glu-C и (реже) химотрипсин. Методические подробности приведены в соответствующем разделе Методов и опубликованы нами в сборнике *Methods in Molecular Biology* (список публикаций, № 79). На рисунке 2 в качестве примера показана схема установления первичной структуры двух токсинов: ω -Lsp-IA из яда *A. marikovskiyi* и LtTx 2a из яда *L. tarabaei*.

Рисунок 2. 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.



Пространственную структуру токсинов мы исследуем в сотрудничестве с отделом структурной биологии ИБХ РАН с помощью ЯМР-спектроскопии. Для

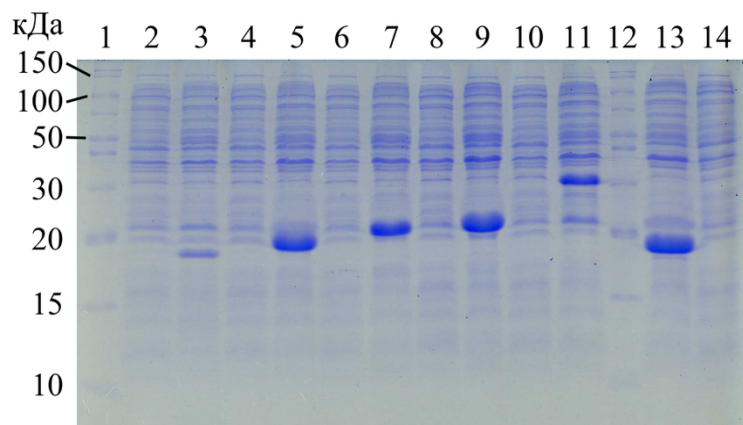
этих работ необходимо иметь несколько миллиграммов очищенного вещества, а в ряде случаев необходим образец, содержащий изотопы ^{13}C и/или ^{15}N . Для этого мы получаем рекомбинантные пептиды.

3.3. Получение рекомбинантных пептидов

Мы обычно получаем пептиды в *Escherichia coli* в виде гибридных белков с тиоредоксином (Trx), который обеспечивает высокую растворимость целевого продукта и помогает правильному формированию S-S-мостиков, являясь тиол-дисульфид-оксидоредуктазой. Для отсоединения целевых пептидов от белка-помощника мы используем энтеропептидазу; если же токсин не содержит остатков метионина, мы проводим расщепление с помощью BrCN. Оказалось, что присутствие солей и других компонентов, попавших в раствор белка в ходе очистки, не мешают реакции, важна лишь кислая среда. Это позволило нам существенно упростить протокол: теперь не нужна стадия обессоливания белка, к гидролизу можно переходить сразу после очистки (№ 9). В большинстве случаев сравнительно высокий выход продукта (1–10 мг с 1 л среды) удавалось получить в штамме *E. coli* BL21(DE3). Для повышения эффективности формирования S-S-мостиков мы также использовали штаммы: Origami B(DE3), дефектный по глутатионредуктазе и тиоредоксинредуктазе, и SHuffle T7 Express, который вдобавок конститутивно экспрессирует ген дисульфид-изомеразы DsbC.

На рисунке 3 приведена электрофореграмма, иллюстрирующая экспрессию генов различных гибридных белков Trx с токсинами (Tox). В данном случае использовали штамм *E. coli* BL21(DE3), а в вектор pET-32b(+) (Novagen) 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. А на рисунке 4 показан профиль хроматографического разделения гидролизата слитного белка Trx-MeKTx13-3 энтеропептидазой, в результате которого получен препарат целевого продукта с чистотой >95%.

Рисунок 3. Электрофоретическое разделение белков *E. coli* BL21(DE3), трансформированных различными pET-32b-Tox, до и после индукции экспрессии трансгена. Использовали 20%-й полиакриламидный гель с 0,1% додецилсульфата натрия. На дорожки 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 — CrTx 1a; 13 — вектор pET-32b(+) без вставки, после индукции; 14 — до индукции.

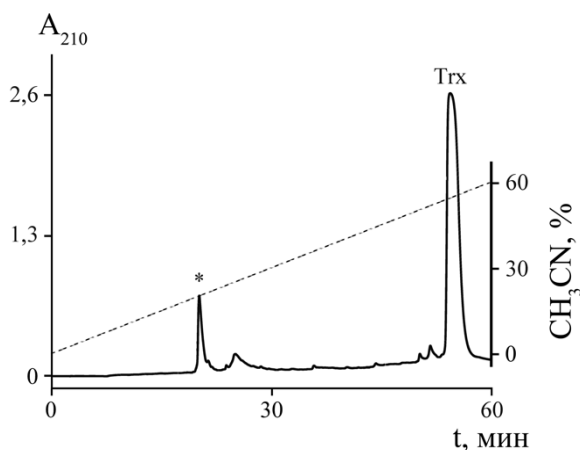


Рисунок 4. Очистка рекомбинантного MeKTx13-3. ОФ-ВЭЖХ гидролизата слитного белка Trx-MeKTx13-3, расщепленного энтеропептидазой, на колонке Jupiter C₅ (4,6×150 мм; Phenomenex). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Звездочкой отмечен пик, соответствующий искомому MeKTx13-3. Trx — фракция тиоредоксина.

3.4. Анализ активности токсинов в отношении ионных каналов

Активность изучаемых пептидов в отношении ионных каналов мы анализируем методами электрофизиологии: (а) двухэлектродной фиксацией потенциала на ооцитах *Xenopus laevis*, экспрессирующих гены каналов, (б) локальной фиксацией потенциала (пэтч-кламп) на выделенных нейронах или других клетках млекопитающих, экспрессирующих гены каналов.

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. 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). Для их изучения необходимы селективные лиганды, при этом лишь для сравнительно небольшого числа изоформ такие соединения известны сегодня. Кроме 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

Разнообразие именно полипептидных лигандов K⁺ каналов наиболее широко, однако отсутствовала их систематизация. Мы создали базу данных *Kalium* (<https://kaliumdb.org/>). Анализ литературных данных провели по PubMed, его результаты представлены в Обзоре литературы и опубликованы (№ 34). Мы также выполнили анализ UniProt и его части VenomZone, откуда скомпилировали данные об аминокислотных последовательностях. Мы обновили классификацию токсинов скорпионов, воздействующих на K⁺ каналы (КТх) по Титгату-Поссани.

Веб-интерфейс *Kalium* состоит из одной динамически генерируемой страницы и сосредоточен вокруг основной таблицы (рисунок 5). Подробная информация, включая детализированные данные об активности («Карточка лиганда»), доступна для каждой записи в виде всплывающего окна. Создание и расширение *Kalium* описано нами в трех публикациях (№№ 35, 50, 69). Оказалось, что к маю 2019 г. известна первичная структура 340 полипептидных лигандов K⁺ каналов, почти все из которых получены из яда животных, при этом 193 (57%) — из яда

скорпионов, еще 50 (15%) — из яда пауков. Пока писалась диссертация, мы подготовили наиболее существенное расширение — Kalium 3.0, включившее многочисленные искусственные производные природных лигандов K^+ каналов.

Рисунок 5. Главная страница Kalium (<https://kaliumdb.org/>). Результат для запроса: показать записи, в которых организмом-источником является скорпион, показать только лиганды с исследованной пространственной структурой.

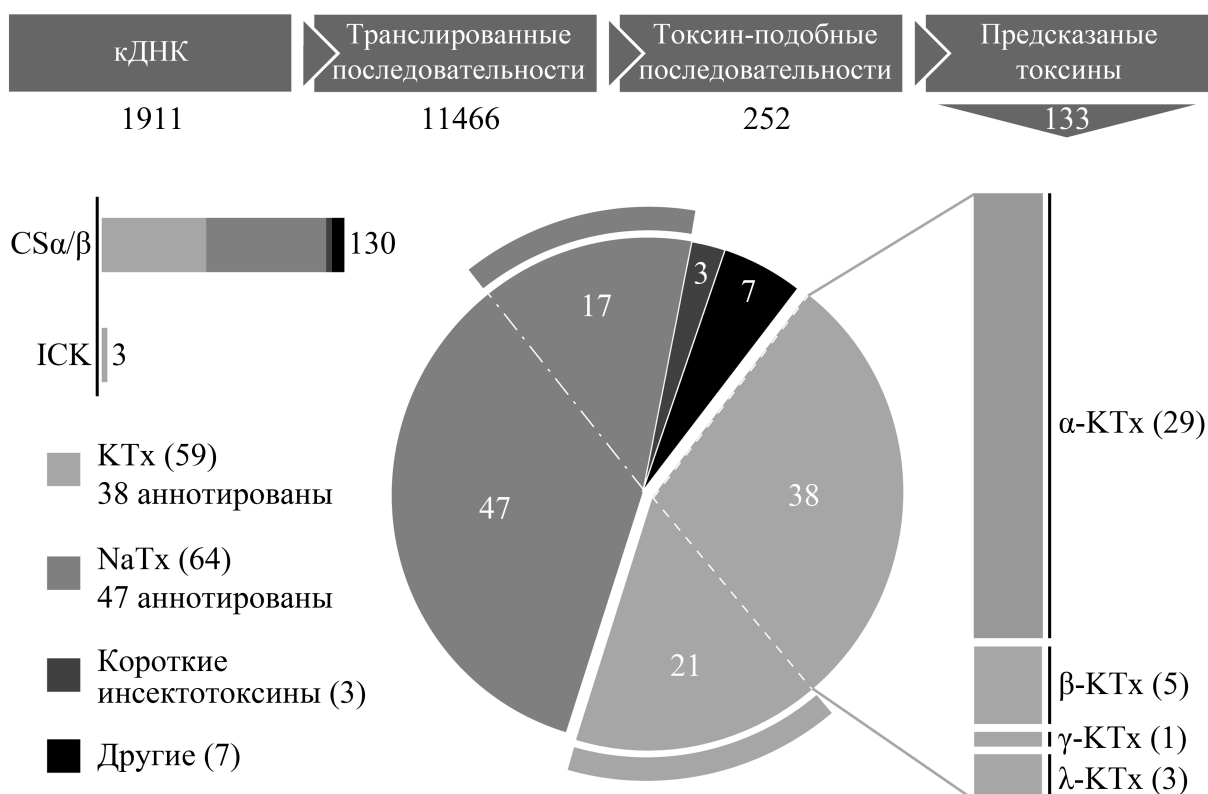
Organism	Name	Synonyms	Ligand ID	Sequence	PDB	Mass	Tested on	Active on
Mesobuthus martensii	Defensin B	Defensin BmKDsln3	A0A384E0Y8	GFCQFPNGKGRHRHSIRRRGGYDGLKQRIVYRK	5XA6	4488.21	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv11.1,KCa2.1	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv11.1,KCa2.1
Leirus quinquestriatus he...	α-1.1	ChTX; ChTX-Lq1, ChTX-a, Charybotoxin	P13487	ZFTNVSQTSSKQWVYQRLHNTSRGKCMNKKGRYS	1BAH,1CMI	4295.05	Kv1.1,Kv1.1-1.2,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.6	Kv1.1,Kv1.1-1.2,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.6
Leirus quinquestriatus he...	α-1.2	ChTX-Lq2, ChTX-d, Charybotoxin-2	P45628	ZFTQESQTASNQWSTIKRLHNTNRGKCMNKKGRYS	1LIR	4335.08	Kv1,Kv1.1,Kv1.3,KCa1.1,Kir1.1	Kv1,Kv1.1,Kv1.3,KCa1.1,Kir1.1
Mesobuthus martensii	α-1.5	BmTX1, Neurotoxin TX1	Q9NII6	ZFTDVKCTSGKQWVYQKMGKFGKCMNKKGRYS	1BIG	4169.04	Kv1,Kv1.3,KCa1.1	Kv1,Kv1.3,KCa1.1
Mesobuthus martensii	α-1.6	BmTX2, Neurotoxin TX2	Q9NII5	ZFTNVSQSASQWVYQKLFGTYAGKCMNKKGRYS	2BMT	4178.97	Kv1,Kv1.3,Kv11.1,KCa1.1	Kv1,Kv1.3,Kv11.1,KCa1.1
Centruroides noxius	α-2.1	NTx; Noxiustoxin, Toxin II.11	P08815	TIINVKCTSPKQSLFQKELYSSAGAKCMNKKGRYS	1SXM	4195.06	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.5,KCa1.1	Kv1.2,Kv1.3,KCa1.1,Shaker
Centruroides margaritatus	α-2.2	MgTX; Margatoxin	P40755	TIINVKCTSPKQSLFQKAFQSGAGAKCMNKKGRYS	1MTX	4179.11	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kir1.1,Kir3.1	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Shaker
Centruroides limbatus	α-2.5	HgTX1; Hongotoxin-1	P59847	TVIDVKCTSPKQSLFQKAFGIRAGAKCMNKKGRYS	1HLY	4220.20	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.6	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.6
Androctonus mauritanicus...	α-3.1	KTX-1; Kallitoxin-1	P24662	GVEINVKSGSPQSLFQKDGAMRFGKCMNKKGRYS	1KTX,1XSV	4150.10	Kv1.1,Kv1.1-1.1-1.1-1.1,Kv1.1-1	Kv1.1,Kv1.1-1.1-1.1-1.1,Kv1.1-1
Leirus quinquestriatus he...	α-3.2	AgTx-2, AgTx2; Agitoxin-2	P46111	GVPIVNSGTSPQSLFQKDGAMRFGKCMNKKGRYS	1AGT	4091.02	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.4,Kv1.5	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.6,Shake
Mesobuthus martensii	α-3.6	BmTX, Kallitoxin	Q9NII7	VGINVKQKHSQSLFQKDGAMRFGKCMNKKGRYS	1BKT,2K4U	3961.89	Kv1,Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.4,Kv1.5	Kv1,Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.6,S
Orthochirus scrobiculosus	α-3.7	Osk1; Osk-1	P55896	GVIINVKKISROSLFQKDGAMRFGKCMNKKGRYS	1SCO,2CKV	4205.30	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,Kv1.4,Kv1.5	Kv1.1,Kv1.2,Kv1.3,KCa3.1
Tityus serrulatus	α-4.1	TsTX-K-alpha, TykAlpha; TSK4, Tityus	P46114	VFINAKRGSPSLFQKKEALGKAAGKCMNKKGRYS	1HP2	3941.89	Kv1.1,Kv1.1-1.1-1.1-1.1,Kv1.1-1	Kv1.1,Kv1.1-1.1-1.1-1.2,Kv1.1-1
Tityus serrulatus	α-4.2	TsK, TsKappa; Neurotoxin Ts-kappa, T	P56219	VVIGQRGYRSPQSLFQKDKLVGKATGKCMNKKGRYS	1TSK	3778.53	Kv11.1,KCa2.2,KCa2.3	Kv11.1,KCa2.2,KCa2.3
Leirus quinquestriatus he...	α-5.1	LeTx I, SoyTx; Leiurotoxin I, Leiurotox	P16341	AFQNLRMQSLRSISGLLGRIGDKRQVYH-NH2	1SCY	3423.28	KCa2.1,KCa2.2,KCa2.3	KCa2.1,KCa2.2,KCa2.3

3.5.2. Блокаторы K^+ каналов из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*

Характеристику многообразия КТх яда *Mesobuthus eupeus* (NCBI/UniProt taxon identifier: 504442; недавно переименован в *Mesobuthus thersites*, 2923069; семейство Buthidae) мы осуществили двумя способами: путем выделения токсинов из яда, а также с помощью анализа транскриптома. Библиотеку кДНК из ядовитых желез скорпиона секвенировали по Сэнгеру. Для поиска возможных токсинов, помимо BLAST, мы использовали регулярные выражения, отражающие мотивы первичной структуры, наиболее характерные для токсинов паукообразных. Основные этапы процесса представлены на рисунке 6. Мы обнаружили 133 последовательности: три содержат мотив «цистинового узла» (ICK), а 130 — мотив «цистеин-стабилизированных α -спирали/ β -слоя» (CS α / β). Среди последних: 56 предшественников предполагаемых КТх, 64 — NaTx, три коротких инсекто-токсина. Последовательности кДНК были зарегистрированы в GenBank (другие нуклеотидные последовательности тоже регистрировали, далее не упоминаем).

Выведенные предшественники КТх мы назвали pMeКТх (p — предшественник; Me — *M. eupeus*) и разделили на 30 групп по сходству. Большинство предполагаемых КТх — члены хорошо известных (под)семейств, таких как α -КТх 1, β -КТх 1, γ -КТх 2. Новые КТх, активные на Kv1.1 (см. ниже), относятся к четырем подсемействам: α -КТх 1, 3, 8 и 16. Это сравнительно небольшие пептиды (29–38 а.о.), содержащие три S-S-мостика. Все они содержат ключевой консервативный остаток лизина — это первый а.о. перед четвертым цистеином, он непосредственно блокирует пору каналов.

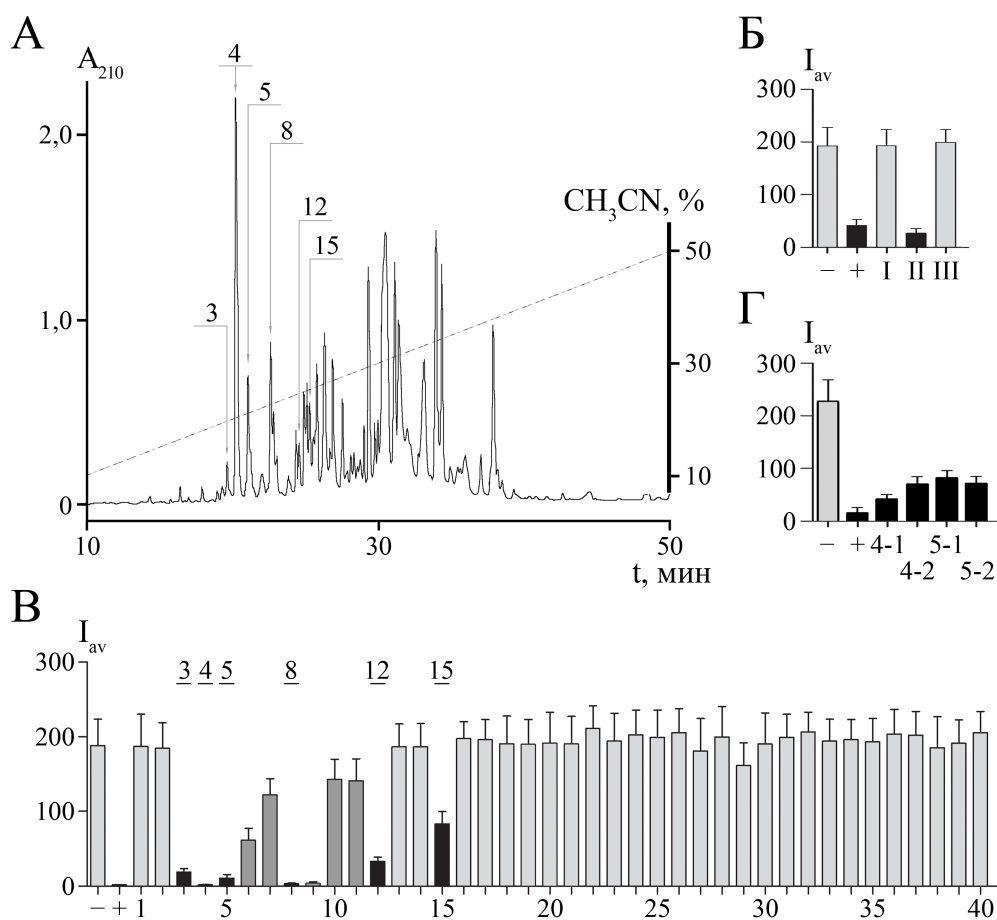
Рисунок 6. Этапы идентификации предполагаемых токсинов в базе данных кДНК из ядовитых желез *M. eureus*. Семейства КТх указаны справа. Для всех семейств и групп приведено общее количество идентифицированных последовательностей.



Скрининг активности фракций яда *M. eureus* мы проводили с использованием оригинального подхода — по вытеснению флуоресцентно-меченого токсина AgTx-2-TAMRA из комплекса с химерным белком KcsA-K_v1.1 с заменой части Р-петли (области S5-P) KcsA на гомологичный участок из K_v1.1, экспрессированным в *E. coli*. На первом этапе яд разделили на грубые фракции с помощью гель-фильтрации, которые протестировали с использованием гибридных каналов. Для выделения активных компонентов применили ОФ-ВЭЖХ, полученные субфракции тестировали (рисунок 7). Некоторые из них содержали два активных компонента, второй раунд ОФ-ВЭЖХ позволил их разделить.

Всего из яда *M. eureus* мы получили восемь блокаторов K_v1.1 (таблица 1): пять новых и три уже описанных активных пептида. Новые пептиды секвенировали по Эдману, последовательности зарегистрировали в UniProt (так же поступали с другими белковыми последовательностями, далее не упоминаем). В случае MeKTx11-3 и 11-1 первоначальное секвенирование по Эдману не удалось из-за блокирования N-конца остатком пироглутаминовой кислоты, который мы удалили с помощью пироглутамат-аминопептидазы. Для токсинов MeKTx13-2, 13-3 и MeuKTx-3 предположено С-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 С-концевой остаток глицина, служащий сигналом амидирования.

Рисунок 7. Разделение яда *M. eureus* и анализ фракций с помощью флуоресцентной системы. (А) Разделение активной фракции, полученной с помощью гель-фильтрации, на субфракции при помощи ОФ-ВЭЖХ на колонке Vydac C₁₈ (4,6×250 мм; Grace). Активные субфракции обозначены числами. (Б–Г) Интенсивность флуоресценции сферопластов *E. coli*, 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. Черные столбцы обозначают активные фракции / субфракции / компоненты; темно-серые столбцы — субфракции с примесью активных компонентов; светло-серые столбцы — неактивные фракции / субфракции / компоненты. Данные показаны как средние значения ± среднеквадратическое отклонение (SD).



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 8 показано ингибирование токов, опосредованных каналами K_v1.1–1.3 и 1.6 при приложении токсинов MeКТх1-2, 11-1, 11-3, 13-2 и 13-3, а также кривые «доза–ответ»; мы рассчитали значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC₅₀) по уравнению Хилла (таблица 2).

Результаты изучения многообразия КТх из яда *M. eureus* опубликованы (№№ 22, 32, 47, 54, 73).

Таблица 1. Лиганды K_v1.1, полученные из яда *M. eurus* и *O. scrobiculosus*.

ВЭЖХ ¹	Название пептида		UniProt ID	Последовательность ²
				1 5 10 15 20 25 30 35 37
3	MeKTx13-2	α-KTx 3.18	C0HJQ4	REIPVK CK GSKQ CL QS CK EAGMTY GK CM NGK CN CTPK-NH ₂
4-1	MeuKTx-1	α-KTx 8.6	P86400	V SC ED CP EH CA TKDQ RA K CD NDK CV CEPK
4-2	MeKTx1-2	α-KTx 8.7	C0HJQ5	V SC ED CP PH CA TKDQ RA K CE NDK CV CEPK
5-1	MeKTx13-3	α-KTx 3.19	C0HJQ6	VGINVK CK HSGQ CL KP CK DAGMRFGK CI NGK CD CTPK-NH ₂
5-2	MeuKTx-3	α-KTx 3.13	P86396	VGINVK CK HSGQ CL KP CK DAGMRFGK CM NGK CD CTPK-NH ₂
8	MeKTx11-3	α-KTx 1.17	C0HJQ7	ZFTDVK CT VTKQ CW PV CK KMFGRPNGK CM NGK CR CYS
12	MeKTx11-1	α-KTx 1.16	C0HJQ8	ZFTDVK CT GTKQ CW PV CK KMFGRPNGK CM NGK CR CYP
15	MeuTx3B	α-KTx 16.4	D3JXM1	FGLIDVK CS ASRE CW V AK KVTGSGQGK CQ NNQ CR CY
	OSK1	α-KTx 3.7	P55896	GVIINVK CK ISRQ CL EP CK KAGMRFGK CM NGK CH CTPK
	OSK3	α-KTx 8.8	C0HK17	V SC ED CP EH CS TQKARAK CD NDK CV CEPI

¹Обозначение компонента при разделении яда *M. eurus*, см. рисунок 7. ²Z, остаток пироглутаминовой кислоты. -NH₂, 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.

Рисунок 8. Активность токсинов из яда *M. eureus* на каналах $K_v1.1$. (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 MeКТx13-3 (1 нМ). Данные показаны как средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего (SE; $n \geq 3$).

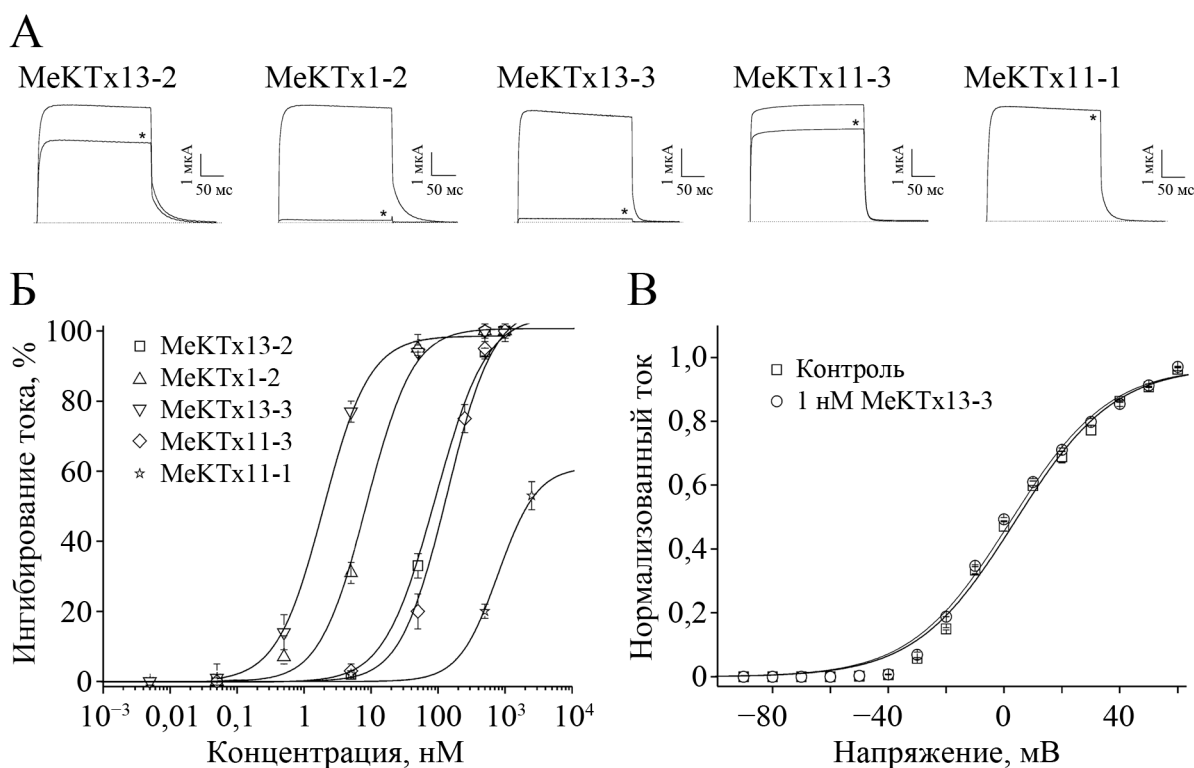


Таблица 2. Активность лигандов K_v , полученных из яда *M. eureus* и *O. scrobiculosus*, CTX и их искусственных производных. Указаны рассчитанные значения $IC_{50} \pm SE$ в нМ ($n \geq 3$).

Токсин	$K_v1.1$	$K_v1.2$	$K_v1.3$	$K_v1.6$
MeКТx1-2	$8,5 \pm 1,2$	102 ± 12	2525 ± 422	180 ± 18
MeКТx11-1	2110 ± 146	$0,19 \pm 0,01$	67 ± 5	8923 ± 857
MeКТx11-3	135 ± 10	$3,1 \pm 0,2$	79 ± 11	911 ± 107
MeКТx13-2	90 ± 2	2678 ± 101	312 ± 20	266 ± 23
MeКТx13-3	$1,9 \pm 0,2$	106 ± 15	$8,9 \pm 0,9$	63 ± 5
MeКТx13-3_AAAR	542 ± 49	208 ± 15	$9,1 \pm 0,4$	1522 ± 183
MeКТx13-3_RMRH	$0,11 \pm 0,02$	$10,7 \pm 0,8$	$8,1 \pm 0,2$	$16,3 \pm 1,0$
CTX	1473 ± 140	$12,7 \pm 1,3$	$0,2^1$	22^1
CTX_M29I	>2000	$0,0060 \pm 0,0004$	$4,1 \pm 0,8$	>2000
OSK3	$>>1000^2$	331 ± 17	503 ± 31	9983 ± 172

¹Данные из литературы. ²OSK3 не показал эффекта на $K_v1.1$ в концентрации 1 мкМ.

3.5.3. Блокаторы K^+ каналов из яда скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*

Анализ транскриптома *Orthochirus scrobiculosus* (NCBI/UniProt taxon identifier: 6892; семейство Buthidae) мы провели по схеме, описанной выше для *M. eurus*. Всего нашли 56 предполагаемых предшественников пептидов, причем только с укладкой $CS\alpha/\beta$ [мотив ICK не обнаружен]. В результате анализа с помощью программ SignalP и BLAST мы идентифицировали 28 уникальных последовательностей, среди которых 9 предшественников предполагаемых КТх, которые мы назвали pOsКТх (Os — *O. scrobiculosus*) и разделили на семь групп по сходству.

Яд *O. scrobiculosus* мы разделили по схеме, что описана выше для *M. eurus*. Для поиска КТх использовали химерные каналы KcsA-K_v1.3. Активный компонент яда, конкурировавший с AgТх-2 за связывание с каналами, — пептид OSK1 (P55896, α -КТх 3.7). Мы также обнаружили в яде пептид, получивший название OSK3 (C0HK17, α -КТх 8.8; 29 а.о., 3 S-S; см. таблицу 1). Он сравнительно слабый КТх: значения IC_{50} составляют сотни нМ и даже мкМ (см. таблицу 2), это общее свойство членов подсемейства α -КТх 8. Отличительной особенностью OSK3 служит его селективность. Исследование OSK3 опубликовано (№ 40).

3.6. Создание искусственных лигандов K^+ каналов

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. Мы сумели получить искусственные лиганды K^+ каналов двумя способами: (1) путем внесения модификаций в структуру известных природных КТх и (2) взяв за основу неактивный пептид и применив скаффолд-инженерию.

3.6.1. Получение производных α -КТх с измененной активностью

За основу мы взяли хорошо изученные пептиды: СТХ (P13487, α -КТх 1.1) и MeКТх13-3 (C0HJQ6, α -КТх 3.19), охарактеризованный нами (см. выше). 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.

Моделирование комплексов токсинов и ионных каналов было выполнено вместе с группой анализа структуры мембранных белков *in silico* и лабораторией моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН. В настоящее время известна структура комплекса СТХ с K^+ каналом (химерой K_v1.2/2.1; PDB ID: 4JTA), моделирование мы проводили на ее основе. Пептиды, пространственная структура которых не изучена, мы моделировали по гомологии. Структуру нужных КТх совмещали с СТХ в комплексе, который затем убирали. Таким образом получали комплексы КТх с K_v1.2. В случае других K_v модель нужного канала совмещали с химерой K_v1.2/2.1, которую потом убирали. Комплексы помещали внутрь мембраны и проводили молекулярную динамику (МД). В качестве примера на рисунке 9В показана модель комплекса MeКТх13-3 с K_v1.3.

MeКТх13-3 предпочтительно активен на K_v1.1 (рисунок 8, таблица 2). Анализ моделей комплексов MeКТх13-3 с K_v1.1–1.3 (рисунок 9) позволяет выявить существенные различия во взаимодействии токсина с тремя изоформами. В

частности, Q12, K15 и K18 образуют выгодные контакты с K_v1.1 и/или 1.2, но не K_v1.3 (рисунок 9Г, Д). Если поменять указанные а.о. токсина на инертный аланин, мы ожидаем возрастания селективности в отношении K_v1.3. Кроме того, в случае всех трех изоформ D33 невыгоден, поскольку сближен с консервативным D377/379/449. Если его заменить на положительно заряженный а.о., ожидается увеличение аффинности. Мы получили MeKTx13-3 с четырьмя заменами: Q12A, K15A, K18A и D33R — и назвали его MeKTx13-3_AAAR (рисунок 9А). Тестирование на K_v показало, что наши предположения верны: активность в отношении K_v1.1 и 1.2 снизилась (таблица 2). Она также упала против K_v1.6, а вот на K_v1.3 не изменилась. В результате мы получили K_v1.3-селективный пептид.

MeKTx13-3 с четырьмя заменами: G11R, I28M, G30R и D33H — получил название MeKTx13-3_RMRH (рисунок 9А). В ходе МД он занимает уникальное положение во входном вестибюле K_v1.1 (рисунок 9Е) в сравнении с другими изоформами, что обусловлено контактами, формируемыми R11 и R30, 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 D355/T425 не могут дотянуться до K31. MeKTx13-3_RMRH — один из самых специфичных лигандов K_v1.1 (см. таблицу 2).

Если в канале дрозофилы Shaker произвести замену T449F, аффинность СТХ с заменой M29I падает в 1650 раз по сравнению с обычным СТХ. В каналах млекопитающих в соответствующей позиции находятся различные а.о., в том числе ароматические. Мы получили рекомбинантные СТХ и СТХ_M29I и оценили их активность в отношении K_v. Оказалось, что СТХ_M29I проявляет уникальную аффинность и селективность к K_v1.2 (таблица 2).

Результаты по получению и характеристике искусственных изоформ-специфичных блокаторов K_v опубликованы (№№ 55, 61, 65, 67).

Рисунок 9. Модели комплексов MeKTx13-3 и MeKTx13-3_RMRH с K_v1.1–1.3. (А) Сравнение аминокислотных последовательностей MeKTx13-3 и его производных. Полужирным выделены а.о., отличающиеся от MeKTx13-3. (Б) Сравнение аминокислотных последовательностей внеклеточной области поровых доменов каналов rK_v1.1, rK_v1.2 и hK_v1.3. Нумерация а.о. указана над соответствующими последовательностями; различающиеся а.о. выделены полужирным. Структурные элементы обозначены стрелками снизу. Р — поровая спираль; SF — селективный фильтр. (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 моделями; атомы окрашены: кислород красный, фосфор оранжевый, азот синий, углерод светло-желтый, желтый или 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 R36, K37 и G376 показаны некоторые атомы основной цепи. Солевые мостики и водородные связи отмечены зелеными пунктирными линиями.

A

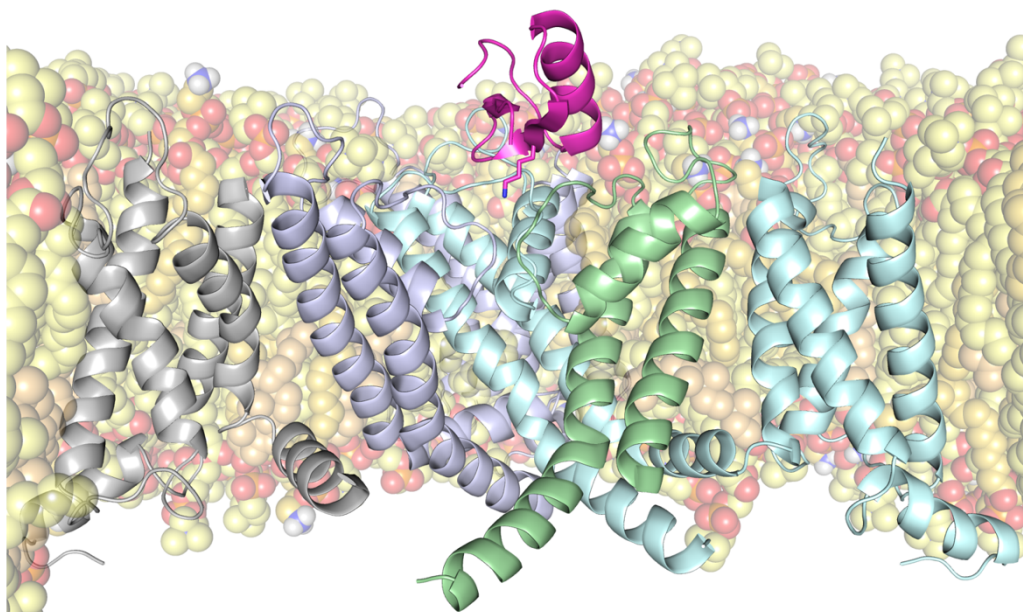
	1	10	20	30	37	
MeKTx13-3	VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCKINGKCDCTPK					
MeKTx13-3_AAAR	VGINVKCKHSG AC L AP C AD AGMRFGKCKINGK C RCTPK					
MeKTx13-3_RMRH	VGINVKCKH S RQCLKPCKDAGMRFGK C M N RK C HCTPK					

B

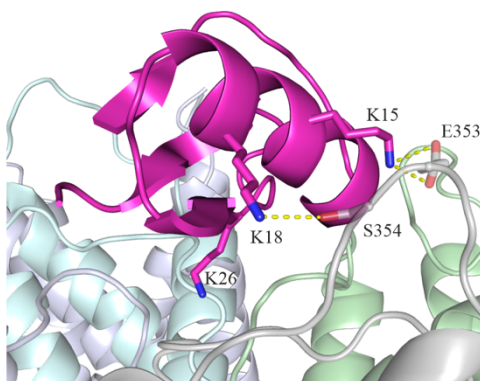
rK _v 1.1	350	360	370	380
	AEAE EE AESHFSSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDM Y PVTIGGK			
rK _v 1.2	350	360	370	380
	AEADERDS Q FPSIPDAFWWAVVSMTTVGYGDM V P TT IGGK			
hK _v 1.3	420	430	440	450
	AEAD D P T SGFSSIPDAFWWAVV T MTTVGYGDM H HPVTIGGK			

→ S5 ← P ← SF ← S6

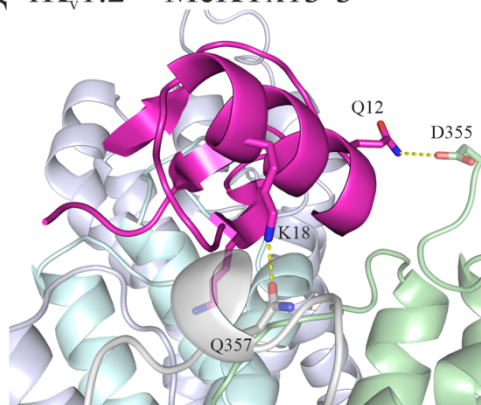
B hK_v1.3—MeKTx13-3



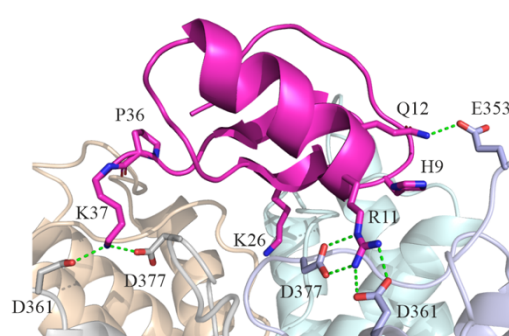
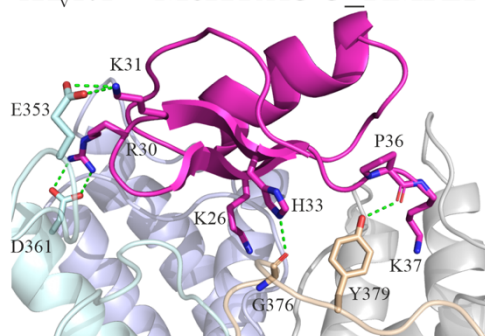
Г rK_v1.1—MeKTx13-3



Д rK_v1.2—MeKTx13-3



Е rK_v1.1—MeKTx13-3_RMRH



3.6.2. Получение блокаторов K^+ каналов на основе α -гарпининов

Наша работа, начатая под руководством профессора Цезия Алексеевича Егорова, привела к открытию семейства защитных пептидов растений, которые мы называли α -гарпининами (англ. α -hairpinins; №№ 11, 16, 24, 26, 80; диссертация П.Б. Опарина). 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. Аналогичный мотив описан у некоторых токсинов скорпионов [к-КТх; например, у к-хефутоксина-1 (к-КТх 1.1)] и конусов. Мы решили использовать α -гарпининовую укладку для скаффолд-инженерии блокаторов K^+ каналов.

В качестве шаблона мы выбрали α -гарпинин Tk-AMP-X2 (28 а.о., 2 S-S; таблица 3) из семян пшеницы *Triticum kiharae*, структуру которого изучили с помощью спектроскопии ЯМР. Химические сдвиги и координаты атомов депонировали в базах данных PDB и BMRB (PDB ID: 2M6A; рисунок 10); то же делали для других структур, не упоминаем. В структуре пептида пшеницы отсутствуют а.о. функциональной диады блокаторов K^+ каналов — мы внедрили их в Tk-AMP-X2. Кроме того, мы последовательно вносили в структуру пептида другие замены (см. таблицу 3), которые *in silico* давали наибольшее число контактов с $K_v1.3$, и получили линейку пептидов Tk-hefu-1–11. Моделирование мы проводили на основе структуры комплекса СТХ с $K_v1.2/2.1$ — аналогично КТх; в данном случае мы совмещали функциональную диаду Tk-hefu с диадой СТХ. Высокую эффективность проявил пептид Tk-hefu-10, значение IC_{50} на $K_v1.3$ составило $152,7 \pm 34,2$ нМ, он также был селективен, его аффинность в отношении других каналов ниже в 33 раза и более.

При увеличении числа введенных замен эффективность действия пептида в отношении $K_v1.3$ не всегда повышается (таблица 3). Поэтому мы решили ввести некоторые «обратные» замены (Q2D, K6Y и Q7R) в структуру Tk-hefu-10, получив Tk-hefu-11. Совершенно неожиданно оказалось, что Tk-hefu-11 проявляет высокую активность и селективность в отношении $K_v1.6$, значение полуэффективной концентрации (EC_{50}) составило $10,0 \pm 0,5$ нМ; он один из лучших лигандов этой изоформы каналов.

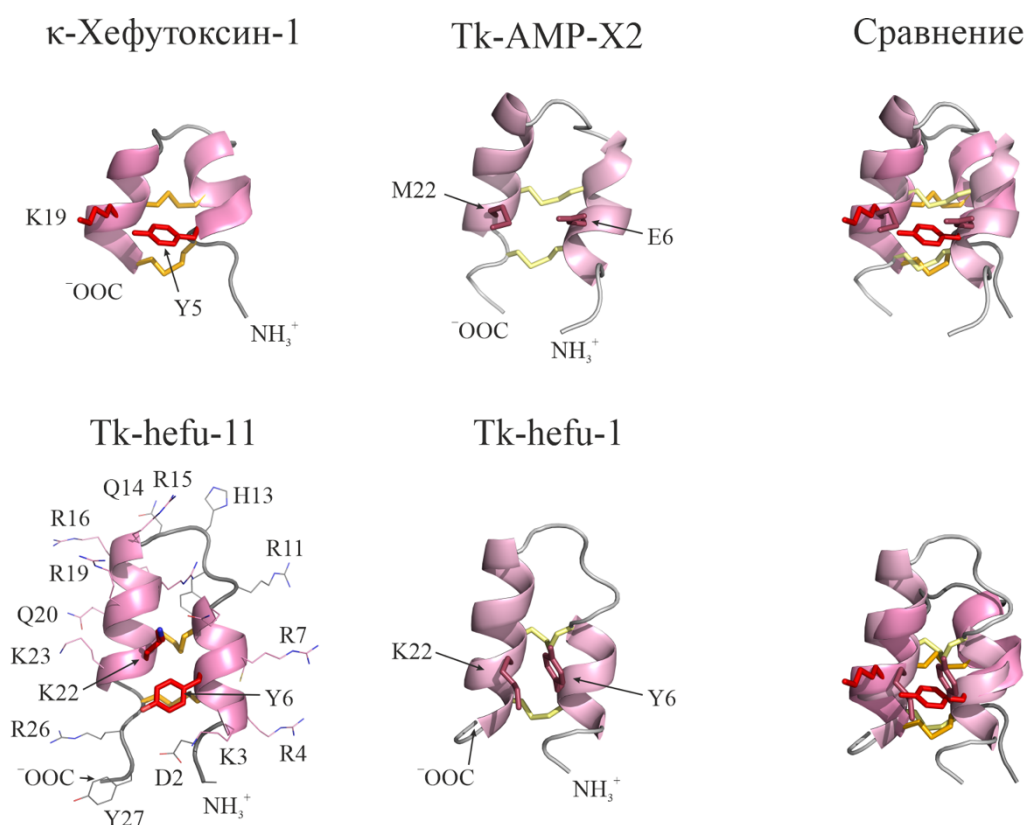
Мы изучили пространственную структуру Tk-hefu-1 (5LM0) и Tk-hefu-11 (7QXJ; рисунок 10). Интересно, что они различаются между собой и с Tk-AMP-X2. Tk-hefu-1 плотнее упакован в сравнении с Tk-AMP-X2, поскольку Y6 формирует π -катионные взаимодействия с K18 и K22, а E23 образует солевой мостик с K19. Поворот спиралей $\approx 30^\circ$ у Tk-hefu-11 мы объясняем π -катионным взаимодействием между Y6 и K3. 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. 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. Про возможность подобного влияния единичных замен на структуру пептидов и их взаимодействия с целевыми белками стоит помнить при рациональном дизайне биологически активных соединений.

Таблица 3. Аминокислотные последовательности пептидов Tk-hefu и их активность против K⁺ каналов.

Название	Последовательность	IC ₅₀ , нМ			
		K _v 1.1	K _v 1.2	K _v 1.3	K _v 1.6
	1 5 10 15 20 22 				
κ-Хефутоксин-1	-GHAC Y RNCWR--EGNDEET C KERC---	- ¹	150 000 (K _d)	40 000 (K _d)	²
Tk-AMP-X2	ADDR C ERM C QRYHDRREKKQ C MKG C RYG	-	-	-	-
Tk-hefu-1	ADDR C YRM C QRYHDRREKKQ C K EG C RYG	-	40 000 / 8 ³	34 000 ± 2800	40 000 / 7
Tk-hefu-2	ADDR C YRM C QRYHDRREKKQ C K KG C RYG	-	40 000 / 12	2300 ± 400	40 000 / 17
Tk-hefu-3	ADDR C YRM C QRYHDRREKKQ C MKG C RYG	-	-	-	-
Tk-hefu-4	ADDR C ERM C QRYHDRREKKQ C K KG C RYG	-	40 000 / 12	11 100 ± 2800	40 000 / 5
Tk-hefu-5	A K DR C YRM C QRYHDRREKKQ C K KG C RYG		10 000 / 12	2700 ± 300	10 000 / 11
Tk-hefu-6	AD K R C YRM C QRYHDRREKKQ C K KG C RYG			700 ± 100	2000 / 31
Tk-hefu-7	A Q KR C YRM C QRYHDRREKKQ C K KG C RYG			700 / 39	2000 / 64
Tk-hefu-8	A Q KR C YRM C QRYHDRRE RR Q C K KG C RYG		5000 / 40	700 / 59	2000 / 21
Tk-hefu-9	A Q KR C K Q M CQRYHDRRE RR Q C K KG C RYG		5000 / 24	700 / 62	
Tk-hefu-10	A Q KR C K Q M CQRYH Q RR Q RRQ C K KG C RYG		5000 ± 2000	152,7 ± 34,2	5000 / 30
Tk-hefu-11	AD K R C YRM C QRYH Q RR Q RRQ C K KG C RYG	1000 / 41	1000 / 50	70,4 ± 2,9 ⁴	10,0 ± 0,5 ⁴
	1 5 10 15 20 25 28 				

Прочерки в последовательность κ-хефутоксина-1 добавлены для удобства сравнения. Сверху представлена нумерация а.о. для κ-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. ²Пустые клетки означают, что тестирование не проводилось. ³«X / Y» означает, что при концентрации X нМ наблюдалось Y процентов ингибирования тока. ⁴Эти данные представляют значения EC₅₀ в нМ. n ≥ 3.

Рисунок 10. Пространственная структура поровых блокаторов K^+ каналов, созданных на основе α -гарпинина. Показаны структуры: к-хефутоксина-1 (PDB ID: 1HP9), Tk-AMP-X2 (2M6A), Tk-hefu-1 (5LM0, внизу в центре) и Tk-hefu-11 (7QXJ, внизу слева). Указаны N- и C-концы цепей. Справа показано сравнение структуры к-хефутоксина-1 и Tk-AMP-X2 (вверху) или Tk-hefu-1 (внизу). Радикалы а.о. функциональной диады показаны красными стержнями, S-S-мостики — желтыми. Tk-AMP-X2 и Tk-hefu-1 раскрашены в отличающиеся от к-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.



Таким образом, α -гарпининовая укладка оказывается поддающейся манипуляциям скаффолд-инженерии. Результаты нескольких этапов дизайна блокаторов K_v на основе α -гарпинина опубликованы (№№ 28, 52, 60, 64, 66).

3.7. Токсины паукообразных, 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 как исследование 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 . Яд паука-бокохода *Heriaeus mellotei* (NCBI/UniProt taxon identifier: 504442; семейство Thomisidae) как наиболее активный использовали для выделения новых полипептидных токсинов, модулирующих Na_v .

3.7.1. Токсины из яда паука *Heriacleus melloteei*

Для разделения яда *H. melloteei* мы использовали две стадии ОФ-ВЭЖХ (рисунок 11). Полученные активные пептидные компоненты мы назвали Нм-1, 2 и 3 (таблица 4). В концентрации 0,1–1 мкМ все три токсина значительно снижали ток, опосредованный $\text{Na}_v1.1$ –1.6, но не $\text{Na}_v1.8$.

Для детальных исследований мы получили рекомбинантный Нм-3. Чтобы оценить селективность Нм-3 к Na^+ каналам, мы исследовали его активность в отношении K_v и потенциал-чувствительных Ca^{2+} каналов (Ca_v). Никакой активности не наблюдали на целой панели: $\text{K}_v1.1$, $\text{K}_v1.3$, $\text{K}_v2.1$, $\text{K}_v4.2$, $\text{K}_v10.1$ или $\text{Ca}_v3.3$ — при 1 мкМ Нм-3. Ряд наблюдений позволил отнести Нм-3 к модуляторам воротных механизмов Na_v (“gating modifiers”). (а) Приложение токсина приводит к сдвигу вольт-амперной характеристики каналов. (б) Эффективность ингибирования натриевого тока зависит от потенциала. (в) Предварительные деполяризующие импульсы ослабляют действие Нм-3. (г) Наконец, действие Нм-3 зависит от потенциала предварительного импульса.

Рисунок 11. Фракционирование яда *H. melloteei* и очистка индивидуальных токсинов. (А) ОФ-ВЭЖХ цельного яда на колонке Jupiter C₅ (4,6×150 мм). Цифрами обозначены фракции, содержащие Нм-1–3. (Б–Г) ОФ-ВЭЖХ фракций 1–3 из (А) на колонке Luna C₈ (4,6×150 мм; Phenomenex). Использовали линейный градиент растворителя (В, показан пунктиром), содержащего 50% ацетонитрила и 20% изопропилового спирта. Обозначены пики, содержащие токсины Нм-1–3.

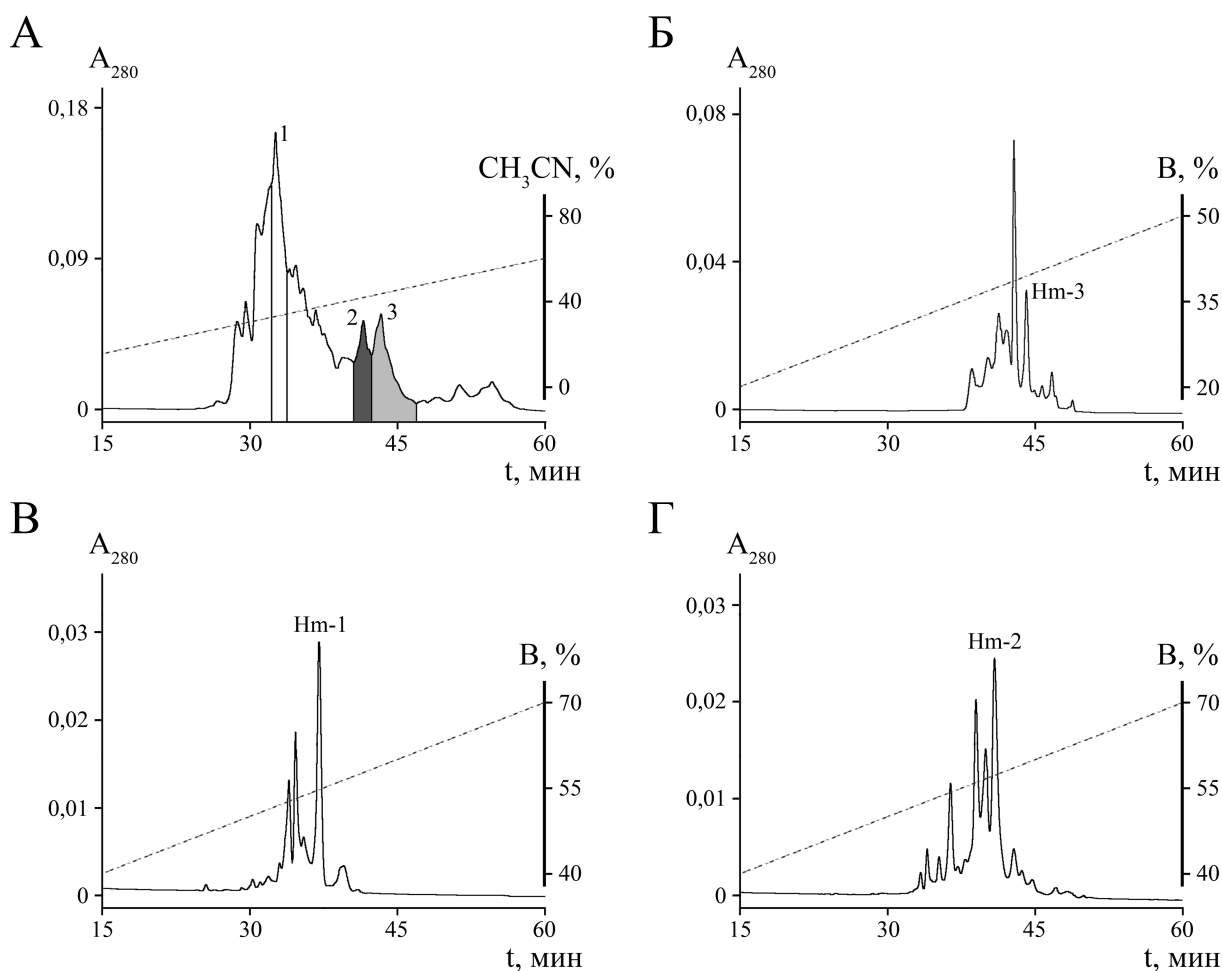


Таблица 4. Токсины из яда *H. melloteei*, ингибирующие Na_v.

Название пептида	UniProt ID	Последовательность									
		1	5	10	15	20	25	30	35	37	
Hm-1	P85505	G	CIPY	GKTC	EFWS	GPWCC	-AGK	CKLNV	WSMTLS	CTRNF	-NH ₂
Hm-2	P85506	G	CIP	SFGE	CAWFS	GESCC	-TGIC	KWVFF	TSKFM	CRRVW	GKD
Hm-3	C0HJK5	G	CI	AKNKE	CAWFS	GEWCC	GALSC	KYSIK	RNLK	ICV	
		1	5	10	15	20	25	30	35		

В последовательность пептидов внесены разрывы для удобства сравнения. -NH₂, С-концевое амидирование. А.о. раскрашены в соответствии со свойствами: положительно заряженные — синим, отрицательно заряженные — красным, гидрофобные — зеленым, гидрофильные незаряженные — малиновым, остатки глицина — серым, цистеина — выделены желтым.

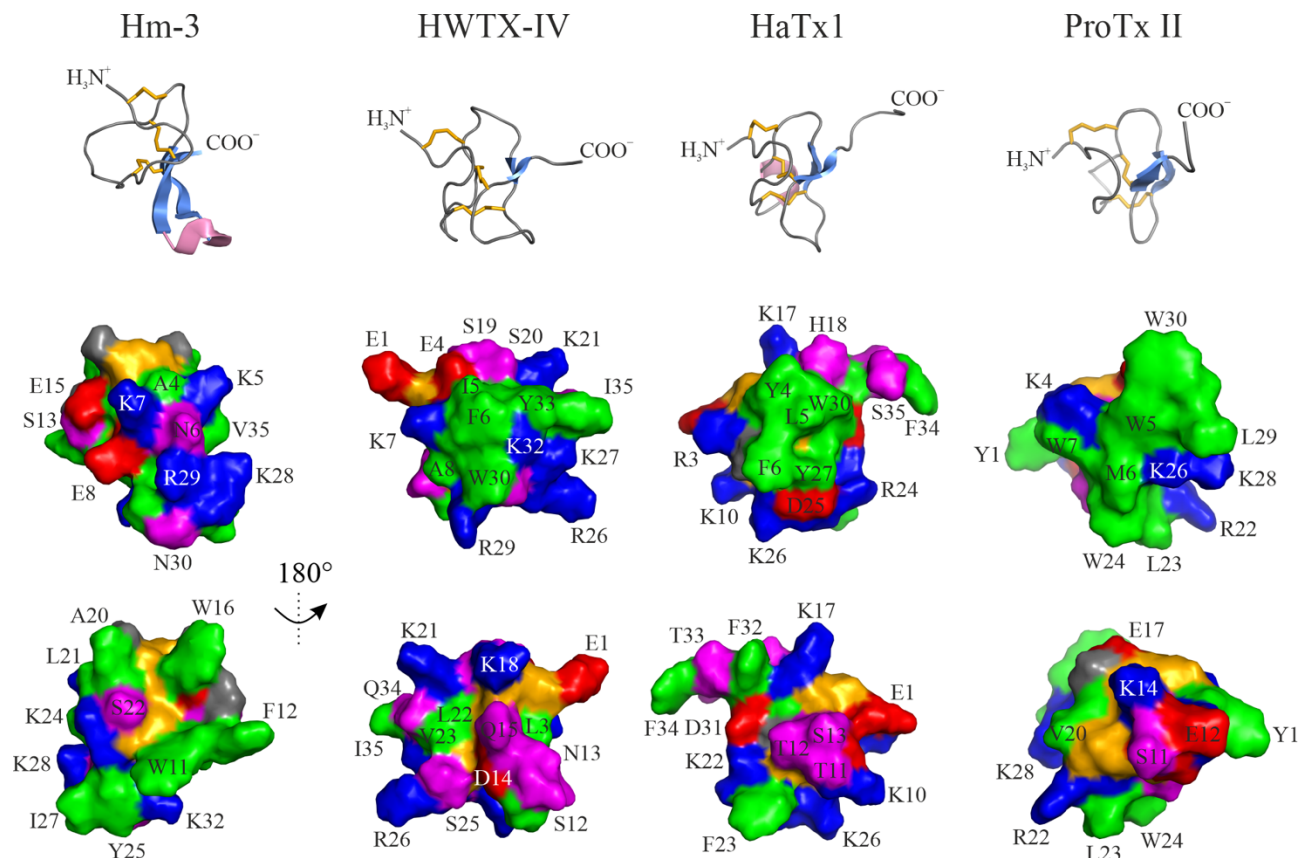
Hm-3 — первый описанный модификатор воротных механизмов-ингибитор Na_v из яда аранеоморфных пауков. Структура Hm-3 (PDB ID: 2MQU) представлена мотивом ICK (это «ноттин»). β-Шпилька выступает из «мини-глобулярного ядра», стабилизированного тремя дисульфидными мостиками (порядок: C¹–C⁴, C²–C⁵ и C³–C⁶). Hm-3 амфифиллен: два соседствующих гидрофобных кластера на поверхности молекулы окружены кольцом заряженных групп. Интересно, что гидрофобный кластер на поверхности ингибиторов Na_v из яда мигаломорфных пауков лежит с противоположной стороны молекулы (см. рисунок 12).

3.7.2. Токсин Hm-3 — основа для создания лекарства от периодического паралича

С гипокалиемическим периодическим параличом ассоциированы мутации в гене Na_v1.4 (*SCN4A*), которые затрагивают остатки аргинина в сегментах S4 (сенсорах потенциала) ПЧД и приводят к возникновению «ω-токов» или «токов через воротную пору» (“gating pore currents”, I_{GP}) — в дополнение к току через основную пору или «α-току» (I_{Na}). Мы решили проверить, могут ли токсины-модификаторы воротных механизмов ингибировать ω-токи; эксперименты выполняли в сотрудничестве с Институтом неврологии Университетского колледжа Лондона (Великобритания). Hm-3 ингибировал ω-токи через каналы Na_v1.4 с заменами R222W и R222G (затрагивают воротный заряд “R2” в ПЧД I; рисунок 13). Значение IC₅₀ для каналов Na_v1.4_R222G составило 5,4 ± 0,8 мкМ при –80 мВ; IC₅₀ в отношении α-токов Na_v1.4 дикого типа составляло 103 ± 15 нМ.

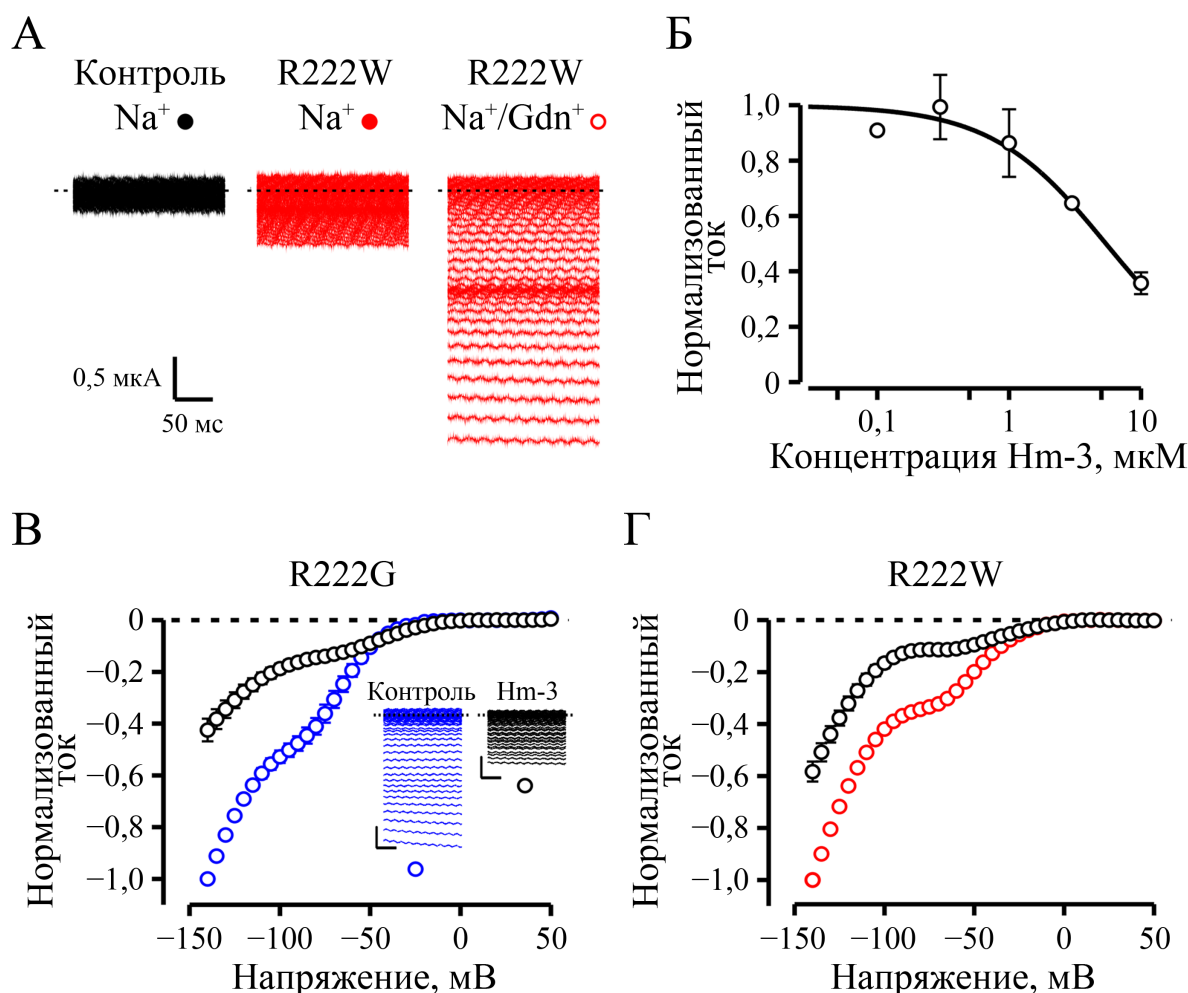
Мы изучили действие Hm-3 на серии мутантных каналов, которые проводят ω-токи, с заменами: R219G (R1, ПЧД I), R225G (R3, ПЧД I), R672G (R2, ПЧД II) и R1132Q (R2, ПЧД III). Токсин оказался эффективен только на Na_v1.4_R225G. Общим для токсинов-модификаторов воротных механизмов служит их взаимодействие с мотивом «весла» (спираль-петля-спираль S3-S4). Мы исследовали активность Hm-3 на каналах K_v2.1, в которых этот мотив был пересажен из различных ПЧД Na_v1.4; эксперименты были выполнены в Медицинской школе Университета Джонса Хопкинса (США). Токи через гибридные каналы значительно угнетались при приложении Hm-3 только в случае внесения мотива из ПЧД I.

Рисунок 12. Пространственная структура Hm-3 и сравнение ее с другими ингибиторами активации ионных каналов из яда пауков. Показаны структуры Hm-3 (PDB ID: 2MQU), HWTX-IV (2M4X), HaTx1 (1D1H) и ProTx II (2N9T). В верхнем ряду ленточные представления, дисульфидные мостики показаны желтым, спиральные участки — розовым, β -тяжи — голубым, петлевые участки — серым. В среднем и нижнем ряду — молекулярные поверхности пептидов, раскрашенные в соответствии со свойствами а.о. как в таблице 4.



Мы делаем вывод о ПЧД I как новом обнаруженном нами специфическом сайте связывания токсинов-модуляторов воротных механизмов Na_v . Комплекс Hm-3 с активированным состоянием ПЧД I $\text{Na}_v1.4$ моделировали с использованием AlphaFold 3 (рисунок 14). По всей видимости, амфифильная структура Hm-3 позволяет ему 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 . В настоящее время структура неактивированного состояния ПЧД I $\text{Na}_v1.4$ неизвестна, поэтому комплекс Hm-3 с таким состоянием канала не может быть смоделирован точно. Представляется вероятным, однако, что в основе повышенного сродства токсина к неактивированному состоянию лежит компактизация его сайта связывания. Наши данные говорят о том, что стабилизация сенсора потенциала посредством Hm-3 в неактивированном состоянии сама по себе не приводит к ингибированию ω -токов. Мы предполагаем, что Hm-3 либо непосредственно блокирует воротную пору, либо приводит к локальному конформационному изменению, достаточному для ее сужения.

Рисунок 13. Hm-3 ингибирует ω -токи через мутантные каналы $\text{Na}_v1.4$. (А) Записи токов через каналы дикого типа или $\text{Na}_v1.4_R222W$ в отсутствие и присутствии гуанидина (Gdn^+). (Б) Кривая «доза–ответ» ингибирования ω -токов через $\text{Na}_v1.4_R222G$ токсином Hm-3 при -80 мВ ($n = 3-10$). (В, Г) Вольт-амперные характеристики ω -токов через каналы $\text{Na}_v1.4_R222G$ и $\text{Na}_v1.4_R222W$ в отсутствие (цветные символы) или в присутствии 10 мкМ Hm-3 (черные символы; $n = 4-10$). Во вставках на (В) показаны записи токов. Данные нормализованы к амплитуде тока при -140 мВ в отсутствие Hm-3. [Шкала: 50 мс (х), 1 мкА (у).] Данные показаны как средние $\pm$ SE.



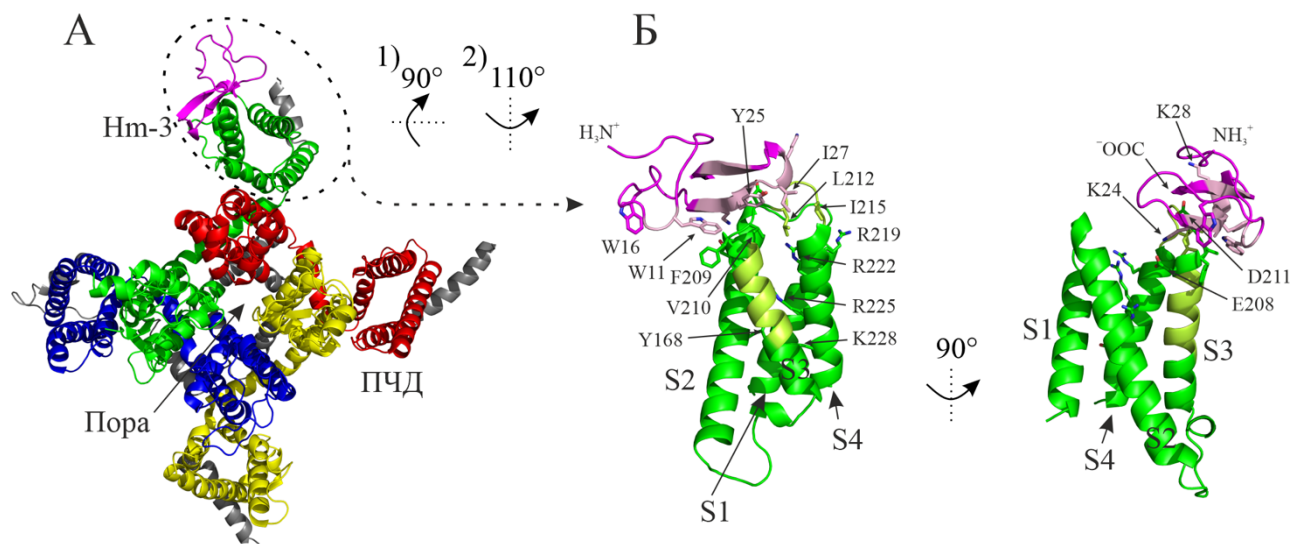
Стоит оговориться, что клиническая применимость Hm-3 ограничена. Однако среди многообразия токсинов могут найтись новые ингибиторы ω -токов с оптимальными свойствами. Изучение комплексов токсинов с каналами поможет выявить функционально важные а.о. и в конечном итоге разработать селективные низкомолекулярные ингибиторы ω -токов.

Результаты исследований токсинов *H. melloteei* опубликованы (№№ 2, 3, 31, 44, 53, 59).

3.7.3. Токсины из яда паука *Agelena orientalis*

Если яд *H. melloteei* показал высокую неспецифическую активность в отношении ряда изоформ Na_v млекопитающих, то яд паука *Agelena orientalis* (NCBI/UniProt taxon identifier: 293813; семейство Agelenidae) представляет интерес как раз из-за отсутствия таких эффектов.

Рисунок 14. Взаимодействие Hm-3 с ПЧД I $\text{Na}_v1.4$. (А) Модель комплекса Hm-3 с каналом $\text{Na}_v1.4$ [для создания модели использована известная структура (PDB ID: 6AGF), расположение токсина взято из предсказания AlphaFold 3]. Показан вид «сверху», т.е. на плоскость мембраны со внеклеточной стороны. Молекула Hm-3 выделена малиновым; гомологичные повторы канала окрашены разными цветами. (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 стержнями. Также показаны воротные заряды в S4 и остаток тирозина в S2 (центр переноса заряда).



Яд *A. orientalis* обладает высокой токсичностью на насекомых: например, в отношении личинок мясной мухи *Sarcophaga carnaria* ЛД₅₀ $\approx$ 3 мкг/г. В концентрации 0,1 мг/мл яд *A. orientalis* оказывает выраженное действие на Na^+ канал дрозофилы DmNa_v1 , поэтому мы использовали его для идентификации новых селективных лигандов Na_v насекомых. Для разделения яда *A. orientalis* мы использовали ОФ-ВЭЖХ в основных условиях, активные фракции затем разделили в кислых условиях. Всего очистили семь новых пептидов, получивших название β/δ -агатоксинов (таблица 5).

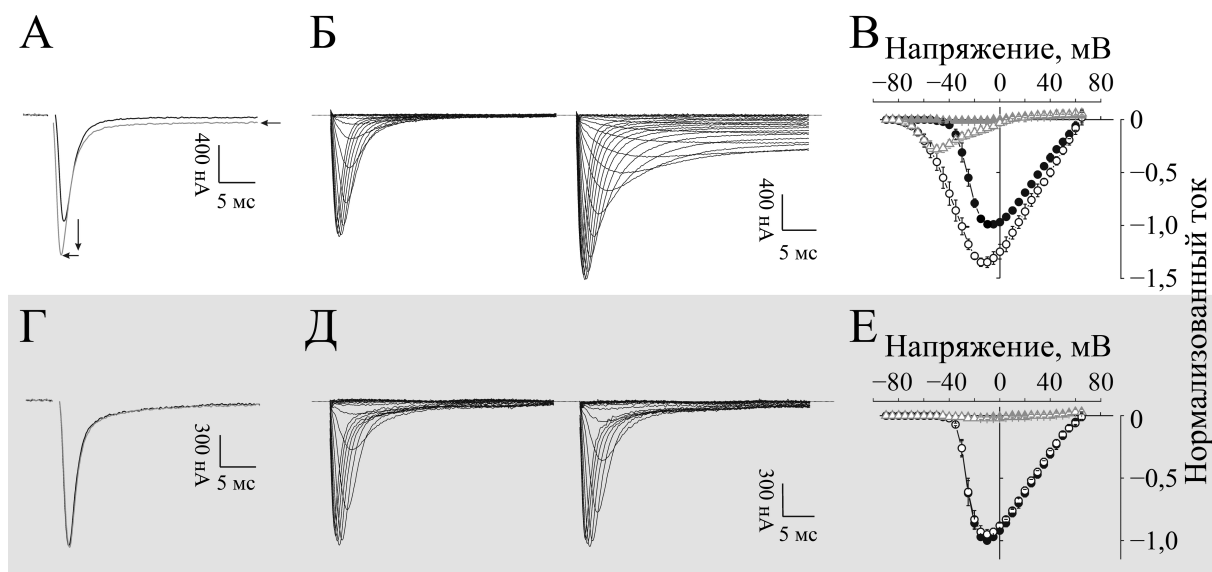
Приложение 1 мкМ β/δ -Aga-1 к DmNa_v1 привело к трем эффектам (рисунок 15А–В): (а) амплитуда тока увеличилась на $35,2 \pm 4,8\%$; (б) время до пика I_{Na} уменьшилось с $1,07 \pm 0,12$ до $0,86 \pm 0,11$ мс; (в) появился значительный постоянный неинактивирующийся ток (I_{NaP}) величиной $5,5 \pm 2,2\%$ от пика. Эффекты токсина в отношении вольт-амперной характеристики мы изучили как для пиковых (I_{Na}), так и для постоянных токов (I_{NaP}). 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 потенциала с максимальной долей $20,7 \pm 2,4\%$ от пикового I_{Na} при -45 мВ. Важно, что в той же концентрации (1 мкМ) β/δ -Aga-1 не проявил никакой активности на каналах млекопитающих (рисунок 15Г–Е).

Таблица 5. Сравнение аминокислотных последовательностей β/δ -агатоксинов.

Название пептида	UniProt ID	Последовательность									
		1	5	10	15	20	25	30	35	38	
β/δ-Aga-1	Q5Y4V3	GDC	VGES	QQ	CAD	WSGP	Y	CC	KGYY	CT	CRYFPK CI CVNDN
β/δ-Aga-2	Q5Y4V2	GG	VGES	QQ	CAD	WSGP	Y	CC	KGYY	CT	CRYFPK CI CVNDN
β/δ-Aga-3	Q5Y4V6	-G	CVGEN	QQ	CAD	WAGPH	CC	SGYY	CT	CRYFPK CI CRKDS	
β/δ-Aga-4	Q5Y4U8	-G	CVGEN	QQ	CAD	WAGLH	CC	SGYY	CT	CRYFPK CI CRKDS	
β/δ-Aga-5	Q5Y4U7	-D	CVGENGR	CRD	WY	-ND	CC	DGFY	CS	CRQPPY CI CRNNN	
β/δ-Aga-6	Q5Y4U6	-E	CVGENGH	CRS	WY	-ND	CC	DGY	CS	CMQPPN CI CRNNN	
β/δ-Aga-7	Q5Y4V8	-E	CAAKNKRC	AD	WAGPW	CC	EGLY	CS	CRSYPG	CM CRPNS	

Все пептиды имеют С-концевое амидирование. Разрывы внесены для удобства сравнения последовательностей. Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. Отличающиеся от β/δ -Aga-1 а.о. показаны на сером фоне.

Рисунок 15. 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 *Drosophila melanogaster* (А–В) и отсутствия эффектов на $\text{Na}_v1.2$ из *Rattus 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 $\text{Na}_v1.2$) 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 $\pm$ SE.



β/δ -Агатоксины сочетают свойства модуляторов двух воротных механизмов Na_v — активации (облегчают) и инактивации (приводят к возникновению I_{NaP}). Это мы отразили в их названии: префикс “ β ” традиционно обозначает модуляторы активации, а “ δ ” — инактивации. β/δ -Aga-1 показал близкие значения EC_{50} для двух эффектов на DmNa_v1 : $288,2 \pm 116,4$ нМ и $220,2 \pm 32,9$ нМ (коэффициент Хилла $h \approx 1,5$ в обоих случаях), что говорит в пользу одного сайта связывания.

Вместе с μ -агатоксинами, куртотоксинами и δ -палутоксинами β/δ -агатоксины образуют семейство близкородственных пептидов с разнообразными свойствами. На этом примере нам удалось показать, что природные комбинаторные библиотеки токсинов могут использоваться в структурно-функциональных исследованиях: детальное сравнение активности природных вариантов β/δ -Aga позволило предположить функциональную значимость отдельных а.о. β/δ -Aga представляются перспективной основой для разработки новых пестицидов. Результаты изучения β/δ -агатоксинов опубликованы (№ 7).

3.7.4. α -Токсины скорпионов, ингибирующие инактивацию Na^+ каналов

Мы собрали базу данных α -NaTx в виде таблиц; размещение ее в интернете в удобной для пользователей форме (как это сделано в случае Kalium) — дело будущего. Для токсинов с известной структурой, а также для построенных по гомологии моделей мы провели МД и анализ конформационной подвижности, выполнили оценку гидрофильных / гидрофобных свойств молекулярной поверхности с использованием молекулярного гидрофобного потенциала (МГП) и белковой топографии. Оказалось, что структура α -NaTx состоит из двух частей или модулей: сравнительно консервативного и жесткого «сердцевинного» / «короваго» модуля и вариабельного и подвижного модуля специфичности. Последний включает в себя три участка аминокислотной последовательности α -NaTx, сближенные в пространстве: короткую петлю в N-концевой области, петлю β -шпильки $\beta 2$ - $\beta 3$ и C-концевую область (см. выделение серым в таблице 6). Классические «млекотоксины», показывающие высокую активность на Na_v млекопитающих, обладают наиболее конформационно гибким и гидрофильным модулем специфичности, а у «инсектотоксинов» он жесткий и гидрофобный. Частично гибкость N-концевой петли млекотоксинов объясняется наличием консервативных остатков глицина в положениях 4 и 17, которые выступают как «шарниры».

Мы получили несколько рекомбинантных α -NaTx: BeM9 (UniProt ID: P09981) и MeuNaTx α -1 (P86408) из яда *M. eueus*, а также Lqq IV (P01489) из яда *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Buthidae; см. таблицу 6) — и изучили их активность на панели Na_v (рисунок 16). BeM9 — типичный « α -подобный» токсин, он активен на каналах и млекопитающих, и насекомых; устойчивой оказалась изоформа $\text{Na}_v1.2$, характерная для центральной нервной системы (ЦНС). Мы также получили производные BeM9 с измененной селективностью действия. Для этого мы вносили в последовательность токсина замены, модифицирующие подвижность и/или гидрофильность модуля специфичности (см. таблицу 6). Активность BeM9 и его производных мы тестировали на изоформах Na_v млекопитающих и канале таракана BgNa_v1 (таблица 7).

Таблица 6. α -NaTx и их производные, использованные в работе.

Источник ¹	Название	UniProt ID	Последовательность
			1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 66
<i>A. australis</i>	Aah II	P01484	VKDGYIVDDVNCYF CG --RNAYCNEE CT KLKGESGYCQWASPYGNAC YC YKLPD HV RTKGPGRCH-NH ₂
<i>M. eueus</i>	MeuNaTx α -1	P86408	VRDGYIADDKNCAYF CG --RNAYCDEE CK KKGAESGYCQWAGQYGNAC WC YKLPDKVPIKVS GC KN-NH ₂
	BeM9	P09981	ARDAYIAKPHNCVYE C YNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQILGKYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
Искусственные производные BeM9	BeM9-1		ARDGYIAKPHNCVYE C GNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQILGKYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-2		ARDAYIAKPHNCVYE C YNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQIQGKYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-3		ARDGYIAKPHNCVYE C GNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQIQGKYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-4		ARDAYIAKPHNCVYE C YNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQILGKYGNAC WC IQLPDNVPIKIPGKCH
	BeM9-5		AKDAYIAKPHNCVYE C YNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQILGKYGNAC WC IQLPDNVPIKIPGRCH
	BeM9-6		ARDAYIAK NYN CVYE C YNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQILGKYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-7		ARDAYIAK DDN CVYE C YNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQILGKYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-8		ARDAYIAKPHNCVYF C YNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQILGKYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-9		ARDAYIAKPHNCVYD C YNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQILGKYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-10		ARDGYIAK DDV CVYE C GNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQIASPYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-11		ARDGYIAK DDV CTYF CG --RNA C NDL C TENGAESGYCQWASPYGNAC WC IQLPD HV RTKGPGRCH
	BeM9-12		ARDAYIAE PHN CVYE C YNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQILGKYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
	BeM9-13		ARDAYIAE PHN CVYE C GNPKGSY C NDL C TENGAESGYCQILGKYGNAC WC IQLPDNVPIRIPGKCH
<i>L. q. quinquestriatus</i>	Lqq IV	P01489	GVRDAYIADDKNCVYT CG --SNSY C NTE CT KNGAESGYCQWLKGYGNAC WC IKLPDKVPIRIPGKCR-NH ₂
<i>O. doriae</i>	OD1	P84646	GVRDAYIADDKNCVYT CA --SNGY C NTE CT KNGAESGYCQWIGRYGNAC WC IKLPDEVPPIRIPGKCR-NH ₂

¹*A. australis* — *Androctonus australis*; *L. q. quinquestriatus* — *Leiurus quinquestriatus* (подвид *quinquestriatus*); *O. doriae* — *Odontobuthus doriae*. Сверху нумерация для BeM9. В последовательности внесены разрывы для удобства сравнения. Остатки цистеина показаны на желтом фоне; а.о., составляющие модуль специфичности, — на сером фоне. -NH₂, С-концевое амидирование. Замены в структуре производных BeM9 выделены полужирным шрифтом.

Рисунок 16. Селективность α -NaTx в отношении изоформ Na_v . Приведены записи токов, зарегистрированных в ооцитах *X. laevis* с экспрессией изоформ Na_v , в контроле (черные кривые) или в присутствии 1 мкМ токсина (синие кривые).

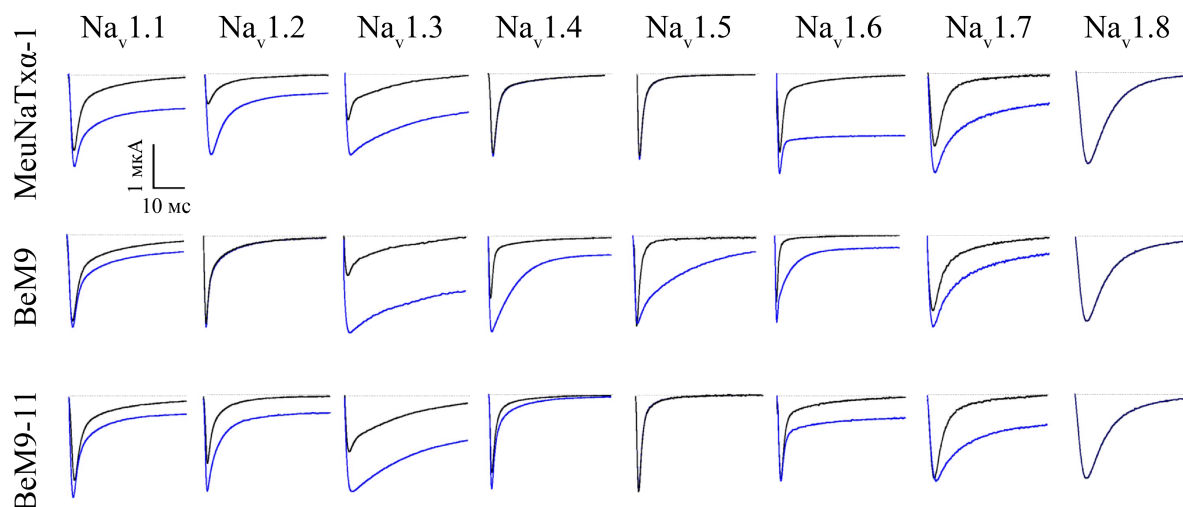


Таблица 7. Активность BeM9 и его производных на Na_v .

Название	Эффективность ингибирования инактивации ¹				
	$Na_v1.2$	$Na_v1.4$	$Na_v1.5$	$Na_v1.6$	Bg Na_v1
BeM9	— ²	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

¹Отношение $\frac{I_{\text{токсин}}^{5 \text{ мс}}}{I_{\text{контроль}}^{Na, \text{max}}}$ для $Na_v1.5$ и $\frac{I_{\text{токсин}}^{30 \text{ мс}}}{I_{\text{контроль}}^{Na, \text{max}}}$ для всех других каналов, где $I_{\text{токсин}}^{5 \text{ мс}}$ и $I_{\text{токсин}}^{30 \text{ мс}}$ — сила тока через мембрану ооцита спустя 5 мс и 30 мс соответственно после тестового импульса при добавлении токсина, а $I_{\text{контроль}}^{Na, \text{max}}$ — амплитуда тока в отсутствие токсина. Приведены значения, полученные при концентрации полипептидов 1 мкМ. ²—, нет активности. $n = 3$; $SE < 15\%$.

Интересно, что пересадка модуля специфичности из млекотоксина (BeM9-10) 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 $Na_v1.2$. Одиночная замена в RT-петле (BeM9-12) увеличила селективность к

каналу насекомого, а введение затем одного из шарнирных глицинов создало инсектоселективный токсин (ВеМ9-13).

Пространственную структуру MeuNaTx α -1 (PDB ID: 6THI) мы изучили с использованием рекомбинантного токсина с природным содержанием изотопов, в случае ВеМ9 (5MOU) получили ^{15}N -меченый образец, а для Lqq IV (8BO0) использовали двойное мечение ^{13}C и ^{15}N . Укладка всех трех токсинов (рисунок 17А) типична для α -NaTx и представлена топологией $\beta\alpha\beta\beta$. Мы приписали *цис*-конфигурацию пептидной связи Р9–Н10 у ВеМ9 (рисунок 17Б), что подтверждается сильным ядерным эффектом Оверхаузера между протонами С $^{\alpha}$ Н этих а.о. Такая *цис*-пептидная связь служит общей чертой ряда α -подобных токсинов.

R60 — особый а.о. ВеМ9, представляющий «связующее звено» модуля специфичности (рисунок 17В). Его положение фиксируется π -катионным взаимодействием с Y44, который, в свою очередь, строго позиционируется благодаря π -катионному взаимодействию с K43. Гуанидиновая группа R60 связывает карбонилы основной цепи N11, I61 и G63 водородными связями. Мы предложили называть структурный мотив, включающий Н-связи остатка аргинина с основной цепью, «аргининовой рукой» — ввиду его сходства с человеческой рукой. Аргининовую руку можно рассматривать как подгруппу мотива «ниши».

В модуле специфичности MeuNaTx α -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». Аминокислотная последовательность модуля специфичности Lqq IV уникальна (таблица 6). С одной стороны, он имеет характерный дублет остатков аспарагиновой кислоты и соответственно мотив гнезда (D9; рисунок 17Г). С другой стороны, он имеет мотив аргининовой руки в С-концевой области (R59).

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. Теперь же известно, что именно он формирует контакты с Na $_v$. Результаты наших исследований α -NaTx опубликованы (№№ 23, 42, 45, 58, 62, 68, 72).

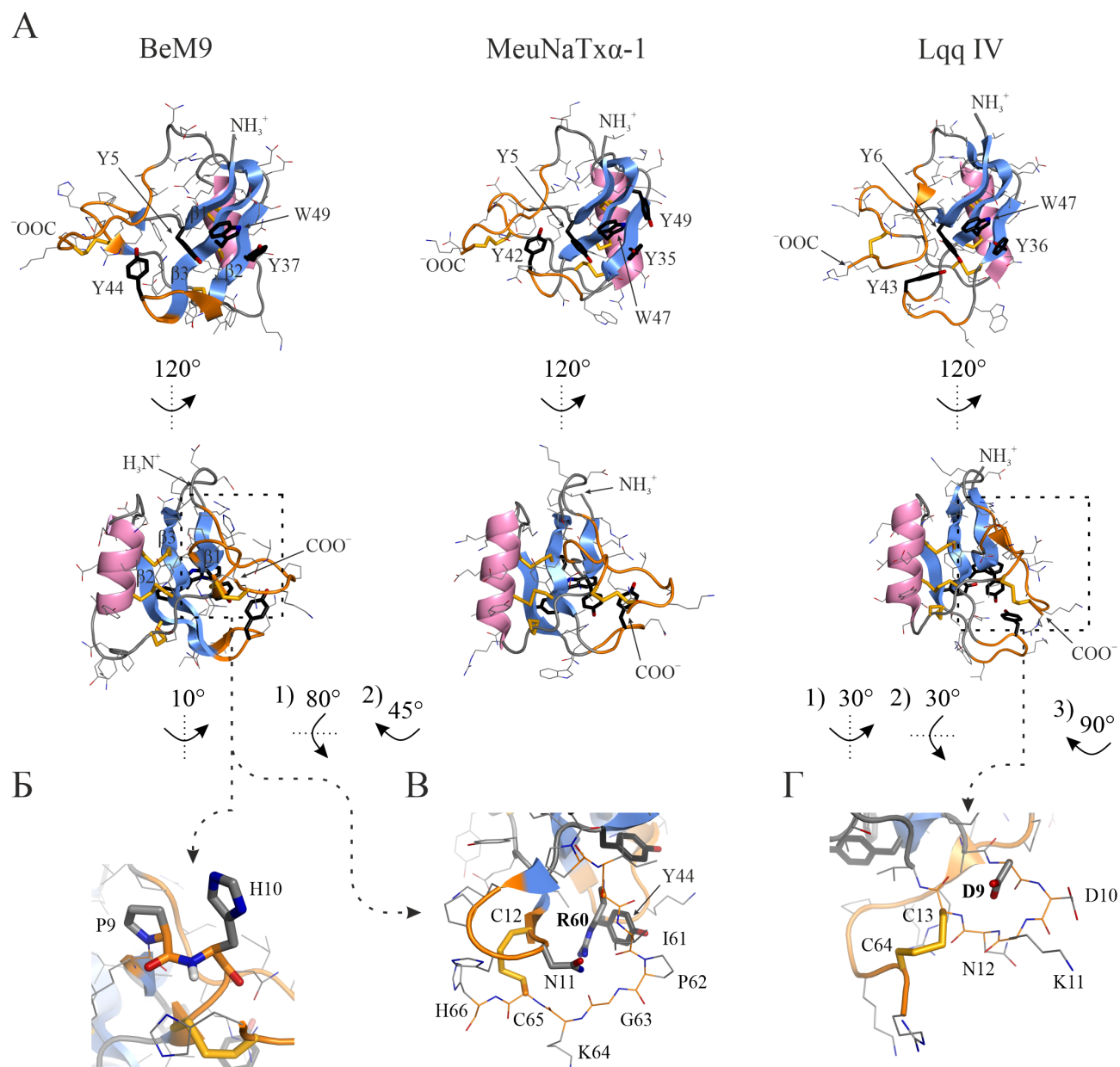
3.7.5. Воздействие α -NaTx на внутриклеточные сигнальные каскады

Мы изучили воздействие яда паукообразных на внутриклеточные сигнальные каскады чувствительных нейронов в сотрудничестве с Университетской больницей Кёльна (Германия). Выделенные нейроны спинальных ганглиев крыс подвергали воздействию исследуемых веществ, после чего оценивали изменение степени фосфорилирования MAP-киназ ERK1/2 и/или регуляторной субъединицы протеинкиназы А типа II- α . Яд пауков-вдов *Latrodectus* индуцировал активность ERK1/2. Все протестированные яды скорпионов вызывали сильное увеличение активности как ERK1/2, так и PKA-II. Для дальнейшего исследования мы выбрали яд *M. eureus*. Одним из активных токсинов оказался MeuNaTx α -1.

Предварительное приложение к нейронам ТТХ дозозависимо снижало эффективность MeuNaTx α -1, что указывает на Na $_v$ как мишень, опосредующую активацию внутриклеточной передачи сигналов. Мы тестировали другие α -NaTx с известным профилем активности: ВеМ9 и ВеМ9-11 (см. таблицу 6 и рисунок 16).

ВеМ9 не был активен, а ВеМ9-11 стимулировал сигналинг. Сравнение селективности трех токсинов показывает, что способность индуцировать внутриклеточную передачу сигналов коррелирует только с активностью на $\text{Na}_v1.2$. Это подтвердилось использованием токсина PaurTx 3 из яда паука *Phrixotrichus scrofa*, селективно ингибирующего $\text{Na}_v1.2$. Мы предполагаем, что MeuNaTx α -1, воздействуя на Na_v , деполяризует нейроны, что приводит к притоку Ca^{2+} через Ca_v и активации киназных каскадов. Наши данные опубликованы (№ 57).

Рисунок 17. Пространственная структура и мотивы α -NaTx. (А) ВеМ9 (PDB ID: 5MOU), MeuNaTx α -1 (6THI) и Lqq IV (8BO0) показаны в ленточном представлении, окраска главной цепи как на рисунке 12, атомов боковых заместителей — как на рисунке 10. Участки основной цепи модуля специфичности выделены оранжевым. (Б) Для ВеМ9 показан участок последовательности K8–N11 в скелетном представлении; P9 и H10 показаны стержнями, с атомом водорода пептидной связи. (В) Крупный план части модуля специфичности ВеМ9. Участок последовательности P58–H66 в скелетном представлении. N11 и R60 показаны стержнями. (Г) Крупный план части модуля специфичности Lqq IV. Участок последовательности D9–C13 в скелетном представлении. D9 показан стержнями.



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 нейротрансмиссии, а также в развитии ряда заболеваний обусловило немалый интерес к этим объектам, в том числе со стороны токсикологов. В сотрудничестве с лабораторией О.А. Крышталя (Институт физиологии НАН Украины) мы охарактеризовали новый модулятор Ca^{2+} каналов млекопитающих, очищенный из яда паука *Alopecosa marikovskiyi* (NCBI/UniProt taxon identifier: 2066572; семейство Lycosidae) и названный нами ω -Lsp-IA. Он ингибировал Ca^{2+} каналы Р-типа в клетках Пуркиньи мозжечка крысы. Схема установления аминокислотной последовательности ω -Lsp-IA (UniProt ID: P85079) изображена на рисунке 2. Последний а.о. идентифицировали по разнице измеренной ММ С-концевого фрагмента и рассчитанной по установленной с помощью деградации по Эдману последовательности. Она подтвердилась транскриптомными данными (GenBank ID: EF187331).

Мы получили рекомбинантный ω -Lsp-IA и изучили его активность. Приложение в насыщающих концентрациях (≥ 10 нМ) ω -Lsp-IA заметно замедляло активацию и несколько уменьшало амплитуду Р-тока, не влияя на кинетику деактивации во всем диапазоне потенциалов. Замедление активации проявлялось в появлении второй, более медленной компоненты тока. Для проверки селективности действия ω -Lsp-IA мы использовали нейроны гиппокампа крысы, экспрессирующие основные типы Ca^{2+} каналов. После инкубации со 100 нМ ω -Aga IVA, селективного ингибитора Ca^{2+} каналов Р-типа из яда паука *Agelenopsis aperta*, приложение токсина ω -Lsp-IA не давало эффекта. Таким образом, ω -Lsp-IA, по всей видимости, селективно действует на Ca^{2+} каналы Р-типа ($\text{Ca}_v2.1$), среди известного разнообразия модуляторов которого токсин выделяется своим «мягким» действием. Результаты нашего исследования опубликованы (№ 1).

3.9. Пуротоксины — компоненты яда пауков, воздействующие на P2X рецепторы

К середине 2000-х гг. в литературе накопились сведения о ведущей роли специализированных ионных каналов в восприятии болевых ощущений (ноцицепции). К ним относятся рецепторы внеклеточного АТФ из семейства P2X, они вовлечены в развитие патологических болевых состояний и служат молекулярной мишенью для разработки анальгетиков нового поколения. Наши исследования в этой области стали пионерскими и до сих пор не имеют аналогов.

Оказалось, что яд паука-волка *A. marikovskiyi* оказывает ингибирующее действие на рецепторы чувствительных нейронов крысы. Мы разделили этот яд (рис. 18) и обнаружили (суб)фракции, модулирующие P2X₃ рецепторы. Субфракция, элюирующаяся рано, содержала активный пептидный компонент, который мы назвали пуротоксином-1 (PT1); он содержит 35 а.о. и 4 S-S-мостика (UniProt ID: P86269; таблица 7). Другая субфракция характеризуется большим временем удерживания, активный компонент получил название пуротоксин-2 (PT2); он содержит 64 а.о., 4 S-S-мостика и имеет С-концевое амидирование (V3EWH0). PT2 относится к «модульным» токсинам (специальный раздел ниже).

Рисунок 18. Выделение пуротоксинов 1 и 2 из яда паука *A. marikovskiyi*. (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 C₁₈ (4,6×250 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктирной линией. Пики, соответствующие содержащим пуротоксины субфракциям, отмечены.

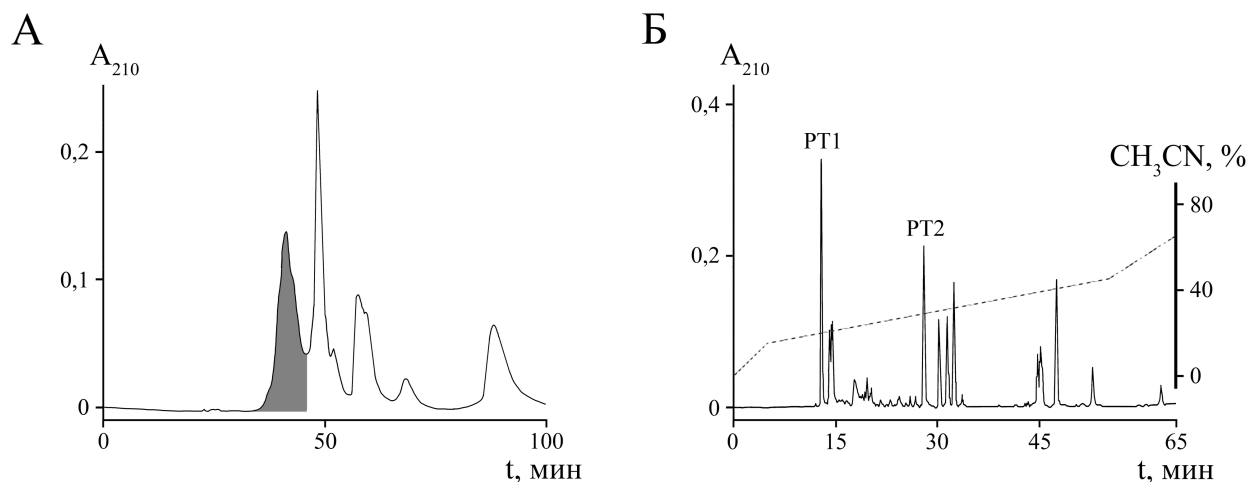


Таблица 7. Сравнение аминокислотных последовательностей РТ1 и 6.

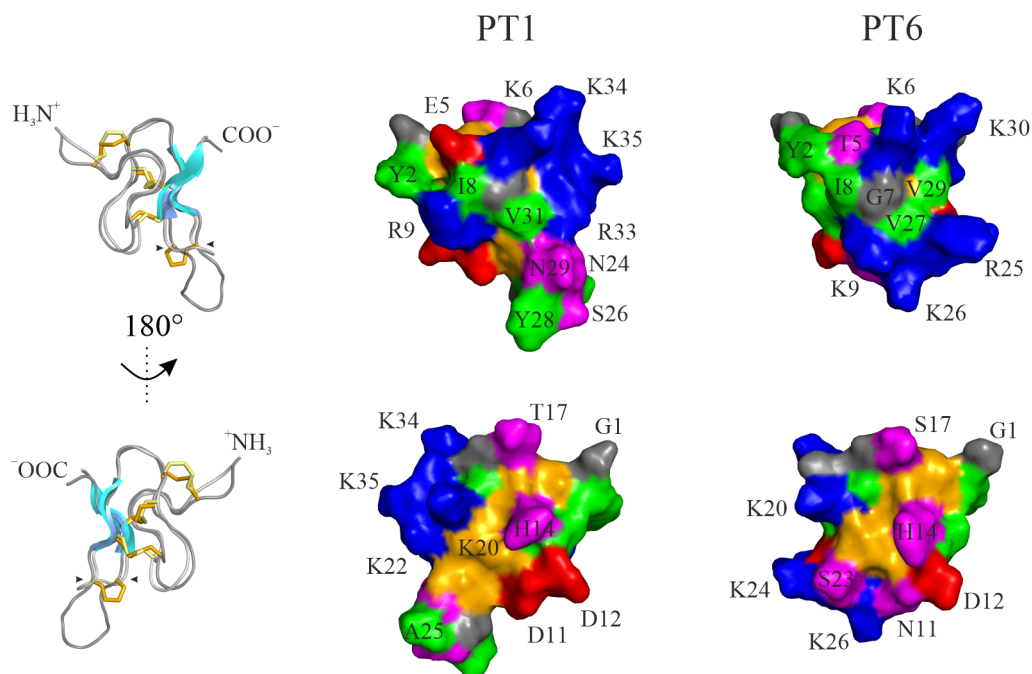
Пептид	UniProt ID	Последовательность																																		
		1	5	10	15	20	25	30	35																											
PT1	P86269	G	Y	C	A	E	K	G	I	R	C	D	D	I	H	C	C	T	G	L	K	C	K	C	N	A	S	G	Y	N	C	V	C	R	K	K
PT6	A0A4P1LYD9	G	Y	C	A	T	K	G	I	R	C	D	D	I	H	C	C	S	G	L	K	C	D	S	K	R	---	---	K	V	C	V	K	G		
		1	5	10	15	20	25	26	31																											

В последовательность РТ6 внесен разрыв для удобства сравнения. А.о. раскрашены в соответствии со свойствами как в таблице 4.

В базах данных UniProt и GenBank мы обнаружили последовательности, похожие на РТ1. Чтобы еще расширить репертуар, мы секвенировали транскрипты ядовитых желез семи видов, принадлежащих к разным семействам пауков. Мы получили РТ1 и гомологичные ему пептиды из *A. orientalis* (семейство Agelenidae), *Ch. punctorium* (Cheiracanthiidae), *L. tarabaei* (Zodariidae), *O. takobius* (Oxyopidae), *Thomisus onustus* (NCBI/UniProt taxon identifier: 1872008; Thomisidae), *Tibellus oblongus* (Philodromidae), *Viridasius fasciatus* (Ctenidae). Пептид из *Th. onustus* назвали пуротоксином-6 (РТ6; UniProt ID: A0A4P1LYD9; таблица 7), его активность в отношении токов, опосредуемых пуриновыми рецепторами, была неотличима от РТ1.

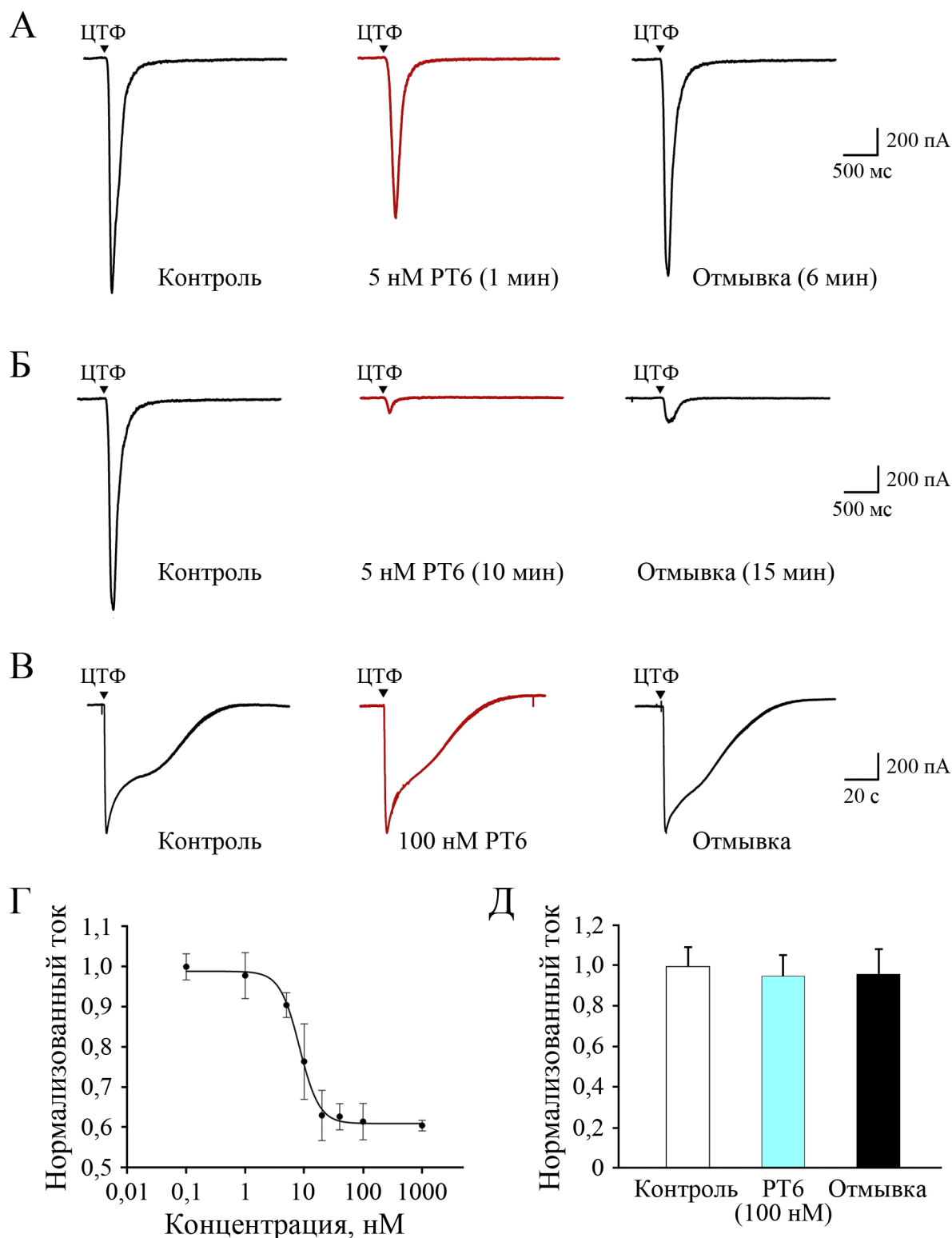
Пространственная структура РТ1 (PDB ID: 2KGU) и РТ6 (6F61; рисунок 19) представлена мотивом ИСК. У РТ1 петля, ограниченная дополнительным дисульфидным мостиком С23–С30, выступает из компактной мини-глобулы пептида. Можно сказать, что РТ6 — уменьшенная, «оптимизированная» версия РТ1, у которой эта петля и дополнительный S-S-мостик удалены.

Рисунок 19. Сравнение структуры РТ1 и РТ6. Слева пептиды показаны в ленточном представлении, проведено 3D-выравнивание. У РТ1 (PDB ID: 2KGU) окраска элементов вторичной структуры как на рисунке 12; у РТ6 (6F61): дисульфидные мостики показаны светло-желтым, β -тяжи — бирюзовым, петлевые участки — светло-серым. Дополнительный дисульфидный мостик у РТ1, ограничивающий удлиненную петлю β -шпильки, указан треугольниками. Справа показаны молекулярные поверхности пептидов, раскрашенные в соответствии со свойствами а.о. как в таблице 7.



Вначале мы изучили механизм действия РТ1 на Р2Х3 рецепторы нейронов спинальных ганглиев крысы, для этого использовали метод локальной фиксации потенциала. При воздействии на десенситизированное состояние рецепторов РТ1 значительно снижал последующие ответы Р2Х3 на АТФ. По всей видимости, пептид замедляет процесс выхода рецепторов из десенситизации. РТ2 и 6 обладали сходными эффектами. Затем мы изучили активность пуротоксинов в условиях экспрессии генов рецепторов в клетках млекопитающих (НЕК 293 и СНО); эксперименты выполняли в сотрудничестве с лабораторией С.С. Колесникова (Институт биофизики клетки РАН). Оказалось, что РТ1, 2 и 6 эффективно ингибируют рекомбинантные Р2Х3 рецепторы, но не Р2Х2 или гетеромерные Р2Х2/3 рецепторы (рисунок 20). Ингибирующий эффект развивался медленно: предварительная инкубация клеток СНО, экспрессирующих Р2Х3 рецепторы человека, с 10 нМ РТ6 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 $\approx 40\%$ в концентрациях РТ6 100 нМ и выше (рисунок 20А, Б). Мы построили кривую «доза–ответ» для РТ6 при инкубации в течение 1 мин; значение EC_{50} составило $8,4 \pm 0,5$ нМ ($h = 2,7 \pm 0,3$; рисунок 20Г). Мы не обнаружили никакой активности РТ1 или 6 в отношении ряда потенциал-чувствительных и лиганд-активируемых ионных каналов, включая изоформы Ca_v , K_v , Na_v , nAChR, ASIC, TRPV. РТ1 — первый известный селективный пептидный модулятор Р2Х3 рецепторов.

Рисунок 20. Активность РТ6 на пуриновых рецепторах, экспрессированных в клетках СНО. (А и Б) Репрезентативные записи токов, опосредованных Р2Х3 рецепторами, в ответ на приложение 100 мкМ ЦТФ. (А) При кратковременной (1 мин) предварительной инкубации эффект 5 нМ РТ6 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 Р2Х2/3. (Г) Кривая «доза–ответ» для Р2Х3 рецепторов и предварительной инкубации в течение 1 мин ($n = 14$; средние значения $\pm$ SD). (Д) Амплитуда ответов для гетеротримеров Р2Х2/3 ($n = 12$).



P2X₃ рецепторы вносят существенный вклад в болевую чувствительность, в частности при воспалении. Поэтому мы оценили активность пуротоксинов в болевых моделях на животных, наибольшее число тестов было выполнено для РТ6. Мы использовали формалиновый тест, «уксусные корчи», тест с полным адъювантом Фрейнда, модель остеоартрита, вызванного введением йодацетата, и модель невралгии, вызванной перевязкой подглазничного нерва. Во всех случаях РТ6 оказался эффективен в малых дозах (0,01–0,1 мг/кг). Наиболее вероятным побочным эффектом ингибиторов P2X₃ рецепторов является дисгевзия (расстройство вкуса). Мы проверили, влияет ли РТ6 на вкусовую чувствительность мышей, используя стандартный «двухбутылочный» тест. В отличие от джефапиксанта и камлипиксанта, низкомолекулярных ингибиторов P2X₃, РТ6 не затронул вкусовые предпочтения (в дозе 1 мг/кг). Наши коллеги в Институте биологии гена РАН получили мышей с нокаутом гена *P2rx3*, используя систему CRISPR-Cas9. В тесте «уксусные корчи» на таких мышах РТ6 и джефапиксант не показали активности, в отличие от диклофенака, нестероидного противовоспалительного препарата, который продолжал действовать.

Наши результаты исследований пуротоксинов опубликованы (№№ 6, 10, 18, 38, 74).

3.10. Слитные конструкторы из нейротоксинов и флуоресцентных белков

Флуоресцентные белки (FP) семейства GFP стали вездесущими молекулярными инструментами визуализации биологических объектов. Чаще всего ген FP клонируют в одной рамке считывания с геном изучаемого белка, в результате экспрессии образуются слитные белки. Мы решили распространить использование FP на область полипептидных нейротоксинов (Tx), связывающихся с ионными каналами. Слитные белки вида FP-Tx характеризуются модульным строением с разделением функций: модуль FP служит флуоресцентной меткой, а модуль Tx способен селективно связываться с определенными ионными каналами.

Вначале мы решили получить FP-Tx, у которых модулем Tx служит блокатор K⁺ каналов (KTx). Мы разработали две конструкции, кодирующие FP-Tx (см. рисунок 21А, Б); для этого выбрали два хорошо изученных KTx: OSK1 из яда *O. scrobiculosus* (α -KTx 3.7; таблица 1) и AgTx-2 из *L. quinquestriatus hebraeus* (α -KTx 3.2); и два FP: eGFP (FPbase ID: R9NL8) и TagRFP (S4HC8). Активность химер FP-Tx мы тестировали на K_v в сравнении с исходными токсинами. FP-Tx хорошо воспроизводят фармакологические свойства интактных токсинов (очень близкие значения IC₅₀ в наномолярном диапазоне). Неожиданно оказалось, однако, что обе химеры утратили активность на K_v1.2. Это означает, что перед использованием активность полученных химер необходимо подтверждать.

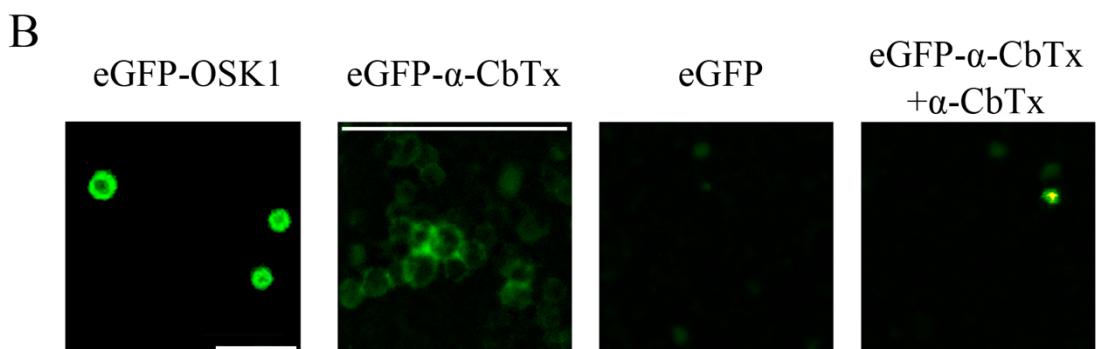
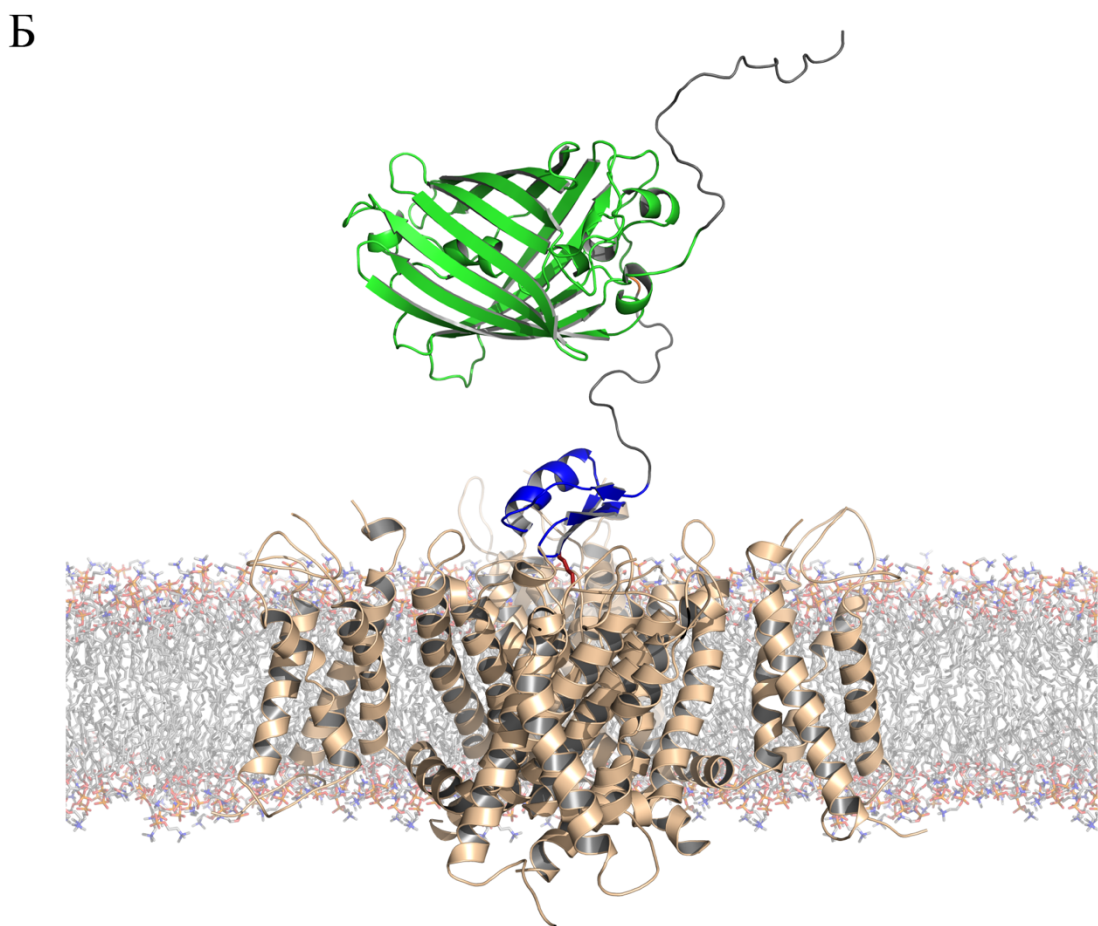
Мы также использовали упоминавшуюся систему на основе химерных каналов KcsA-K_v. Обе химеры FP-Tx были способны связываться со сферопластами *E. coli*, содержащими химерные каналы, и ярко флуоресцировать (рисунок 21В). Связывание было специфичным и обратимым; FP-Tx вытеснялись из комплексов поровыми блокаторами K_v, включая OSK1, AgTx-2 и тетраэтиламмоний, но не сциллатоксином, блокатором кальций-активируемых K⁺ каналов, или 4-аминопиридином, который связывается с внутренней полостью K_v.

Рисунок 21. Структура и использование eGFP-OSK1. (А) Аминокислотная последовательность химерного белка. Участки раскрашены: eGFP зеленым, OSK1 синим, остаток глутамата для разделения модулей оранжевым, ключевой остаток лизина — красным. His-таг выделен курсивом. (Б) Молекулярная модель комплекса K_v и eGFP-OSK1. Раскраска аналогично панели (А). Модель построена по сходству с известными структурами. (В) Слева типичное конфокальное флуоресцентное изображение сферопластов, содержащих KcsA- $K_v1.3$, окрашенных eGFP-OSK1 (20 нМ). Масштабная линейка, 4 мкм. На остальных фотографиях: окрашивание клеток Neuro-2a с помощью eGFP- α -CbTx (500 нМ), интактного eGFP и при предварительной инкубации с α -CbTx (15 мкМ). Масштабная линейка, 50 мкм.

А

MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMMVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSG
 EGEGLDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTYGVCFSRYPDHMKQHDFF
 KSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNIL
 GHKLEYNNSHNVIYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGD
 GPVLLPDNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITLGMDELYEGGGGS
 GGGGSGGGGS

GVIIINVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK



На следующем этапе мы решили продемонстрировать возможность получения FP-Tx, у которых модулем Tx служит токсин какого-либо другого типа. Наш выбор пал на трехпетельные токсины из яда змей (3FTx). Мы выбрали хорошо изученный α -CbTx (UniProt ID: P01391) из моноклевой кобры *Naja kaouthia*. Мы оценили аффинность eGFP- α -CbTx к nAChR мышечного типа из электрического органа *Tetronarce californica* и нейрональному $\alpha 7$ nAChR человека, экспрессируемому в клетках GH₄C₁, а также к ацетилхолинсвязывающему белку (AChBP) из *Lymnaea stagnalis*, гомологу лиганд-связывающего домена nAChR. Эксперименты выполняли путем измерения способности eGFP- α -CbTx конкурировать с ¹²⁵I- α -BgTx в радиолигандном анализе. Модификация α -CbTx с помощью eGFP привела к снижению сродства ко всем трем мишеням (в 10–300 раз).

Для демонстрации применимости химеры eGFP- α -CbTx в качестве молекулярного инструмента мы использовали клетки Neuro-2a, экспрессирующие $\alpha 7$ nAChR человека, и препарат языка крысы, содержащий мышечные волокна с концевыми пластинками, где имеется мышечный $\alpha 1\beta 1\epsilon\delta$ nAChR. С помощью флуоресцентной микроскопии мы наблюдали яркое специфическое окрашивание клеток Neuro-2a и срезов языка при инкубации с eGFP- α -CbTx. Это окрашивание устранялось предварительной инкубацией с избытком α -CbTx, а eGFP сам по себе не окрашивал препараты, что подтверждает специфичность связывания химеры с nAChR (рисунок 21B).

Мы ожидаем разработки богатого ассортимента FP-Tx различных цветов и с различной селективностью. Результаты, касающиеся слитных конструкторов FP-Tx, опубликованы (№№ 37, 63, 76, 77).

3.11. Мембрано-активные токсины из яда пауков

Мы изучили состав яда паука-муравьеда *Lachesana tarabaei* (NCBI/UniProt taxon identifier: 379576; семейство Zodariidae) и паука-«рыси» *Oxyopes takobius* (666126; Oxyopidae), которые оказались особенно богаты разнообразными мембрано-активными или антимикробными пептидами (АМП; составляют ~30% сухого яда *O. takobius*, а у *L. tarabaei* их содержание достигает рекордных 80%). На рисунке 22 показано разделение яда *O. takobius*, несколько (суб)фракций содержали АМП; аминокислотные последовательности приведены в таблице 8. При анализе транскриптома мы обнаружили последовательности предшественников токсинов с мотивом IСК, а также АМП, обычно не содержащих остатков цистеина. Сравнительно короткие АМП называли оксиопининами (Oxt) и объединили в 10 семейств, представители только двух (Oxt 1 и 2) были известны ранее.

Все найденные предшественники ноттинов — препропептиды стандартной организации с мотивом процессинга PQM. Бóльший интерес представляют предшественники АМП (рисунок 23). К примеру, предшественники Oxt 2a–h оказались и обычными («простыми»), и «двойными», и более сложными. Из одного белка-предшественника (двойного; GenBank ID: MH890691) образуются Oxt 2a и 2b, из другого («сложного»; MW718832) — Oxt 2a и 2c, из третьего (тоже сложного; MW718833) — Oxt 2a и 2d. Один зрелый пептид может образовываться из разных предшественников и занимать в их составе разное положение. Вероятно, генное семейство Oxt 2 эволюционирует с перетасовкой экзонов.

Предшественник Oxt 3 (MH890690) тоже сложного строения; он содержит все три зрелых Oxt 3a–с, разделенных короткими линкерами (7 а.о.), которые представляются максимально сближенными мотивами процессинга RQM и iRQM.

Мы получили Oxt 3b и 4a твердофазным пептидным синтезом (с последующим окислением остатков цистеина у Oxt 4a). Пептиды испытали на антимикробную активность против грамположительных (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных бактерий (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*) и цитолитическую активность по отношению к эритроцитам человека. Oxt проявляют сильную активность широкого спектра действия (таблица 9); значения минимальных ингибирующих концентраций (МИК) Oxt 4a сравнимы с таковыми для мелиттина из медоносной пчелы или латарцина (Ltc) 2a из яда *L. tarabaei*, двух хорошо изученных цитолитических пептидов.

Рисунок 22. Разделение яда *O. takobius*. (А) Гель-фильтрация 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 C₄ (3,9×150 мм; Waters). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Цифрами отмечены субфракции, содержащие оксиопнины. (В, Г) Повторная хроматография субфракций 4 (В) и “2 и 3” (Г) из (Б) на колонке Jupiter C₅ (2×150 мм; Phenomenex). Цифрами с буквами отмечены субфракции, содержащие оксиопнины. На панели (В) также отмечены субфракции, содержащие спайдерины.

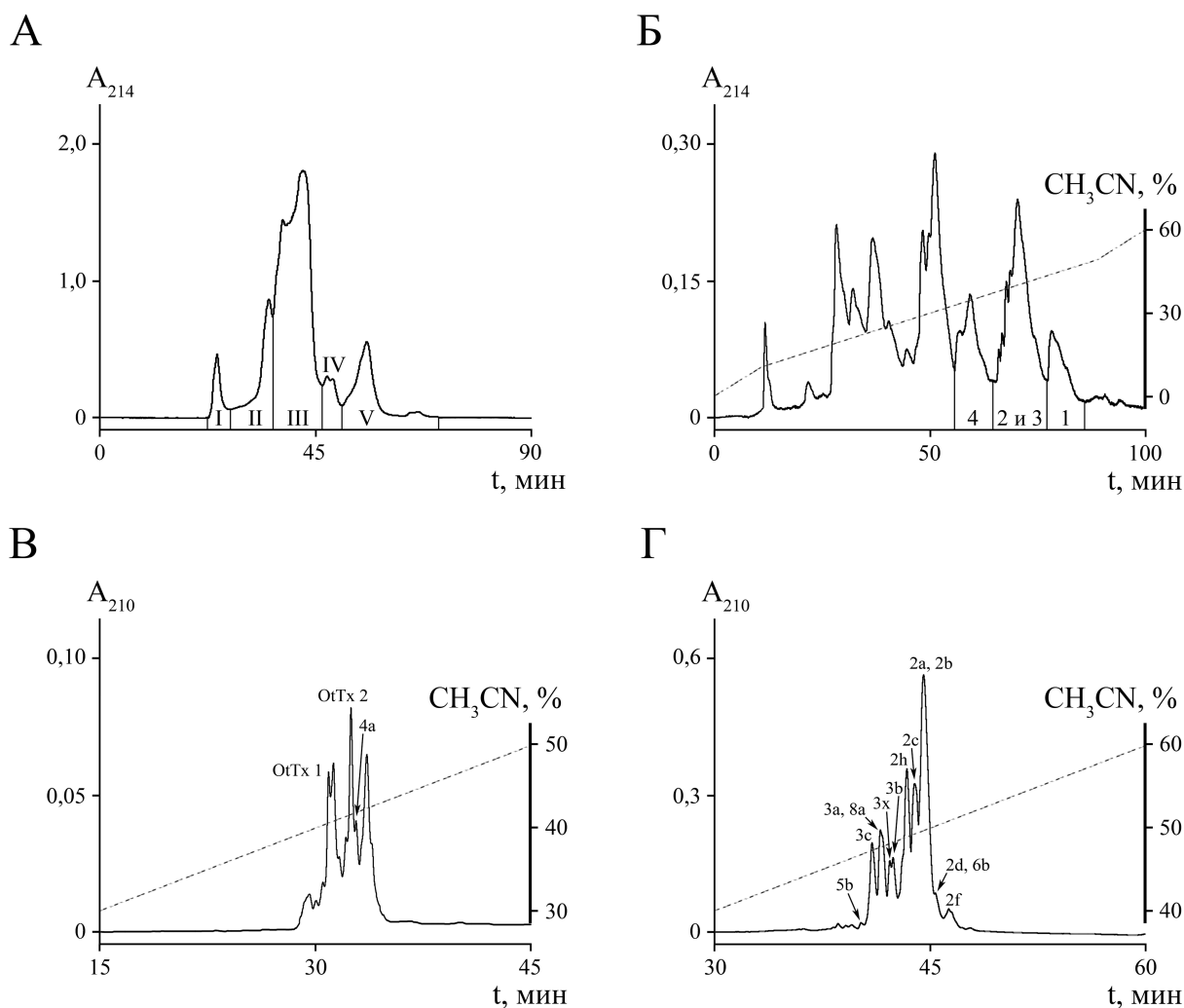


Таблица 8. Аминокислотные последовательности мембрано-активных полипептидов из яда *O. takobius*.

Название	GenBank / UniProt ID	Последовательность
Оксиопинины		
Oxt 1a	P83247	FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKALAKSMADENAIRQQNQ
Oxt 1b	C0HLF5	FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKALAKSLADENAIRQQNQ
Oxt 1c	C0HLF6	FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKILPKAAKAGKSLAKSLADENAIRQQNQ
Oxt 1d		FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKSLAKSLADENAIRQQNQ
Oxt 1e		FRGLAKLLKIGLKSFARVLKKVLPKAAKAGKALAKSMADENAIRQQN-
Oxt 1f		FRGLAKLLKIALKSLARVITQKFLPKAAKAGKALVKSLADENAIKQQDQ
Oxt 1g		FRGLAKLLKIALKSLARLVQKFLPKAAKAGKALVKSLADENAIKQQDQ
Oxt 2a	P83248	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDL DKNQ
Oxt 2b	P83249	GKFSGFAKILKSLAKFFKGVGKVRKQFKEASDL DKNQ
Oxt 2c	P83250	GKLSGISKVLRAIAKFFKGVGKARKQFKEASDL DKNQ
Oxt 2d	P83251	GKFSVFSKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDL DKNQ
Oxt 2e	MW718838	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKEASDL DKNQ
Oxt 2f	MW718837	GKFSIFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDL DKNQ
Oxt 2g	MW718836	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKTASDL DRNQ
Oxt 2h	MW718834	GKFSGFAKVLRSIAKFFKGVGKVRKQFKEASDL DKNQ
Oxt 2i	MW718840	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKKASDL DKNQ
Oxt 2j	MW718835	GKFSVFGKILKSLAKFFKGVGKVRKQFKEASDL DKNQ
Oxt 2k	MW718840	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVGKVRKQFKEAKDMDKNQ
Oxt 2l	MW718841	GKFSVFGKILRSIAKVFKGVKVRKQFKEAKDL DKNQ
Oxt 2m	MW718839	GKLSGISKVLRAIAKFFKGVGKVRKQFKEAKDL DKNQ
Oxt 3a	C0HLF9	G-IKDYLKKLLQKAINKIKSLRKKQDA
Oxt 3b	C0HLG0	G-VKDYFKKLLQKVINKIKSFRKKQEA
Oxt 3c	C0HLG1	G-MKDYFKKLLQKVIKKIKSFRKKQD-
Oxt 3x	MW718844	GKFGSVFKKLLKTVIRRLKAYKKSQS-
Oxt 4a	F8J4S0	GIRCPKSWKCKAFKQRVLRLLAMLRQHAF
Oxt 4b	MW679716	RIRCPKSWKCKAFKQRVLRLLAMLRQHAF
Oxt 4c	MW679717	GIRCPKSWKCKAFKQSVLRLLAMLRQHAF
Oxt 5a	MW718842	-ESSHYFKKLLKKIRGMLDRFYQSAA-NH ₂
Oxt 5b	MW718844	GSRSHFLKKLLKRIRLMLNKYGRRH-NH ₂

Название	GenBank / UniProt ID	Последовательность
Oxt 6a-1	MW718842	KFSFKKFLKKLRKRIMKSFRKM-NH ₂
Oxt 6a-2	MW718843	KFSFKKFLKKLRKRIMKSFRKI-NH ₂
Oxt 6b	MW718844	KFSFKKLLKKIKNKIMKTFRSM-NH ₂
Oxt 7a-1	MW718842	KVNQGFQAKFLQQMKDKLKRVT-NH ₂
Oxt 7a-2	MW718843	KVNEGFQAKFLQQMKDKLKRVT-NH ₂
Oxt 7b	MW718843	----KISPFLQQAQDKLKRVA-NH ₂
Oxt 8a	MW718844	-RKMTLKRFLKAVKQLLQSRGL-NH ₂
Oxt 9a	MW679718	FRRWPRGPRIKNWTARYHWIGGIPRPWRNKFKAVKKHHN
Oxt 10a	MW679719	FWGLHKIRSHRRWPIGIITVYKPRRLKYLRKKHY
Oxt 10b	MW679720	FWGLHKIRSHRRWPIGVVHHYKPRRLKDYRRKHH
Спайдерины		
OtTx 1a	P86716	KFK-----WGKLFSTAKKLYKKGKLSKNKNFKKALKFGKQLAKNLQAGEEHEPGTPVGNNKCWAIGTTCSDDCDCCPEHHCHCPAGKWLPGLFRCCTCQVTESDKVNCPPAE
OtTx 1b	P86717	KFK-----WGKLFSAKKKLYKKGKLSKNKNFKKALKFGKQLAKNLQAGEEHEPGTPVGNNKCWAIGTTCSDDCDCCPEHHCHCPAGKWLPGLFRCCTCQVTESDKVNCPPAE
OtTx 2a	P86718	KFKLPKINWGKLASKAKDVYKKGQKLAKNKNVKKALKYQKQLAENLAAGEVHEPGTPVGNNKCWAIGTRCTDDCDCCPEHHCHCPAKSWTFGLIPCSCTQVTESDKVNCPPAE
OtTx 2b	P86719	KFKLPKINWGKLASKAKDVYKKGQKLAKNKNVKKALKYQKQLAENLAAGEVHEPGTPVGNNKCWAIGTRCTDDCDCCPEHHCHCPAKSWTFGLIPCSCTQVTESDKVNCPPAE

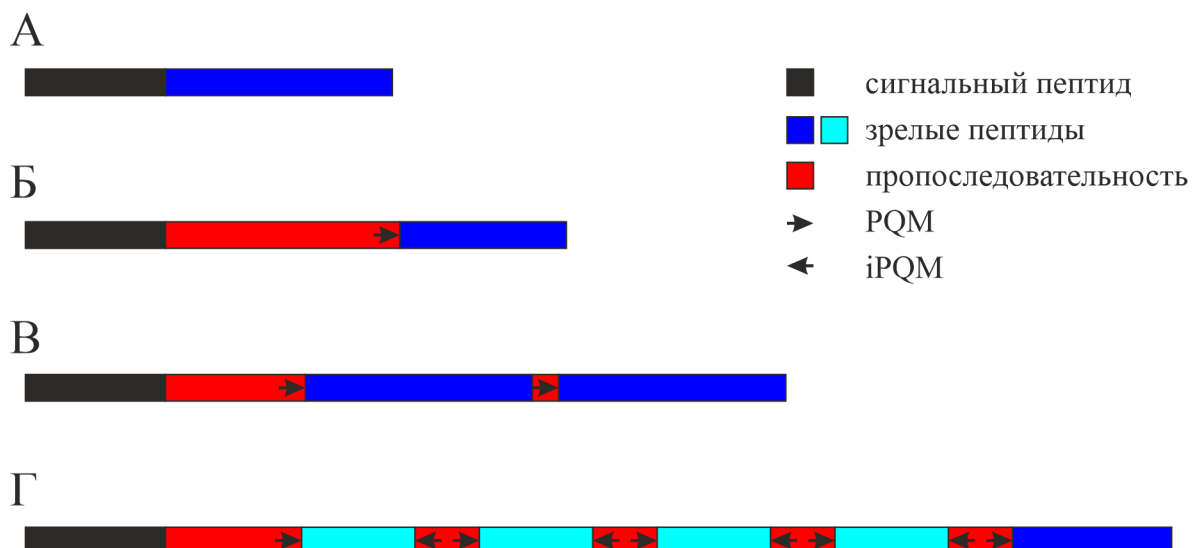
А.о., отличающиеся у полипептидов из одного и того же семейства, отмечены затемнением. Для удобства сравнения в последовательности внесены разрывы и/или добавлены прочерки. Остатки цистеина выделены желтым фоном.

Таблица 9. 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
<i>B. subtilis</i> BKM B-501		0,25–0,5	0,12–0,25	0,12–0,25	>25
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	5–10			5–10	
<i>S. aureus</i> ATCC 29213/209-P	>20 (ATCC 29213)	5–10 (209-P)		0,6–1,25 (209-P)	
<i>E. coli</i> 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)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853/PAO1	>20		6–12 (PAO1)	0,37–0,75 (PAO1)	>25 (PAO1)
<i>P. fluorescens</i> BKM B-894		0,5–1			

Результаты представлены в виде интервала (А–В), где А — наибольшая концентрация исследуемого соединения, при которой наблюдали рост бактерий, а В — наименьшая концентрация, при которой рост не наблюдали (МИК). n = 3.

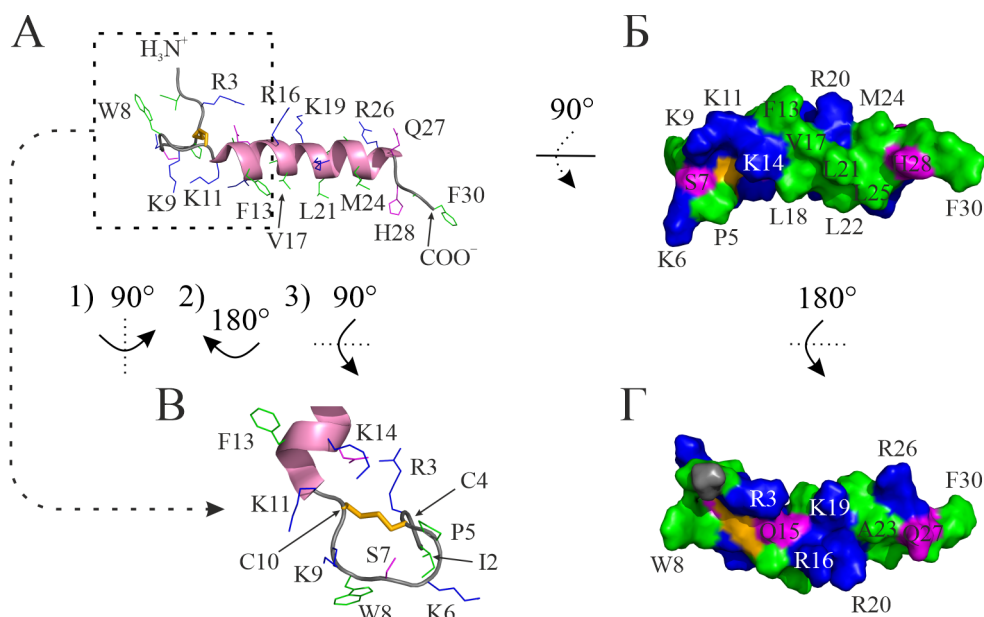
Рисунок 23. Строение белков-предшественников токсинов паукообразных. Аминокислотная последовательность условно представлена прямоугольником. Составные элементы: сигнальный пептид, пропоследовательность и зрелые цепи — показаны прямоугольниками различных цветов. Мотивы RQM и iRQM обозначены стрелками. (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.



Oxt 4a может рассматриваться как состоящий из двух сегментов: N-концевой дисульфид-содержащей части (с петлей из 7 а.о., стабилизированной S-S-мостиком) и более протяженного линейного фрагмента, который формирует амфифильную α -спираль при связывании с мембранами или в мембрано-подобной среде [например, в суспензии мицелл детергентов, таких как додецилфосфохолин (ДФХ); PDB ID: 2L3I; рисунок 24]. Любопытно, что Oxt 4a демонстрирует структурное сходство с некоторыми защитными пептидами из кожи лягушек семейства Ranidae. У них тоже петля из 7 а.о. с одной дисульфидной связью — эта структура получила название «Rana-бокс»; различие заключается в том, что у пептидов лягушек она расположена в С-концевой области.

Среди кандидатов в новые противомикробные агенты часто называют АМП. В сотрудничестве с лабораторией В.Н. Лазарева (ФНКЦ физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА) мы предложили оригинальный подход. Внутриклеточные паразитарные бактерии родов *Mycoplasma* и *Chlamydia* вызывают инфекционные заболевания, которые в различной степени поддаются лечению антибиотиками. Генная терапия, по-видимому, может заменить прямое применение АМП. Векторные конструкции, содержащие гены АМП из яда пауков под контролем тетрациклин-зависимого промотора, тестировали на способность подавлять хламидийную инфекцию в клеточной линии НЕК293. Включения хламидий выявляли с помощью меченных флуоресцеином антител к белковому антигену внешней мембраны *Chlamydia trachomatis*. Ген *cit 1a*, кодирующий CIT 1a из яда *L. tarabaei* (UniProt ID: P85253), продемонстрировал особенно выраженный ингибирующий эффект ($\approx 85\%$).

Рисунок 24. Пространственная структура Oxt 4a. Использовали суспензию мицелл ДФХ (PDB ID: 2L3I). (А) Ленточное представление, окраска основной цепи и S-S-мостика как на рисунке 12. Боковые радикалы показаны линиями и окрашены по свойствам а.о. как в таблице 4 (Б, Г) Показана молекулярная поверхность пептида, раскрашенная в соответствии со свойствами а.о. (В) Увеличенный фрагмент структуры с дисульфидной связью.



Результаты исследования АМП из яда пауков опубликованы (№№ 4, 12, 13, 17, 19, 21, 33, 36, 78).

3.12. Модульные токсины из яда паукообразных

Ранее мы впервые описали двудоменные (модульные) токсины пауков — цитоинсектотоксины (CIT) из яда *L. tarabaevi* (кандидатская диссертация А.А. Василевского). В рамках теперешней работы мы нашли примеры всех возможных комбинаций дисульфид-богатого (ICK) и линейного (АМП) доменов (модулей; таблица 10). В некоторых случаях модульные токсины — это мажорные компоненты яда: CIT и латартоксины (LtTx) у *L. tarabaevi*, PT2 у *A. marikovskiyi*. А на рисунке 25 показано разделение яда желтосумного колющего паука *Cheiracanthium punctorium* (NCBI/UniProt taxon identifier: 682790; семейство Eutichuridae); двудоменные токсины CrTx 1–4 составляют не менее 1/3 общего белка. Аминокислотные последовательности двудоменных токсинов мы устанавливали комбинацией методов секвенирования по Эдману, селективного протеолиза и МС/МС и подтверждали секвенированием кДНК из ядовитых желез; они представлены на рисунке 26 с указанием модулей. В качестве примера на рисунке 2 показана схема установления последовательности LtTx 2a.

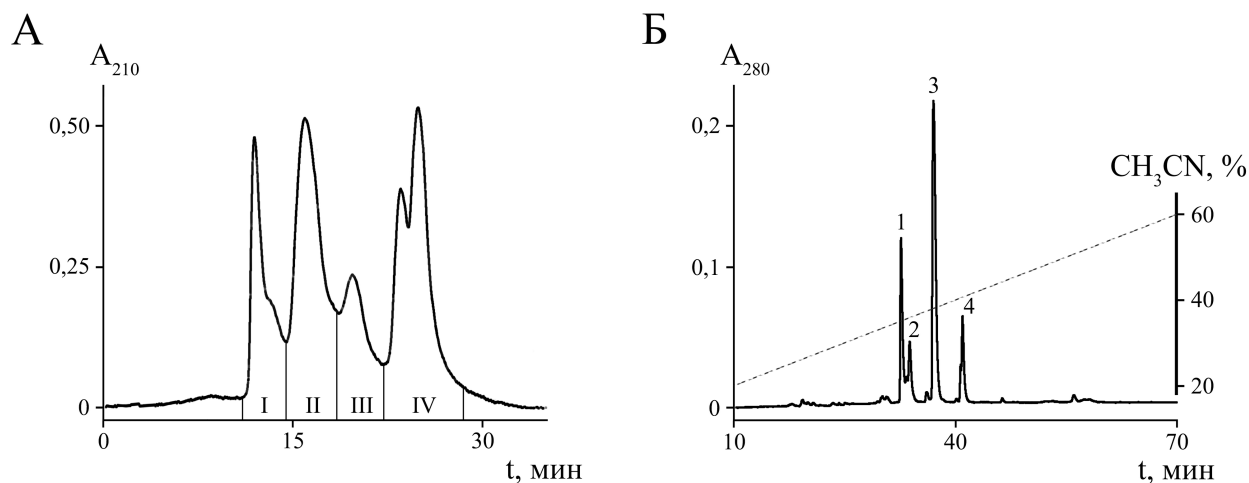
Общим свойством всех охарактеризованных нами двудоменных токсинов служит их мембранная активность, правда выраженная в разной степени. CIT, латартоксины (LtTx), CrTx и спайдерены (OtTx; названы так по аналогии со скорпинами) проявляют также инсектицидные свойства; а для CIT, CrTx и OtTx обнаружена еще и цитолитическая и/или антимикробная активность. Используя твердофазный пептидный синтез и бактериальную систему экспрессии, мы получили как полноразмерные токсины, так и их отдельные модули.

Таблица 10. Разнообразие двудоменных токсинов паукообразных.

Тип	Токсины	Источник
АМП-АМП	Цитоинсектотоксины (CIT)*	<i>Lachesana tarabaei</i>
АМП-CSα/β	β-КТх (включая скорпионы)	<i>Tityus serrulatus</i> , <i>Pandinus imperator</i> и другие скорпионы
АМП-ICK	Спайдерины (OtTx)*	<i>Oxyopes takobius</i>
ICK-АМП	Латартоксины (LtTx)*	<i>Lachesana tarabaei</i>
	Пуротоксин-2 (PT2)*	<i>Alopecosa marikovskiyi</i>
	CSTX-1	<i>Cupiennius salei</i>
CSα/β-CSα/β	LVP1	<i>Buthus occitanus tunetanus</i>
ICK-ICK	CpTx*	<i>Cheiracanthium punctatorium</i>
	DkTx ("double-knot" toxin)	<i>Cyriopagopus schmidtii</i>
	Hila	<i>Hadronyche infensa</i>

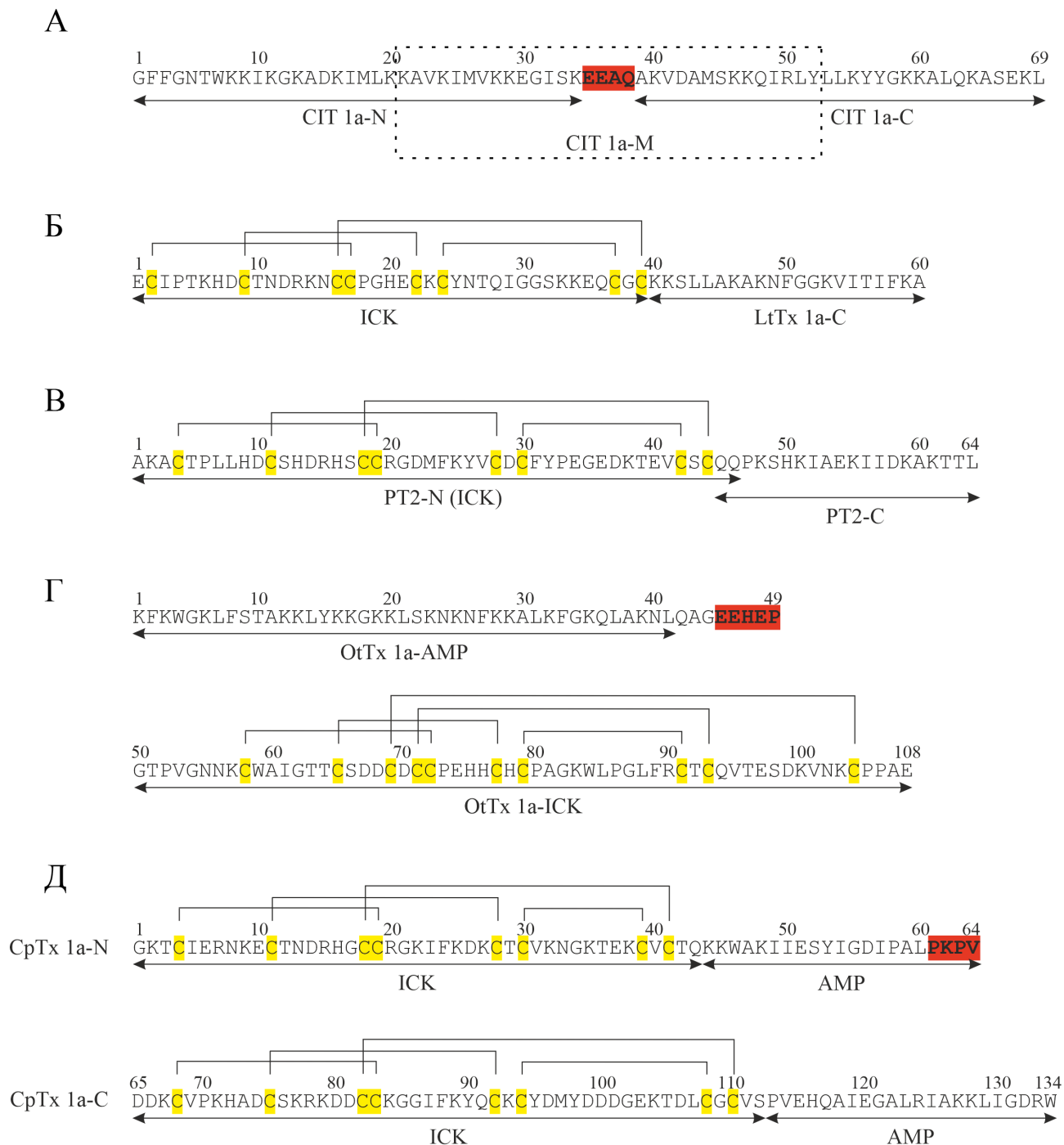
*Примеры, охарактеризованные нами.

Рисунок 25. Разделение яда *Ch. punctatorium*. (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 Jupiter C₅ (4,6×150 мм). Градиент концентрации ацетонитрила показан пунктиром. Субфракции обозначены цифрами.



Интересно, что в случае CIT 1 и 2 два модуля соединены коротким линкером, напоминающим RQM, в котором ключевой аргинин оказался заменен. Мы предположили, что CIT эволюционировали из двойных предшественников коротких цитотоксинов в результате мутации сайта процессинга. Мы получили три производных CIT 1a, которые соответствуют N-концевому (CIT 1a-N) и C-концевому модулю (CIT 1a-C), а также средней части CIT 1a (CIT 1a-M), в которую был включен линкер (рисунок 26А). Значения МИК для CIT 1a-N оказались ниже, чем для CIT 1a-C, а МИК полноразмерного CIT 1a ниже, чем МИК обоих

Рисунок 26. Аминокислотные последовательности модульных токсинов пауков. (А) СІТ 1а и его фрагменты. Модули указаны стрелками снизу, СІТ 1а-М выделен прямоугольником. Мотив, напоминающий RQM, отмечен красным. (Б) LtTx 1а и его фрагмент LtTx 1а-С. Остатки цистина выделены желтым, сверху показано предполагаемое расположение дисульфидных мостиков. (В) РТ2 и его фрагменты РТ2-Н и РТ2-С. Расположение дисульфидных мостиков установлено экспериментально. (Г) OtTx 1а и его фрагменты OtTx 1а-АМР и OtTx 1а-ІСК. (Д) СрТх 1а и его домены СрТх 1а-Н и СрТх 1а-С, состоящие из ІСК и АМР фрагментов. Мотив, при сдвиге рамки считывания напоминающий RQM, отмечен красным.



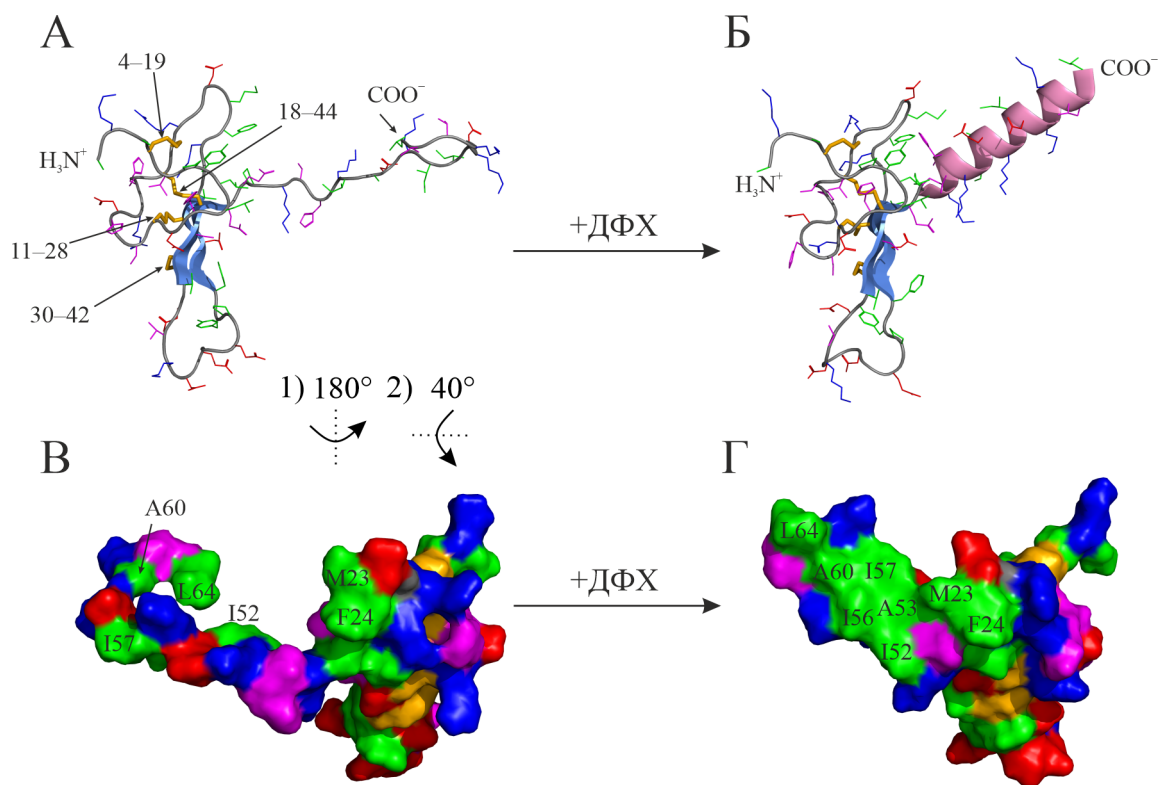
производных и их смеси. В инсектицидных тестах на дрозофиле оба модуля показали довольно низкую активность по сравнению с полноразмерным СІТ 1а. Разделенные модули ведут себя аналогично «обычным» коротким α -спиральным

АМП, а СІТ 1а-М оказался неактивен в обоих тестах. Таким образом, механизм действия СІТ 1а основан на синергизме между двумя ковалентно связанными модулями.

Синтетический пептид LtTx 1а-С (С-концевой модуль LtTx 1а; рисунок 26Б), активен на грамположительных бактериях (МИК $\approx$ 3–6 мкМ), а полноразмерный токсин LtTx 1а не проявлял антимикробной активности. Мембранную активность полноразмерного РТ2 и его модулей РТ2-Н и РТ2-С (рисунок 26В) мы исследовали, используя КД и ЯМР. Только РТ2-С способен связываться с мембранами. Таким образом, С-концевой модуль токсинов типа ІСК-АМП отвечает за их мембранную активность. Примечательно, что OtTx 1а-АМП (N-концевой модуль OtTx 1а; рисунок 26Г), сохранил активность полноразмерного токсина (таблица 9); он оказался неселективным цитолитическим пептидом, одним из наиболее эффективных из всех известных. OtTx 1а-ІСК, напротив, оказался неактивным; вернее сказать, в настоящее время мы не знаем его природную мишень.

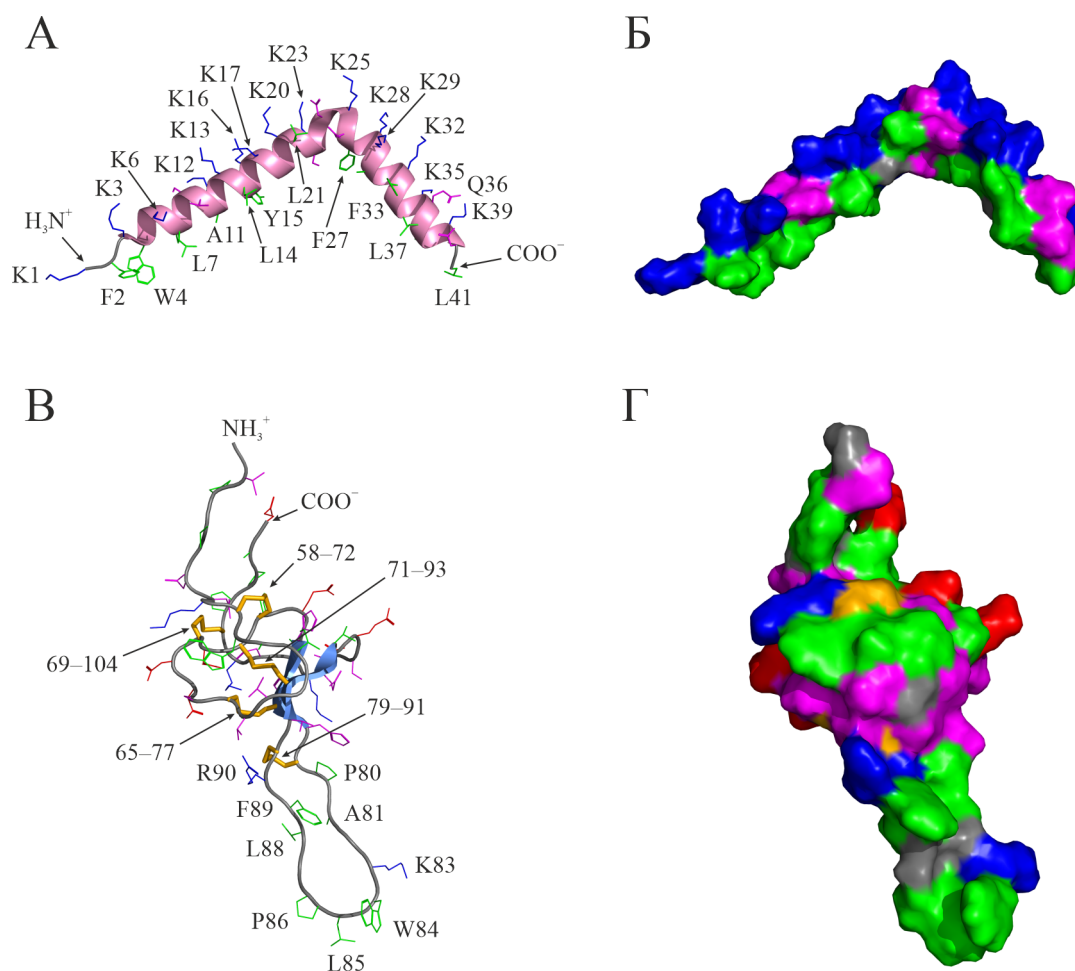
Мы исследовали пространственную структуру токсина РТ2 (тип ІСК-АМП; PDB IDs: 2MZF, 2MZG; рисунок 27) и модулей токсина OtTx 1а (тип АМП-ІСК; 2N85, 2N86; рисунок 28) — в водном растворе и в суспензии мицелл ДФХ. Структура РТ2-Н представляет собой классическую укладку ІСК со сравнительно длинной петлей β -шпильки. РТ2-С в воде не упорядочен, но сворачивается в амфифильную α -спираль при добавлении ДФХ (рисунок 27).

Рисунок 27. Пространственная структура РТ2. (А, В) Структура в воде (PDB ID: 2MZF) и (Б, Г) суспензии мицелл ДФХ (2MZG). (А, Б) Ленточное представление, окраска и обозначения как на рисунке 24; указаны дисульфидные мостики. (В, Г) Молекулярная поверхность полипептида раскрашена в соответствии со свойствами а.о. как в таблице 4.



Структуру полноразмерного токсина OtTx 1a не удалось разрешить ввиду сильного перекрытия сигналов в спектрах ЯМР. OtTx 1a-AMP не упорядочен в воде, но в мицеллах ДФХ (PDB ID: 2N85) он приобретает α -спиральную конформацию и содержит два амфифильных α -спиральных сегмента, соединенные коротким линкером (рисунок 28А, Б). Структурный мотив спираль-шарнир-спираль довольно широко распространен среди цитотоксинов; OtTx 1a-AMP выделяется благодаря своей исключительной длине. OtTx 1a-ICK (2N86; рисунок 28В, Г) представляет собой ноттин; он стабилизирован пятью S-S-мостиками (первый пример структуры такого типа среди ICK-токсинов). Дисульфиды C¹–C⁵, C²–C⁶ и C⁴–C⁹ формируют мотив ICK, тогда как C⁷–C⁸ стабилизирует необычайно протяженную петлю β -шпильки и является частью мотива ESM. Наконец, C³–C¹⁰ скрепляет длинную C-концевую область пептида с его ядром.

Рисунок 28. 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, окраска и обозначения как на рисунке 24. Для OtTx 1a-ICK указаны дисульфидные мостики; подписаны а.о. длинной петли β -шпильки. (Б, Г) Показана молекулярная поверхность полипептидов, раскрашенная в соответствии со свойствами а.о. как в таблице 4.



Выше говорилось о мутации в мотиве процессинга как возможном механизме возникновения СІТ — из «двойных» предшественников. Похожую ситуацию мы наблюдаем для OtTx. А у CrTx 1 последовательности, непосредственно

предшествующие второму домену, при сдвиге рамки в кодирующей последовательности ДНК превращаются в типичный PQM (см. рисунок 26Д). Мы предполагаем, что в случае С1Т и СрТх различные мутации, а именно: замены или делеции / вставки — обеспечили слияние двух зрелых цепей двойных предшественников в единый модульный токсин с двумя доменами.

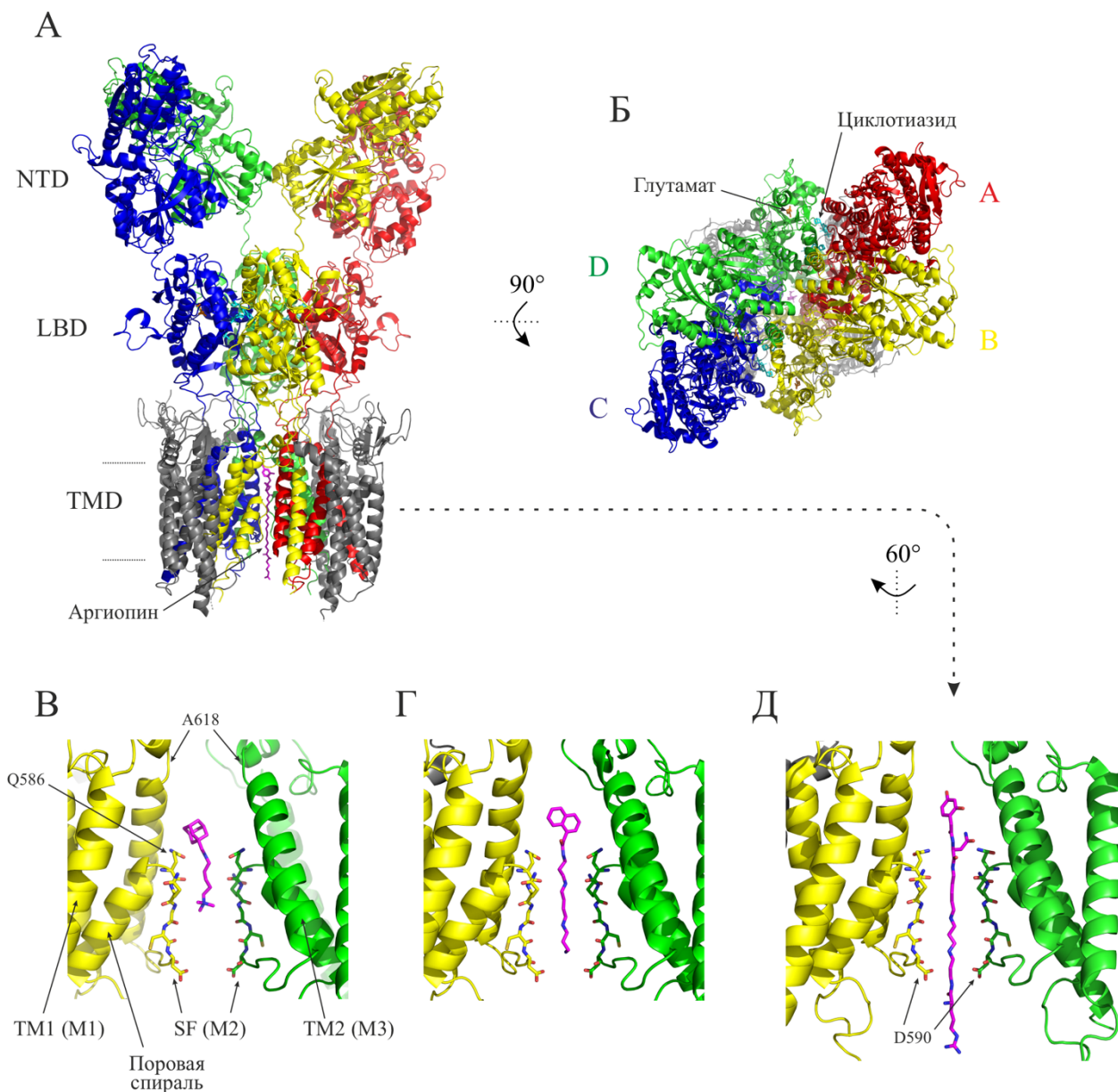
Сравнение кДНК и геномных последовательностей, кодирующих спайдерина у паука *Oxyopes lineatus* (О1Тх; например, ср. GenBank IDs: KF766552 и KF766558) и СрТх у *Ch. punctatorium* (например, ср. KF155275 и KF255416) показало, что гены *oltx* и *cptx* не содержат интронов. Ранее полагали, что это свойственно генам пептидных токсинов пауков, но недавние успехи в секвенировании геномов ставят под сомнение их всеобщую безынтронность. N-Концевой домен О1Тх (О1Тх-АМР) уникален, его последовательность не обнаруживает сходства с другими белками; напротив, С-концевой домен (О1Тх-ІСК) очень похож на однодоменные токсины ОхуТх 1 и 2 из яда того же паука. Вероятно, произошла вставка фрагмента ДНК, кодирующего линейный домен, в ген однодоменного ІСК-токсина между частями, кодирующими препропоследовательность и зрелую цепь. Представляется возможным возникновение последовательности N-концевого домена *de novo*, ведь такой сценарий довольно широко распространен. Другой вариант — происхождение N-концевого домена из интрона.

Наиболее очевидным возможным сценарием возникновения двудоменного токсина типа ІСК-ІСК выступает дупликация предкового гена, кодирующего однодоменный токсин. В случае СрТх такой сценарий маловероятен, потому что их N-концевые и С-концевые домены демонстрируют лишь умеренное сходство ($\approx 15\text{--}25\%$ идентичных а.о.). Альтернативной гипотезой служит слияние двух генов однодоменных токсинов. Отсутствие интронов в генах *cptx* ставит под сомнение сценарий их возникновения в результате перетасовки интронов. Более вероятным представляется процесс, аналогичный 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. Другая возможность — неаллельная гомологичная рекомбинация во время мейоза из-за неправильного позиционирования гомологичных хромосом.

Возникновение модульных токсинов в эволюции совпадает с общим вектором «от простого к сложному». Мы не наблюдали в составе яда паукообразных токсинов с тремя или более доменами, однако полагаем, что такие структуры будут обнаружены. В этой связи следует оговориться, что DkТх и СрТх, отнесенные нами в группу ІСК-ІСК, существенно различаются: если у DkТх (75 а.о.) типичные ІСК-модули содержат $\approx 30\text{--}35$ а.о. и разделены коротким линкером, то модули СрТх значительно больше (у СрТх 1, например, при общей длине 134 а.о. модули содержат ≈ 65 а.о.; рисунок 26Д) и при этом сами могут быть представлены формулой ІСК-АМП, т.е. несут протяженные линейные С-концевые участки, напоминающие АМП. Таким образом, СрТх, вообще говоря, можно отнести к токсинам с четырьмя модулями по формуле ІСК-АМП-ІСК-АМП.

Результаты исследований модульных токсинов из яда пауков опубликованы (№№ 8, 18, 20, 25, 27, 29, 36, 38, 39).

Рисунок 30. 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 А–D. (Б–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 стержнями. Блокаторы представлены малиновыми стержневыми моделями.



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 аргипином, NASPM и IEM-1460 заключается в длине полиаминного хвоста и числе аминогрупп (см. формулы на рисунке 29). Это сказывается на глубине проникновения блокатора в селективный фильтр рецептора: если IEM-1460 едва дотягивается до его середины (рисунок 30В), то NASPM погружается практически на всю длину (рисунок 30Г), а аргипин и вовсе пронизывает фильтр насквозь, и его концевой а.о. высвобождается в цитоплазму (рисунок 30Д). Аминогруппы блокаторов, по-видимому, взаимодействуют с селективным фильтром сродни проходящим катионам. Образно говоря, полиамины — это цепочка катионов, нанизанных на нитку. Чем длиннее 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 ($IC_{50} \approx 1$ мкМ), поскольку имеет только две аминогруппы, закрепленные в поре. NASPM, обладающий промежуточной аффинностью ($IC_{50} \approx 100$ нМ), содержит три аминогруппы и амидную связь. У аргипина, блокатора с высокой аффинностью ($IC_{50} \approx 10$ нМ), самый длинный хвост.

3.13.2. Получение светопереключаемых блокаторов GluR

Изучив структуру комплекса аргипина и других поровых блокаторов с GluR, мы решили создать на их основе фотопереключател, селективно действующий на Ca^{2+} -проницаемые АМРА-рецепторы. Эти работы мы выполняли в сотрудничестве с лабораторией биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН.

Соединение ABSP-1 — простейший азобензольный аналог NASPM (вместо нафтилацетильной группы здесь глицилазобензол, а хвост так же представлен спермином; рисунок 29). Акроним ABSP мы выбрали как английское сокращение «азобензол-спермина». Действие ABSP-1 в отношении нативных Ca^{2+} -непроницаемых АМРА-рецепторов и NMDA-рецепторов изучали на изолированных пирамидных нейронах гиппокампа, а по отношению к Ca^{2+} -проницаемым АМРА-рецепторам — на гигантских холинергических интернейронах полосатого тела. После установления блока включали и выключали монохроматический свет (410 нм) для регистрации фотоиндуцированных эффектов. Наиболее выраженным оказалось действие на Ca^{2+} -проницаемые АМРА-рецепторы: в концентрации 1 мкМ ABSP-1 вызывал сильное ингибирование (на $79 \pm 7\%$), а освещение при 410 нм значительно уменьшало этот эффект.

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. Среди новых соединений оптимальные характеристики продемонстрировал ABSP-6 (см. структурную формулу на рисунке 29). Он сильно ингибировал нативные Ca^{2+} -проницаемые АМРА-рецепторы ($IC_{50} = 28 \pm 5$ нМ при -70 мВ) с выраженным эффектом фотопереключения

($IC_{50} = 2,4 \pm 0,7$ мкМ при освещении) и слабо влиял на Ca^{2+} -непроницаемые АМРА-рецепторы и NMDA-рецепторы ($IC_{50} > 20$ мкМ). Светочувствительность действия ABSP-6 может быть дополнительно увеличена за счет использования диодного лазера: значение IC_{50} в отношении нативных рецепторов увеличивалось до 10 ± 2 мкМ.

Данные молекулярного моделирования указывают на то, что в *транс*-конфигурации ABSP-6 связывается в поре GluR аналогично NASPM (см. рисунок 30Г). При переходе в *цис*-конфигурацию существенно изменяется структура ABSP-6: (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 аффинность блокатора к GluR существенно падает.

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, касающиеся ацилполиаминов, опубликованы (№№ 46, 71, 75).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За время выполнения этой работы 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 2009 г. в «Успехах биологической химии» (№ 5) признается вполне успешной], то 2020-е гг. это представляется решительно невозможным. Обзор литературы содержит ссылки на свыше 900 источников из порядка 10 000, находимых по ключевым словам в PubMed. Основные направления развития области раскрыты достаточно подробно, позволяя объективно сравнить наши результаты с мировым уровнем и подсказывая задачи будущих исследований.

Мы почти не занимались низкомолекулярными или белковыми компонентами, сосредоточившись на пептидах. Пептидомный анализ яда, даже похожий на наш, сопряженный с анализом транскриптома высокого качества, не уникальное мероприятие. При этом мы существенно пополнили разнообразие известных токсинов (224 записи в UniProt), а поскольку область в настоящее время всё еще на стадии «географических открытий», такой «экстенсивный» вклад важен.

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. Идеальным вектором развития нам видится создание всеобщей базы данных токсинов наподобие Guide to PHARMACOLOGY. Только нам удалось получить селективные и высокоаффинные лиганды всех четырех чувствительных к токсинам Shaker-подобных K^+ каналов ($K_v1.1$, 1.2, 1.3 и 1.6). Развитие области неминуемо связано с исследованием гетеромерных K^+ каналов, которые, по всей видимости, наиболее распространены, но плохо изучены.

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 . Мы показали, что важную роль в селективности α -NaTx играет сочетание особых белковых мотивов, таких как «гнездо» и «ниша» (предложенный нами ее особый случай «аргининовой руки») в «модуле специфичности». Мы ожидаем, что на основе α -NaTx будут получены селективные лиганды отдельных изоформ Na_v . Мы впервые показали, что токсины паукообразных, нацеленные на ионные каналы, могут служить инструментами манипуляции внутриклеточными сигнальными каскадами нейронов.

Мы выявили одновременное наличие у токсинов двух, как считалось ранее, строго раздельно проявляющихся эффекта — в отношении активации и инактивации Na_v . Предложенный нами способ обозначения такой ситуации с двумя эффектами в названии β/δ -агатоксинов — двумя греческими буквами через дробь — стал с тех пор общепринятым. Мы впервые охарактеризовали лиганд Na_v , воздействующий на ПЧД I. Наша работа по определению сайта связывания

Nm-3 предоставила модель комплекса, превосходившую по детализации все предыдущие, и опередила исследования с использованием крио-ЭМ. Мы впервые показали, как можно ингибировать « ω -токи» в мутантных Na_v , обнаруженных у пациентов с периодическим параличом. В дальнейшем важно получить соединения, активные в отношении различных мутантных каналов, и изучить их действие на трансгенных мышах, моделирующих заболевания человека.

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 лабораторий 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.

Мы охарактеризовали наибольшее число известных в настоящее время цитолитических токсинов паукообразных. Более того, современные представления о структурном разнообразии этих полипептидов основаны главным образом на наших работах. Оригинальный способ использования АМП — для борьбы с внутриклеточными паразитами — представляется интересным, но пока что практического развития он не получил.

Большая часть диссертации посвящена модульным, или двудоменным, токсинам. Нам не только принадлежит приоритет в области, но и первенство в смысле описания природного разнообразия, потому что именно мы обнаружили токсины со всеми возможными вариантами комбинации линейных и дисульфид-богатых модулей. Модульность придает токсинам свойство авидности, и дальнейшие исследования могут быть направлены на получение искусственных модульных конструкторов из ододоменных токсинов. Другая возможность состоит в создании «дивалентных» полипептидов, выполняющих сразу две функции.

Мы не только разыскивали лиганды выбранных мишеней в составе природных ядов, а применили подходы компьютерного моделирования для создания искусственных соединений с заданными свойствами. Примеры похожих работ известны, однако 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. Мы добились получения селективного и высокоаффинного лиганда $\text{K}_v1.6$, чего ранее исследователям не удавалось. Представляется очевидным, что следующий этап развития подходов компьютерного моделирования состоит в использовании нейросетевых моделей наподобие AlphaFold 3, 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 изысканиям, сделаем акцент на том, что в результате арсенал доступных исследовательских инструментов для изучения структуры и функции ионных каналов и рецепторов расширился. В таблице 11 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 — покажет время; некоторые из них продаются (био)химическими компаниями, что подчеркивает интерес специалистов в области.

Наша работа привнесла в практику новый класс инструментов визуализации ионных каналов, представленный химерными конструктами FR-Tx. Использование их в мире пока ограничено, главной проблемой большинства конструктов, на наш взгляд, служит высокая скорость диссоциации комплекса с мишенью (высокое значение k_{off}), поэтому работы стоит направить на получение химер с лигандами, которым свойственно близкое к необратимому связывание.

Другой важный пример нового исследовательского инструмента — светуправляемый 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 1986 г. Его ценность обусловлена колоссальной ролью GluR в ЦНС. Принципиальное значение имеет также демонстрация применимости ABSF в экспериментах на срезах мозга.

Некоторые из наиболее важных инструментов, полученных и изученных в рамках данной работы, представляются также кандидатами для разработки лекарственных средств (см. таблицу 11). Автору диссертации повезло, пусть прозвучит самонадеянно, приложить руку к формированию токсинологии, какой она видится сегодня и какой станет в ближайшем будущем.

Таблица 11. Разнообразие молекулярных мишеней токсинов паукообразных и искусственных соединений, изученных в рамках нашей работы.

Мишень	Токсин или искусственный пептид	Заболевания	Публикации
K _v 1.1	MeKTx13-3_RMRH	Атаксия, эпилепсия	61
K _v 1.2	MeKTx11-1, CTX M29I		47, 65
K _v 1.3	MeKTx13-3_AAAR, Tk-hefu-10	Аутоиммунные заболевания	55, 60
K _v 1.6	Tk-hefu-11	Эпилепсия	64
Na _v 1.4	Hm-3	Периодический паралич	3, 31, 44
DmNa _v 1	β/δ-Aga-1	—	2
BgNa _v 1	BeM9-13	—	62
Ca _v 2.1	ω-Lsp-IA	Атаксия, мигрень	1
GluR	Аргиопин	Инсульт, эпилепсия	46
P2X3	PT1, PT6	Болевые синдромы, кашель	6, 18, 74

ВЫВОДЫ

1. С помощью комбинации методов протеомики (пептидомики) и транскриптомики проведены детальные исследования компонентного состава яда шести видов пауков (*Alopecosa marikovskiyi*, *Agelena orientalis*, *Cheiracanthium punctatorium*, *Heriaeus melloteei*, *Lachesana tarabaei*, *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 marikovskiyi* выделен селективный модулятор кальциевых каналов Р-типа ω -Lsp-IA, замедляющий процесс их активации, который может найти применение для создания лекарств от мигрени и эпилепсии.
5. В яде паука *Alopecosa marikovskiyi* обнаружены селективные ингибиторы пуриnergических 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 Nm-1, 2 и 3. Показано, что Nm-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 tarabaei* 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 — светуправляемых 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 ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Pluzhnikov et al., 2007, *Toxicon* 50, 993-1004. doi: 10.1016/j.toxicon.2007.07.004.
2. Billen et al., 2008, *Toxicon* 52, 309-317. doi: 10.1016/j.toxicon.2008.05.018.
3. Никольский и др., 2009, *Биологич. мембраны* 26, 249-257.
4. Polyansky et al., 2009, *FEBS Lett.* 583, 2425-2428. doi: 10.1016/j.febslet.2009.06.044.
5. Василевский и др., 2009, *Успехи биологич. химии* 49, 211-274. doi [перевод в *Biochemistry (Mosc.)*]: 10.1134/s0006297909130069.
6. Grishin et al., 2010, *Ann. Neurol.* 67, 680-683. doi: 10.1002/ana.21949.
7. Billen et al., 2010, *J. Biol. Chem.* 285, 18545-18554. doi: 10.1074/jbc.M110.125211.
8. Vassilevski et al., 2010, *J. Biol. Chem.* 285, 32293-32302. doi: 10.1074/jbc.M110.104265.
9. Andreev et al., 2010, *Anal. Biochem.* 407, 144-146. doi: 10.1016/j.ab.2010.07.023.
10. Savchenko et al., 2011, *Neurophysiology* 42, 387-391. doi: 10.1007/s11062-011-9173-9.
11. Nolde et al., 2011, *J. Biol. Chem.* 286, 25145-25153. doi: 10.1074/jbc.M110.200378.
12. Lazarev et al., 2011, *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 5367-5369. doi: 10.1128/AAC.00449-11.
13. Dubovskii et al., 2011, *FEBS J.* 278, 4382-4393. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08361.x.
14. Vassilevski & Grishin, 2011, *Acta Chim. Slov.* 58, 717-723.
15. Andreev et al., 2012, *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 6, 35-45. doi: 10.2174/187221312798889266.
16. Oparin et al., 2012, *Biochem. J.* 446, 69-77. doi: 10.1042/BJ20120548.
17. Polina et al., 2012, *Probiotics Antimicrob. Proteins* 4, 208-216. doi: 10.1007/s12602-012-9108-9.
18. Kabanova et al., 2012, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1818, 2868-2875. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.07.016.
19. Polyansky et al., 2012, *Curr. Protein Pept. Sci.* 13, 644-657. doi: 10.2174/138920312804142147.
20. Kuzmenkov et al., 2013, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1828, 724-731. doi: 10.1016/j.bbamem.2012.10.014.
21. Lazarev et al., 2013, *Arch. Microbiol.* 195, 173-179. doi: 10.1007/s00203-012-0863-5.
22. Kudryashova et al., 2013, *Anal. Bioanal. Chem.* 405, 2379-2389. doi: 10.1007/s00216-012-6655-6.
23. Chugunov et al., 2013, *J. Biol. Chem.* 288, 19014-19027. doi: 10.1074/jbc.M112.431650.
24. Utkina et al., 2013, *FEBS J.* 280, 3594-3608. doi: 10.1111/febs.12349.
25. Vassilevski et al., 2013, *FEBS J.* 280, 6247-6261. doi: 10.1111/febs.12547.
26. Slavokhotova et al., 2014, *Plant Mol. Biol.* 84, 189-202. doi: 10.1007/s11103-013-0127-z.
27. Sachkova et al., 2014, *FEBS Lett.* 588, 740-745. doi: 10.1016/j.febslet.2014.01.018.
28. Berkut et al., 2014, *J. Biol. Chem.* 289, 14331-14340. doi: 10.1074/jbc.M113.530477.
29. Sachkova et al., 2014, *Insect Mol. Biol.* 23, 527-538. doi: 10.1111/imb.12097.
30. Арзамасов и др., 2014, *Биоорганич. химия* 40, 387-398. doi: 10.7868/S0132342314040010.
31. Berkut et al., 2015, *J. Biol. Chem.* 290, 492-504. doi: 10.1074/jbc.M114.595678.
32. Kuzmenkov et al., 2015, *J. Biol. Chem.* 290, 12195-12209. doi: 10.1074/jbc.M115.637611.
33. Dubovskii et al., 2015, *Cell. Mol. Life Sci.* 72, 4501-4522. doi: 10.1007/s00018-015-2016-x.
34. Кузьменков и др., 2015, *Успехи биологич. химии* 55, 289-350. doi [перевод в *Biochemistry (Mosc.)*]: 10.1134/S0006297915130118.
35. Kuzmenkov et al., 2016, *Database (Oxford)* 2016, baw056. doi: 10.1093/database/baw056.
36. Kuzmenkov et al., 2016, *Biochem. J.* 473, 2495-2506. doi: 10.1042/BCJ20160436.
37. Kuzmenkov et al., 2016, *Sci. Rep.* 6, 33314. doi: 10.1038/srep33314.
38. Oparin et al., 2016, *Biochem. J.* 473, 3113-3126. doi: 10.1042/BCJ20160573.
39. Nadezhdin et al., 2017, *Protein Sci.* 26, 611-616. doi: 10.1002/pro.3101.

40. Kuzmenkov et al., 2017, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 1865, 465-472. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.02.001.
41. Andreev-Andrievskiy et al., 2017, *Toxicon* 138, 59-67. doi: 10.1016/j.toxicon.2017.08.013.
42. Kuldyushev et al., 2017, *FEBS Lett.* 591, 3414-3420. doi: 10.1002/1873-3468.12839.
43. Kuzmenkov & Vassilevski, 2018, *Neurosci. Lett.* 679, 15-23. doi: 10.1016/j.neulet.2017.10.050.
44. Männikkö et al., 2018, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115, 4495-4500. doi: 10.1073/pnas.1720185115.
45. Kuldyushev et al., 2018, *Proteins* 86, 1117-1122. doi: 10.1002/prot.25583.
46. Twomey et al., 2018, *Neuron* 99, 956-968.e4. doi: 10.1016/j.neuron.2018.07.027.
47. Kuzmenkov et al., 2018, *Neuropharmacology* 143, 228-238. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.09.030.
48. Шенкарёв и др., 2019, *Докл. акад. наук* 484, 112-116. doi: 10.31857/S0869-56524841112-116.
49. Utkin et al., 2019, *Front. Pharmacol.* 10, 423. doi: 10.3389/fphar.2019.00423.
50. Tabakmakher et al., 2019, *Sci. Data* 6, 73. doi: 10.1038/s41597-019-0074-x.
51. Kasheverov et al., 2019, *FEBS Lett.* 593, 2779-2789. doi: 10.1002/1873-3468.13530.
52. Berkut et al., 2019, *J. Biol. Chem.* 294, 18349-18359. doi: 10.1074/jbc.RA119.010494.
53. Myshkin et al., 2019, *Front. Pharmacol.* 10, 953. doi: 10.3389/fphar.2019.00953.
54. Кузьменков и др., 2019, *Рос. физиол. жур. им. И.М. Сеченова* 105, 1452-1462. doi: 10.1134/S0869813919110074.
55. Gigolaev et al., 2020, *Front. Pharmacol.* 11, 1010. doi: 10.3389/fphar.2020.01010.
56. Føns et al., 2020, *Front. Immunol.* 11, 587825. doi: 10.3389/fimmu.2020.587825.
57. van Cann et al., 2021, *FEBS J.* 288, 2418-2435. doi: 10.1111/febs.15593.
58. Mineev et al., 2021, *Proteins* 89, 1055-1060. doi: 10.1002/prot.26074.
59. Мышкин и др., 2021, *Acta Naturae* 13, 134-139. doi: 10.32607/actanaturae.11279.
60. Tabakmakher et al., 2021, *Biophys. J.* 120, 2471-2481. doi: 10.1016/j.bpj.2021.04.020.
61. Табакмахер и др., 2021, *Рос. физиол. жур. им. И.М. Сеченова* 107, 584-604. doi: 10.31857/S0869813921040130.
62. Черных и др., 2021, *Биоорган. химия* 47, 495-505. doi: 10.31857/S0132342321040060.
63. Kasheverov et al., 2021, *Front. Mol. Biosci.* 8, 753283. doi: 10.3389/fmolb.2021.753283.
64. Gigolaev et al., 2022, *J. Biol. Chem.* 298, 102467. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102467.
65. Гиголаев и др., 2022, *Рос. физиол. жур. им. И.М. Сеченова* 108, 1627-1638. doi: 10.31857/S0869813922120056.
66. Гиголаев и др., 2023, *Рос. физиол. жур. им. И.М. Сеченова* 109, 109-118. doi: 10.31857/S0869813923010041.
67. Kuzmenkov et al., 2023, *Toxicon* 231, 107181. doi: 10.1016/j.toxicon.2023.107181.
68. Mineev et al., 2023, *FEBS Lett.* 597, 2358-2368. doi: 10.1002/1873-3468.14705.
69. Krylov et al., 2023, *Protein Sci.* 32, e4776. doi: 10.1002/pro.4776.
70. Oparin et al., *Toxicon* 235, 107308. doi: 10.1016/j.toxicon.2023.107308.
71. Ojomoko et al., 2023, *Front. Pharmacol.* 14, 1327603. doi: 10.3389/fphar.2023.1327603.
72. Черных и др., 2024, *Биоорган. химия* 50, 498-507. doi: 10.31857/S0132342324040081.
73. Zavarzina et al., 2024, *FEBS Lett.* 598, 889-901. doi: 10.1002/1873-3468.14850.
74. Oparin et al., 2025, *Mol. Ther.* 33, 771-785. doi: 10.1016/j.ymthe.2024.12.036.
75. Nikolaev et al., 2025, *Br. J. Pharmacol.* 182, 5173-5191. doi: 10.1111/bph.70111.
76. Iunusova et al., 2025, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 1867, 184458. doi: 10.1016/j.bbamem.2025.184458.
77. Кузьменков и др., 2025, *Биоорган. химия* 51, 853-862. doi: 10.31857/S0132342325050107.

Главы в книгах:

78. Kozlov et al., 2009. In *Protein Biosynthesis* (Esterhouse T.E., Petrinis L.B., eds.), pp. 225-248. Nova Science Publishers, New York, NY.
79. Vassilevski et al., 2010. *Methods Mol. Biol.* 615, 87-100. doi: 10.1007/978-1-60761-535-4_7.
80. Dunaevsky et al., 2020. 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.

Патенты и патентные заявки:

1. Василевский и др., № 2422459 (2011). Приоритет 01 июня 2010 г.
2. Лазарев и др., № 2468089 (2012). Приоритет 07 октября 2009 г.
3. Есипов и др., № 2571942 (2015). Приоритет 14 ноября 2013 г.
4. Василевский и др., № 2650780 (2018). Приоритет 6 декабря 2016 г. Международная заявка WO2018106142. Семейство патентов: RU0002650780, CA3045790, AU2017371488, CN110062763, KR1020190090849, EA201991365, EP3584254, JP2020504098, US20200207815.
5. Степаненко и др., № 2714114 (2020). Приоритет 30 августа 2019 г.

Кандидатские диссертации:

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).