

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА  
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

Кудряшова Ксения Сергеевна

**РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ ПОИСКА  
БЛОКАТОРОВ ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ КАЛИЕВЫХ  
КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА KV1.**

Специальность 03.01.02 – Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель  
доктор биологических наук  
профессор А.В.Феофанов

Москва 2014

**Оглавление:**

<b>Список использованных сокращений.....</b>	<b>5</b>
<b>Введение.....</b>	<b>6</b>
<b>Глава 1. Литературный обзор.....</b>	<b>8</b>
1.1. Особенности строения и функционирования ПЧКК.....	8
1.1.1. Молекулярная организация.....	9
1.1.2. Селективность действия.....	11
1.1.3. Гомо- и гетеромультимеризация.....	12
1.1.4. Вспомогательные субъединицы.....	14
1.1.5. Сборка канала и транспорт в цитоплазматическую мембрану.....	14
1.1.6. Особенности активации и инактивации .....	15
1.2. Семейство каналов Kv1.....	19
1.2.1 Характеристика представителей.....	19
1.2.2. Регуляция работы каналов на уровне организма .....	24
1.2.3. Участие в регуляции клеточного цикла.....	27
1.2.4. Участие в развитие опухолей.....	28
1.2.5. Участие в апоптозе.....	31
1.2.6. Митохондриальная локализация каналов и апоптоз.....	33
1.2.7. Ассоциированные заболевания.....	36
1.2.7.1. Аутоиммунные заболевания.....	37
1.2.7.2. Нейрофизиологические отклонения.....	40
1.2.7.3. Астма.....	41
1.2.7.4. Заболевания пародонта.....	41
1.2.8. Функции в метаболизме .....	42
1.3 Модуляторы каналов семейства Kv1.....	43
1.3.1. Пептидные лиганды ядов.....	43
1.3.1.1. Токсины морских улиток.....	44
1.3.1.2. Токсины ядов змей.....	45

1.3.1.3. Токсины пауков.....	45
1.3.1.4. Токсины актиний.....	46
1.3.1.5. Токсины скорпионов.....	46
1.3.2. Непептидные лиганды.....	50
1.3.2.1. Неселективные блокаторы калиевых каналов.....	50
1.3.2.2. Селективные блокаторы каналов семейства Kv1.....	51
1.4. Методы поиска и исследования новых блокаторов Kv1-каналов.....	58
<b>Глава 2. Материалы и методы.....</b>	<b>64</b>
2.1. Реагенты.....	64
2.2. Клонирование и экспрессия гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6).....	65
2.3. Приготовление сферопластов из клеток <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	66
2.4. Методика проведения экспериментов по анализу взаимодействия лигандов каналов Kv1.x с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе мембраны сферопластов.....	66
2.5. Получение флуоресцентных изображений.....	67
2.6. Анализ данных.....	67
2.7. Методика поиска лигандов каналов Kv1.x в ядах животных.....	68
2.7.1. Анализ ядов пауков и секрета жабы.....	69
2.7.2. Анализ ядов змей.....	69
2.7.3. Фракционирование и анализ яда скорпиона <i>H. laoticus</i> .....	69
2.7.4. Анализ ядов скорпионов <i>B. arenicola</i> и <i>A. amoreuxi</i> . Фракционирование и анализ ядов скорпионов <i>O. scrobiculosus</i> и <i>M. eureus</i> .....	70
<b>Глава 3. Результаты и обсуждение.....</b>	<b>72</b>
3.1. Разработка флуоресцентной методики измерения и анализа взаимодействия лигандов с гибридными белками KcsA-Kv1.x на поверхности мембраны сферопластов.....	72

3.1.1. Подбор условий детекции взаимодействия R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) на поверхности мембраны сферопластов методом ЛСКМ.....	73
3.1.2. Разработка методики измерения констант диссоциации комплексов лигандов с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6).....	79
3.2. Разработка состава и оптимизация свойств компонентов клеточных систем. Разработка протоколов подготовки компонентов к измерениям.....	84
3.2.1. Оптимизация экспрессии гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе мембраны <i>E. coli</i> .....	84
3.2.2. Изучение влияния компонентов буфера на результаты измерений связывания лигандов с гибридными белками Kv1.x (x=1,3,6).....	89
3.3. Характеристика специфичности взаимодействия клеточных систем с известными лигандами Kv1-каналов.....	94
3.4. Анализ структурных особенностей взаимодействия пептидов AgTx2, KTX и OSK1 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6).....	98
3.5. Поиск высокоаффинных пептидных лигандов Kv1-каналов в ядах животных при помощи разработанных клеточных систем.....	102
3.5.1. Анализ ядов пауков.....	105
3.5.2. Анализ ядов змей.....	106
3.5.3. Анализ яда скорпиона <i>H. laoticus</i> и его компонентов.....	108
3.5.4. Анализ яда скорпиона <i>O. scrobiculosus</i> и его компонентов.....	111
3.5.5. Анализ яда скорпиона <i>M. eurus</i> и его компонентов.....	115
<b>Заключение.....</b>	<b>120</b>
<b>Выводы.....</b>	<b>122</b>
<b>Благодарности.....</b>	<b>123</b>
<b>Список процитированной литературы.....</b>	<b>124</b>

## Список использованных сокращений

ПЧКК – потенциал-чувствительные калиевые каналы

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ВПС – высокопроизводительный скрининг

shRNA – малые РНК, образующие шпильки

siRNA – малые интерферирующие РНК

АФК – активные формы кислорода

*I<sub>Kur</sub>* – калиевые ток задержанного выпрямления

кб – единица измерения длины молекулы ДНК равная 1000 пар нуклеотидов

ТЭА – тетраэтиламмоний

4-АП – 4-аминопиридин

DTX – дендротоксин

MgTx – маргатоксин из яда скорпиона *Centruroides margaritatus*

OSK1 – токсин из скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*

КТХ – калиотоксин из скорпиона *Androctonus mauretanicus mauretanicus*

AgTx2 – агитоксин 2 из скорпиона *Leiurus quinquestriatus*

R-AgTx2 – агитоксин 2, флуоресцентно-меченный 5 (6) карбокситетраметил-родамином

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

LB – питательная среда Лурия–Бертани для культивирования микроорганизмов

ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

ДДС-ПААГ – додецилсульфат натрия – полиакриламидный гель

БСА – бычий сывороточный альбумин

о.е. – концентрация раствора, имеющего оптическую плотность 1 (на длине волны 580 нм) при длине пути светового луча, равного 1 см

## Введение

Изучение взаимосвязей структуры и функциональных свойств ионных каналов, а также структурных особенностей их комплексов с лигандами является одним из актуальных направлений современной биофизики.

В диссертации рассматриваются потенциал-чувствительные калиевые каналы семейства Kv1 – это порообразующие транспортные белки, которые регулируют проницаемость мембраны для ионов калия в ответ на изменение мембранного потенциала. Каналы семейства Kv1 широко представлены в организме человека и выполняют разнообразные функции, включая поддержание потенциала покоя в невозбудимых клетках, частоту потенциала действия в возбудимых клетках [1], а также участвуют в кальциевой сигнализации, регуляции объема, секреции, пролиферации и миграции клеток [2]. Неудивительно, что обнаружено множество заболеваний, связанных с нарушениями структуры и нормального функционирования каналов Kv1.

Так, например, канал Kv1.1 экспрессируются в клетках центральной нервной системы, мутации канала ассоциированы с нейрональными отклонениями [3]. Канал Kv1.6 присутствует в легочной артерии [4], а его пониженная экспрессия – один из симптомов легочной гипертензии. Канал Kv1.3 типичен для клеток иммунной системы. Показано, что экспрессия канала Kv1.3 в мембране Т-лимфоцитов возрастает у больных аутоиммунными заболеваниями, астмой, пародонтозом. Блокаторы канала Kv1.3, подавляют Т-клеточную пролиферацию и препятствуют развитию симптомов перечисленных заболеваний [5]. Примечательно, что наблюдаемый положительный эффект не сопровождается нарушениями работы иммунной системы в целом, поскольку мишенью действия блокаторов является только узкая субпопуляция Т-клеток, экспрессирующих канал Kv1.3.

Необходимость совершенствования молекулярных инструментов изучения функционирования и физиологической роли Kv1-каналов в норме и патологии, а также их терапевтическая значимость делают актуальным разработку новых аналитических систем, обеспечивающих удобный направленный поиск высокоаффинных и селективных модуляторов этих каналов. Традиционно взаимодействие блокаторов с ионными каналами исследуют при помощи электрофизиологического (технология patch-clamp) и радиолигандного методов анализа. Электрофизиологический метод по праву считается “золотым стандартом” изучения работы ионных каналов. На основе этого метода созданы высокопроизводительные системы скрининга, но они дороги и имеют ряд ограничений для использования. Радиолигандный метод позволяет выявить и количественно оценить связывание лигандов с различными рецепторами, но требует особых условий работы с радиоактивными материалами. Современная безопасная альтернатива традиционным методам – это флуоресцентные методы анализа.

Информативность флуоресцентных методов изучения каналов семейства Kv1 была продемонстрирована с применением методов проточной цитометрии [6], флуоресцентной микроскопии одиночных молекул [7] и анализа изменения мембранного потенциала при помощи флуоресцентных красителей и флуоресцентного ридера [8]. Новые уникальные возможности открывает комбинированное применение современных методов флуоресцентной микроскопии и клеточной биоинженерии, но эти технологии применительно к Kv1-каналам пока практически не разработаны.

**Цели и задачи работы.** Цель работы заключалась в разработке клеточных систем для поиска и изучения лигандов потенциал-чувствительных калиевых каналов семейства Kv1. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Разработать на основе флуоресцентной лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ) методику анализа взаимодействий лигандов калиевых каналов Kv1.x с гибридными белками KcsA-Kv1.x в составе мембраны сферопластов *E. coli*. с возможностью измерения констант диссоциации комплексов.

2) Разработать состав клеточных систем для поиска и изучения лигандов каналов Kv1.x (x=1,3,6) и протоколы подготовки их компонентов к измерениям.

3) Охарактеризовать специфичность взаимодействия клеточных систем с известными лигандами каналов Kv1.x (x=1,3,6), измерив константы диссоциации образующихся комплексов.

4) Апробировать разработанные клеточные системы с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) для поиска высокоаффинных пептидных лигандов Kv1-каналов в ядах животных.

5) Провести анализ структурных особенностей, определяющих функционально важную избирательность и высокую аффинность взаимодействия пептидных лигандов с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6).

## Глава 1. Обзор литературы

**1.1. Особенности строения и функционирования ПЧКК.** Потенциал-чувствительные калиевые каналы (ПЧКК) – это трансмембранные белки, которые специфично пропускают ионы калия через мембрану клетки в ответ на изменение мембранного потенциала. ПЧКК – это обширное семейство каналов, включающее более 40 генов в геноме человека [2]. ПЧКК контролируют потенциал покоя мембраны в невозбудимых клетках и частоту потенциала действия в возбудимых клетках, давая выход току калия и реполяризуя мембрану вслед за деполяризацией [1]. Мутации и дисфункции ПЧКК обычно

дают о себе знать в возбудимых тканях, таких как мозг, сердце, скелетная мускулатура, где они ассоциированы с эпилепсией, параличем и аритмией. В невозбудимых тканях, таких как почки, легкие, поджелудочная железа, иммунная системы, жировая ткань и клетки эпителия, ПЧКК участвуют в регуляции потенциала покоя мембраны и оказывают воздействие на различные процессы от секреции до пролиферации клеток [1].

**1.1.1. Молекулярная организация.** ПЧКК позвоночных – это тетрамеры, состоящие, обычно, из четырех одинаковых субъединиц ( $\alpha$ -субъединиц), упорядоченных в виде кольца. Каждая  $\alpha$ -субъединица состоит из шести трансмембранных сегментов (S1-S6), образованных  $\alpha$ -спиралями и небольшого участка порообразующей петли (P-петля) между сегментами S5 и S6 (рис. 1а). N- и C-терминальные фрагменты  $\alpha$ -субъединиц локализованы в цитоплазме.

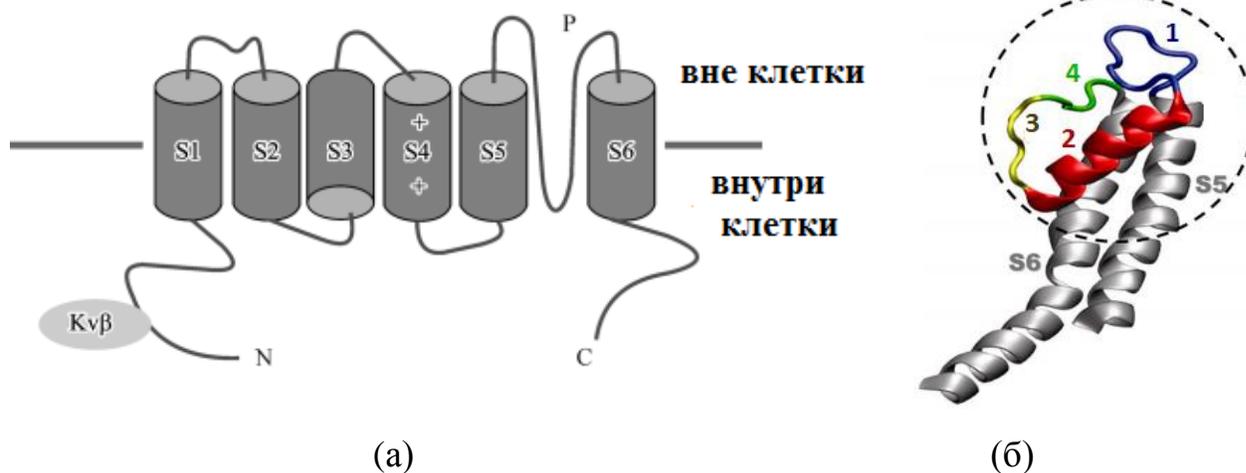


Рис. 1. Топология в мембране клетки субъединиц ПЧКК (а). S1-S6 – трансмембранные сегменты одной  $\alpha$ -субъединицы; сегмент S4 – сенсор потенциала; P – участок P-петли; Kv $\beta$  – вспомогательная  $\beta$ -субъединица [9]. Схема строения домена центральной поры одной  $\alpha$ -субъединицы ПЧКК (б). Цветом и нумерацией отмечены элементы структуры P-петли: линкер S5-P (1), P-спираль (2), селективный фильтр (3), линкер P-S6 (4) [10].

P-петля состоит из 4-х различных элементов структуры (рис. 1б): (1) S5-P линкер (или turret, “башенка”), представляющий собой неупорядоченную последовательность из 10 а.о.; (2) P-спираль (13 а.о.), выполняющая важную каркасную роль в поддержании структуры поры; (3) селективный фильтр, консервативный мотив участка P-петли, формирующий канал для прохождения ионов калия в составе тетрамера; (4) короткий неупорядоченный P-S6 линкер [10]. Наибольшая гомология первичной последовательности поры калиевых каналов наблюдается в области трансмембранных спиралей, селективного фильтра и P-спирали, в то время как последовательность S5-P линкера, выступающего в виде небольшой петли над поверхностью канала, отличается большой вариабельностью у разных ПЧКК [11].

Сегменты S5 и S6, формируя гидрофильный канал для тока ионов, образуют домен центральной поры. Центральная пора окружена сегментами S1-S4, составляющими потенциал-чувствительный домен. Высококонсервативный сегмент S4 в каждом третьем положении содержит положительно заряженную аминокислоту (лизин или аргинин). Когда мембрана клетки деполяризуется, положительно сегмент S4 смещается примерно на 1 нм от внутренней к наружной поверхности мембраны [12] и запускает дальнейшие конформационные изменения, способствующие активации канала [13].

Известно 40 видов  $\alpha$ -субъединиц ПЧКК человека. На основании гомологии гидрофобных трансмембранных доменов  $\alpha$ -субъединицы ПЧКК объединены в 12 классов (Kv $\alpha$ 1-12). Соответственно выделяют 12 семейств ПЧКК (Kv1-Kv12) (рис. 2). Объектом данного исследования были представители семейства Kv1, поэтому в дальнейшем будет сделан упор на рассмотрение этой группы каналов.

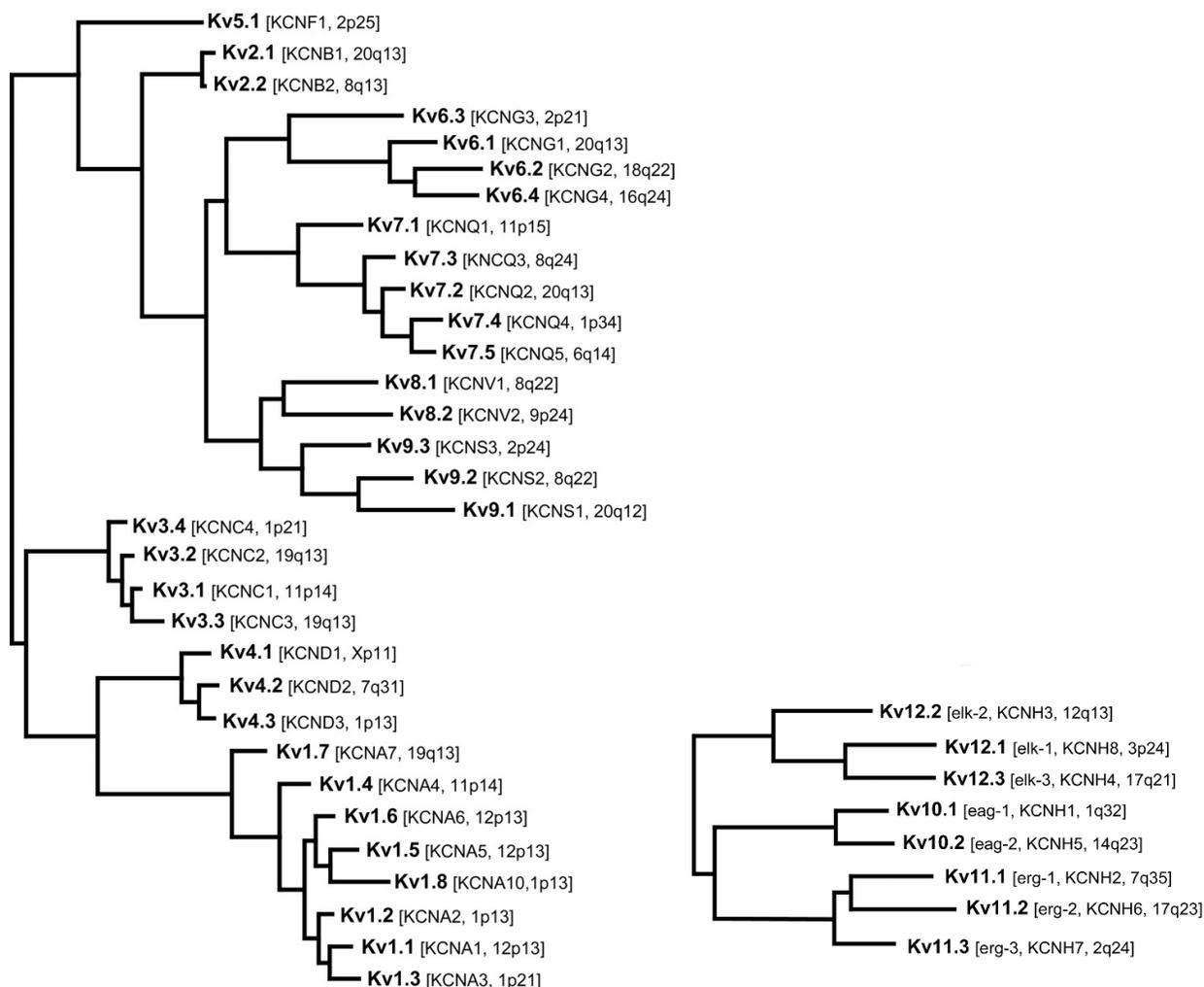


Рис. 2. Филогенетическое дерево каналов Kv1-12 [14]. Номенклатура каналов соответствуют терминологии комитета IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology, Международный Союз Фундаментальной и Клинической Фармакологии). В квадратных скобках указано название гена и хромосомная локализация.

**1.1.2. Селективность действия.** Каналы семейства Kv1 обладают высокой селективностью в отношении ионов калия и не пропускают другие катионы, такие, например, как ионы натрия. Селективность достигается за счет наличия особым образом устроенного селективного фильтра в наиболее узкой части

трансмембранной поры [15]. Работы по изучению точечных мутаций канала выявили регионы субъединиц наиболее важные для обеспечения ионной селективности. Они включают аминокислотные последовательности T-V-G-Y-G или T-V-G-F-G. Ионы калия при прохождении через селективную пору теряют сольватную оболочку воды, заменяя ее взаимодействием с карбонильными группами аминокислот T-V-G-X-G четырех  $\alpha$ -субъединиц. Значение дипольного момента у карбонильных групп больше, чем у молекул воды, что помогает преодолеть низкую диэлектрическую проницаемость мембраны. Диаметр селективного фильтра оптимален для прохождения ионов калия (1,33 Å), но слишком велик для меньшего по размерам катиона натрия (0,95 Å) (рис. 3). Поэтому ионы калия успешно формируют координационные связи, а ионы натрия, располагаясь слишком далеко от карбонильных групп белков, сформировать координационные связи не могут. Так достигается избирательность для прохождения ионов калия через канал [16].

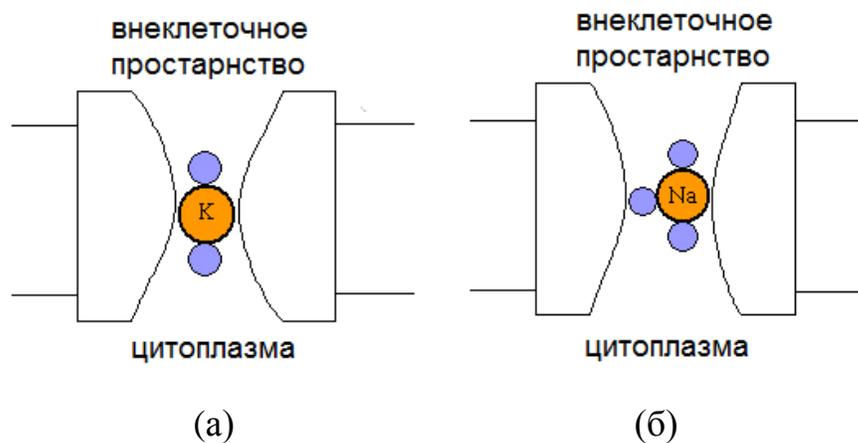


Рис. 3. Схематичное изображение расположение ионов калия (а) и натрия (б) в селективном фильтре ПЧКК.

**1.1.3. Гомо- и гетеромультимеризация.** Важным свойством, благодаря которому достигается большое разнообразие ПЧКК, является способность  $\alpha$ -субъединиц канала к гетеромультимеризации. Каждый ген ПЧКК кодирует одну

$\alpha$ -субъединицу. Соединяясь по четыре,  $\alpha$ -субъединицы одного семейства ( $Kv\alpha 1-2$ ) могут образовывать гомо- и гетеротетрамеры (рис. 4). Субъединицы семейств  $Kv\alpha 5$ ,  $Kv\alpha 6$ ,  $Kv\alpha 8$  и  $Kv\alpha 9$  образывать функциональные ионные каналы не способны, но, участвуя в гетеромультимеризации с  $Kv\alpha 2$  и  $Kv\alpha 3$ , могут модифицировать их свойства.

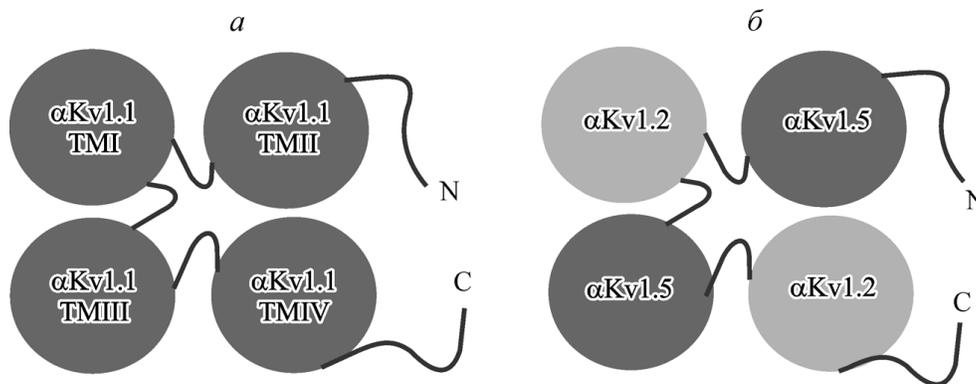


Рис. 4. Гомотетрамерная (а) и гетеротетрамерная (б) организация ПЧКК. TMI—TMIV — трансмембранные домены ПЧКК;  $\alpha Kv1.1$ ,  $\alpha Kv1.2$  и  $\alpha Kv1.5$  —  $\alpha$ -субъединицы ПЧКК [9].

Поскольку для каждого канала семейства характерны свои особенные параметры электрической активности, то гетеротетрамеры часто приобретают новые и еще более разнообразные свойства. Число потенциально-возможных функциональных комбинаций с индивидуальными биофизическими и фармакологическими свойствами очень велико. К примеру, для каналов  $Kv1.1$ ,  $Kv1.2$  и  $Kv1.6$  характерен активируемый при деполяризации ток калия с медленным началом и устойчивым временем действия. Ток калия через канал  $Kv1.4$  напротив характеризуется быстрым началом и устойчиво быстрой инактивацией. Коэкспрессия каналов  $Kv1.2$  и  $Kv1.4$  приводит к формированию каналов со случайно стехиометрией и появлению токов с новыми характеристиками отличными от исходных, кроме того меняется способность

каналов связывать лиганды [17]. С точки зрения исследовательских работ это осложняет интерпретацию данных о локализации каналов в тканях и клетках организма, поскольку традиционно для этой цели используют высокоаффинные и специфические блокаторы каналов. Таким образом, лиганды каналов – это действенный инструмент изучения свойства каналов и их функций *in vitro*, однако, к сожалению, он становится менее надежным, при работе с клетками, взятыми из организма, где каналы часто приобретают гетеромультимерную организацию [10, 11].

**1.1.4. Вспомогательные субъединицы.** Каналобразующие комплексы могут также включать вспомогательные субъединицы, наиболее разнообразными из которых являются  $\beta$ -субъединицы.  $\beta$ -субъединицы (Kv $\beta$ 1-3) – это белки, которые, как правило, ассоциированы с  $\alpha$ -субъединицами в стехиметрии  $\alpha_4\beta_4$ . Сами по себе они не формируют пору, но взаимодействуя с цитоплазматической частью порообразующих  $\alpha$ -субъединиц модулируют их свойства и функции [20]. Сборка  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединиц происходит у млекопитающих в эндоплазматическом ретикулуме (ЭПР), после этого они остаются вместе как постоянный комплекс [13, 6]. Каналы семейства Kv1, кроме  $\beta$ -субъединиц, могут взаимодействовать и с другими типами вспомогательных субъединиц, например с трансмембранным белком MiRP (Kv1.1, Kv1.3) и внутриклеточным белком KChAP (Kv1.3-Kv1.5) [9].

**1.1.5. Сборка канала и транспорт в цитоплазматическую мембрану.** После сборки каналобразующих комплексов в ЭПР происходит транслокация белков к цитоплазматической мембране. При этом эффективность транслокации гомо- или гетеротетрамеров зависит от состава входящих в них субъединиц. Так, присутствие Kv1.3, Kv1.4, Kv1.5 субъединиц способствует результативному встраиванию каналов в цитоплазматическую мембрану, а наличие Kv1.1, Kv1.2,

Kv1.6 субъединиц, напротив, задерживает комплексы в ЭПР [22]. Показано, что наличие сигнала задержки в ЭПР у канала Kv1.1 препятствует сборке его гомотетрамеров и сборке гетеротетрамеров, содержащих более одной субъединицы Kv1.1 [23].

Методом точечных мутаций определено положение двух аминокислотных остатков, наиболее важных для транслокации канала в мембрану: один расположен в области Р-петли, другой в регионе дистальном от селективного фильтра [22]. Интересно, что это те же самые аминокислотные остатки, которые принимают непосредственное участие в связывании селективного лиганда Kv1-каналов дендротоксина (DTX). Было высказано предположение, что DTX способен конкурировать с белком, распознающим сигнал задержки в ЭПР, за связывание с поровой частью Kv1.1. Действительно, одновременная экспрессия растворимого DTX с Kv1.1 в полости ЭПР приводит к значительному возрастанию функциональных гомотетрамеров канала на поверхности клеток [23]. Это подтверждает тот факт, что белки ЭПР, ответственные за транслокацию ПЧКК к мембране, взаимодействуют с каналами по типу поровых блокаторов.

**1.1.6. Особенности активации и инактивации.** Активация и инактивация ПЧКК играет важную роль в передаче сигналов в возбудимых клетках. В ответ на изменение химического или электрического потенциала поровый домен ПЧКК открывается или закрывается, тем самым контролируя поступление калия через мембрану [16]. Важно понимать, что активация канала означает возрастание вероятности открытия канала, но не увеличение времени его нахождения в открытом состоянии. Инактивация — это способность ионного канала через некоторое время после своего открытия автоматически понижать свою проницаемость даже в том случае, когда открывший их активирующий фактор продолжает действовать [24].

Разные типы калиевых каналов имеют схожий дизайн поровой части, включающий активационные ворота, расположенные с цитоплазматической стороны канала, и инактивационные ворота. Инактивационные ворота, которые препятствуют току ионов при деполяризованном состоянии мембраны, бывают двух видов. Соответственно различают два механизма инактивации: быстрый N-тип и медленный C-тип (рис. 5) [25].

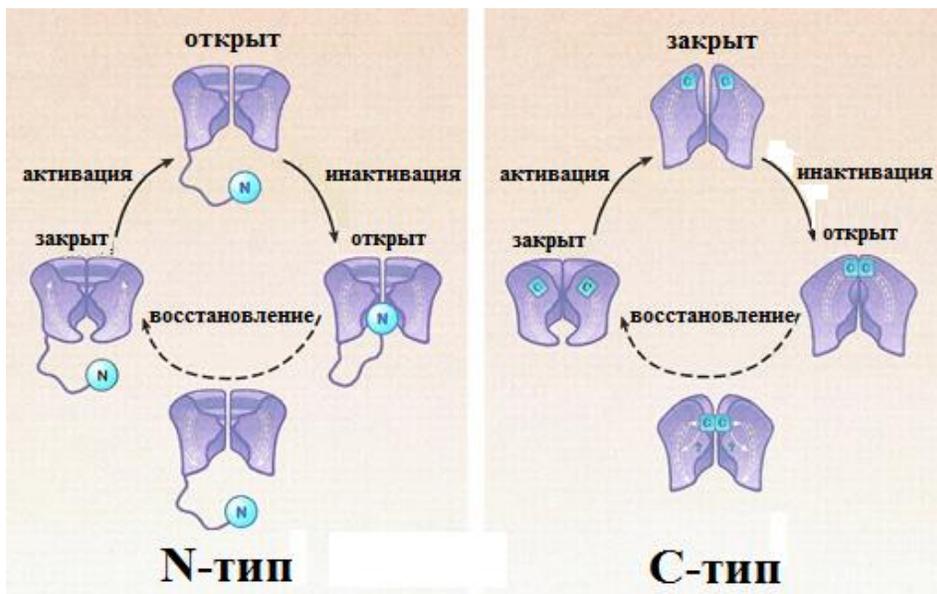


Рис. 5. Схема работы ПЧКК с N и C-типами инактивации [26].

При потенциале покоя активационные ворота канала закрыты, инактивационные ворота открыты, селективный фильтр находится в проводящей конформации. Активация ПЧКК начинается с изменений в конформации потенциал-чувствительного домена и в результате цепочки событий приводит к открытию активационных ворот. Установлено, что открытие и закрытие активационных и инактивационных ворот у группы ПЧКК происходит взаимосвязанно [16, 17]. Благодаря этому достигается максимальная проводимость канала и координируется последовательная работа ворот.

Восстановление каналов семейства Kv1 из инактивированного состояния происходит обычно медленнее, чем развитие самой инактивации [28].

Структура инактивированного канала до сих пор изучена слабо. Например, нет точных данных о конформации активационных ворот в инактивированном состоянии канала. Трудность таких измерений заключается в том, что инактивированные каналы не проводят ионы калия и электрофизиологические методы измерения не дают никакой информации о состоянии (открытом/закрытом) активационных ворот [25].

Инактивация по N-типу – это быстрый процесс, подверженный аутоингибированию. Гипотеза, объясняющая N-концевую инактивацию, получила название “шарик на цепочке” (“ball and chain”). Согласно этой гипотезе N-концевой домен (“шарик”) некоторых  $\alpha$ - или  $\beta$ -субъединиц ПЧКК подвижен и способен взаимодействовать с открытой порой канала с цитоплазматической стороны [15]. Связывание N-концевого домена с участком поровой петли блокирует ток калия, вызывая инактивацию канала. Показано, что при сокращении длины N-концевого домена инактивация канала происходит быстрее, при удлинении – медленнее, а при его полном удалении канал перестает инактивироваться [29]. N-тип инактивации не зависит от концентрации ионов калия в среде. Среди каналов семейства Kv1 N-тип инактивации показан для  $\alpha$ -субъединицы Kv1.4 [30] и  $\beta$ 1-субъединицы в комплексе с Kv1.1 [31] и Kv1.5 [32]. При этом для инактивации по N-типу в составе тетрамера достаточно наличия хотя бы одной субъединицы, несущей блокирующий N-концевой домен. Канал Kv1.6 в составе C-концевого участка имеет домен NIP (N-inactivation prevention) [33], который препятствует N-типу инактивации; по этой причине гетеротетрамерные комплексы с Kv1.6 инактивации по N-типу не подвергаются.

C-тип инактивации характерен для Kv1 каналов, не способных к N-типу инактивации, но также он был показан для каналов с N-типом инактивации при

удалении N-концевого домена. Таким образом, оба механизма могут присутствовать у Kv1 каналов одновременно. С-концевой тип инактивации заключается в изменении конформации селективного фильтра (рис. 6). Полагают, что С-концевому типу инактивации соответствует непроводящая структура поры, что отражает слабую занятость связывающих участков для калия в селективном фильтре [34]. Нарушение структуры селективного фильтра приводит к тому, что, инактивированные по С-типу каналу становятся способны к проведению  $\text{Na}^+$  и  $\text{Li}^+$  [35].

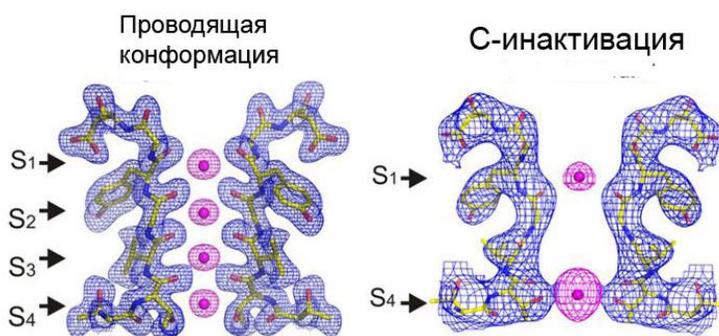


Рис. 6. Сравнение проводящей и С-инактивированной структуры селективного фильтра канала KcsA. S1-S4 – трансмембранные сегменты диагонально симметричных субъединиц канала [36].

Как правило, С-тип инактивации имеет более медленную кинетику (мс-с) и чувствителен к составу ионов с внешней стороны мембраны. Увеличение внеклеточного калия замедляет процесс С-инактивации по механизму условно называемому “нога в двери” (“foot-in-the-door”) [37]. Его суть в том, что при высокой концентрации ионов калия, сохраняется занятость мест связывания в селективном фильтре и процесс структурной перестройки поровой части, характерный для инактивированного состояния, откладывается. Аналогичным образом замедляется кинетика С-инактивации при воздействии на канал поровых блокаторов [38]. Кроме того, установлено, что снижение

внеклеточного pH увеличивает скорость инактивации, а pH-чувствительность каналов во многом зависит от присутствия гистидина в определенном положении Р-петли [39].

Инактивация бактериального канала KcsA имеет много общих черт с С-типом инактивации ПЧКК эукариот и в настоящее время подробно изучена [40]. А вот координация работ активационных и инактивационных ворот у канала KcsA и каналов семейства Kv1 осуществляется по-разному [27].

**1.2. Семейство Kv1.** В 1989 году у *Drosophila* был идентифицирован ген *Shaker*, мутации которого вызывают различные виды атипичного поведения у дрозофилл [41]. Соответствующие гомологи этого гена, кодирующие ПЧКК в клетках млекопитающих и человека, образуют семейство Kv1 (Kv1.1-Kv1.8), иначе называемое семейством *Shaker*. Другие гены *Drosophila*, такие как *Snap*, *Shaw* и *Shal* [41], также имеют гомологи у млекопитающих, которые кодируют соответственно семейства ПЧКК Kv2, Kv3 и Kv4 [9].

**1.2.1. Характеристика представителей.** Представители семейства Kv1/*Shaker*, о которых пойдет речь в данной работе, встречаются в различных клетках и тканях организма человека. Особенно широко каналы представлены в центральной нервной системе (ЦНС). Для большинства из известных 8 представителей семейства (Kv1.1-Kv1.8) показана способность образовывать гетеромультимеры в ЦНС, однако точная структурная композиция таких каналов остается не выясненной. Во многом это объясняется недостатком высокоаффинных и специфичных блокаторов, которые используют для локализации каналов в тканях. Как правило, в ЦНС каналы семейства Kv1 содержат одну субъединицу Kv1.1 и/или субъединицу Kv1.2, и поэтому эти два канала традиционно расценивают как мишени для терапии различных нейрональных отклонений. Помимо ЦНС каналы семейства Kv1 могут быть

обнаружены в сердце, в клетках сосудистой и иммунной системы и других тканях. Модулирование свойств каналов Kv1.5 и Kv1.3 потенциально может быть использовано соответственно для терапии фибрилляций предсердий и иммуносупрессии. Терапевтическая важность каналов Kv1.4, Kv1.6, Kv1.7 и Kv1.8 в настоящее время не очевидна. Основные свойства и функции представителей семейства Kv1 перечислены в табл. 1.

Табл. 1. Некоторые свойства каналов семейства Kv1.

	Расположение каналов	Физиологическое значение	Мутации и заболевания; фармакологическое значение
Kv1.1	Мозг, сердце, сетчатка, скелетные мышцы, панкреатические островки поджелудочной железы	Поддержание мембранного потенциала, модуляция электрической возбудимости нейронов и мышц	Мутации канала Kv1.1 вызывают эпизодическую мышечную атаксию [42]. Для Kv1.1 (-/-) трансгенных мышей характерны спонтанные судороги и изменения в ЦНС [3].
Kv1.2	Головной мозг (мост, продолговатого мозг, мозжечок, нижние холмики, гиппокамп, таламус, кора	Один из наиболее представленных субъединиц семейства Kv1 в центральной нервной	Для Kv1.2 (-/-) трансгенных мышей характерны спонтанные судороги и изменения в ЦНС

	<p>головного мозга, верхний бугорок, средний мозг, полосатое тело, обонятельная луковица, нейроны, связанные с механорецепцией и проприоцепцией), спинной мозг, Шванновские клетки; сердце (предсердие, желудочек), панкреатические островки поджелудочной железы, сетчатка, гладкие мышцы</p>	<p>системе. Ключевая детерминанта мембранной возбудимости в нейронах ЦНС и сердечно-сосудистых тканей. В головном мозге отвечает за высвобождение нейромедиаторов</p>	<p>[3].</p>
Kv1.3	<p>Головной мозг (нижние холмики, обонятельная луковица (!), верхний бугорок, полосатое тело, гиппокамп, кора), легкие, панкреатические панкреатические</p>	<p>Регулирование мембранного потенциала покоя и кальцевой сигнализации в лимфоцитах, олигодендроцитах и других клетках</p>	<p>Экспрессия Kv1.3 сильно и селективно увеличена в эффекторных T-клетках памяти, ассоциированных с рядом заболеваний (рассеянный склероз, диабет 1 типа,</p>

	<p>островки  поджелудочной  железы, тимус,  селезенка,  лимфатические узлы,  фибробласты, Т- и В-  лимфоциты (!),  миндалины,  макрофаги,  олигодендроциты,  остеокласты,  тромбоциты,  сперматозоиды,  яички</p>		<p>ревматоидный артрит,  астма, пародонтоз)  [5].</p>
Kv1.4	<p>Мозг (обонятельная  луковица, полосатое  тело, гиппокамп,  верхние и нижние  холмики, кора  головного мозга,  базальные ганглии  мозга), скелетные  мышцы, сердце  (кардиомиоциты),  поджелудочная  железа</p>	<p>Пост-гиполяризация  или ранняя  реполяризация в  нейронах сердца и  мозга.  Потенциальные  медиаторы  реполяризации в  панкреатических  островках.</p>	<p>Эксперессия Kv1.4  возрастает в  желудочковых  миоцитах крыс при  индукции диабета  [43];  Эксперессия Kv1.4  уменьшается после  инфаркта миокарда у  крыс [44].  Единственные каналы  среди семейства Kv1,  которые были</p>

			обнаружены в нейронах боли малого диаметра [45].
Kv1.5	Миоциты сердца, Аорта, толстый кишечник, почки, желудок, гладкая мускулатура, весь эмбрион, головной мозг (гипофиз, кора, гиппокамп, олигодендроциты, микроглия, Шванновские клетки), легочная артерия	Обеспечивают калиевый ток задержанного выпрямления ( <i>I<sub>Kur</sub></i> ) в миоцитах сердца. Поддерживают мембранный потенциал и модулирует электрическое возбуждение нейронов	Наиболее важные каналы семейства Kv1 в клетках сердца человека. Возможно использование в управлении фибрилляций предсердий, блокируя <i>I<sub>Kur</sub></i> [46]. Мутации канала Kv1.5 ассоциированы со спонтанной гибелью от сердечных заболеваний [47]. При хроническом курении сигарет снижается экспрессия мРНК и белка Kv1.5 в гладкой мускулатуре бронхов [48]. Возможно использование блокаторов канала Kv1.5 при лечении пациентов с

			артериальной легочной гипертензией [49].
Kv1.6	Мозг, толстый кишечник, половые клетки, сердце, легкие, яичники, яички, астроциты, легочная артерия, гладкие мышцы, олигодендроциты	Регулирование мембранного потенциала нейронов	В дистальной части легочной артерии при хронической гипоксии снижается уровень экспрессии мРНК и продукция белка Kv1.6 [4].
Kv1.7	Плацента, амнион, островки поджелудочной железы (у мыши), скелетные мышцы, сердце, легочная артерия	Обеспечивает реполяризацию клеточных мембран. Характеристики каналы схожи с калиевым током задерженного выпрямления ( <i>I<sub>Kur</sub></i> ) в миоцитах сердца.	Не установлено
Kv1.8	Почки, мозг, сердце, скелетные мышцы, надпочечники	Регулирование мембранного потенциала клеток проксимальных почечных канальцев	Не установлено

**1.2.2. Регуляция работы каналов на уровне организма.** Регуляция работы каналов семейства Kv1 подробно изучается в связи с их широкой

представленностью в центральной нервной системе, сердце, почках и других органах и тканях человека. Нарушение в регуляции работы каналов может приводить к серьезным последствиям для организма.

Регуляция экспрессии гена может осуществляться на уровне транскрипции, трансляции и посттрансляционно. Среди ПЧКК контроль на транскрипционном уровне был изучен для канала Kv1.5. Показано, что гормон гонадолиберин снижает уровень транскрипции гена Kv1.5 в линиях клеток гипофиза GH3 [50].

О регуляции генов ПЧКК на трансляционном уровне известно еще меньше. Принимая в рассмотрение тот факт, что транскрипты ПЧКК крупные (6-12 кб), но содержат открытые рамки считывания относительно малого размера (1,5-2,5 кб), можно предположить, что нетранслируемая часть транскрипта несёт регуляторные функции [51]. На линии глиомы С6 установлено, что при высоком уровне цАМФ в клетках, наблюдается обратимое снижение концентрации РНК Kv1.1, но скорость транскрипции гена уменьшается совсем незначительно. Снижение доступных транскриптов приводило к уменьшению продукции белка Kv1.1 и в целом вызывало уменьшение калиевого тока через клетку.

Посттрансляционный уровень регуляции ПЧКК исследован наиболее подробно. В настоящий момент известно, что посттрансляционный контроль активности каналов в большинстве клеток осуществляется путем фосфорилирования белков [52]. В регуляции работы каналов семейства Kv1 показано участие серин/треониновых протеинкиназ (цАМФ-зависимая протеинкиназа А, протеинкиназа С) и тирозиновых протеинкиназ. Важно отметить, что в зависимости от внутриклеточного окружения протеинкиназы могут либо напрямую изменять биофизические свойства каналов (увеличивая проводимость), либо варьировать цитоплазматическую концентрацию каналов путем эндоцитоза, в этом случае эффект, как правило, противоположный.

Так, стимуляция  $\beta 2$ -адренорецепторов приводит к значительному и обратимому увеличению тока через канал Kv1.2. Установлено, что эффект вызван увеличением времени нахождения каналов в проводящем состоянии под воздействием протеинкиназы А [53]. Схожие результаты были получены для канала Kv1.5 [54] и Kv1.3 [55]. Активация канала Kv1.1 протеинкиназой А приводила к увеличению амплитуды тока, предположительно, вследствие общего увеличения числа каналов, встроенных в мембрану [56]. В Т-лимфоцитах человека тиротеинкиназа С активирует канал Kv1.3 [57].

Исследование канала Kv1.2 показало, что его гомеостаз зависит в первую очередь от уровня цАМФ в клетке. На линии эмбриональных клеток почки человека НЕК293, экспрессирующих каналы Kv1.2, показано, что при низкой концентрации цАМФ поддерживается базальный уровень активности протеинкиназы А, что приводит к частичному эндоцитозу Kv1.2. По некоторым предположениям протеинкиназа А способствует потере контакта канала Kv1.2 с подстилающим кортикальным актином, способствуя тем самым образованию эндосом. Высокий уровень цАМФ ингибирует эндоцитоз независимым от протеинкиназы А путем и вызывает рост числа каналов на мембране [53].

Активность канала Kv1.3, расположенного в почках, положительно регулируется протеинкиназой SGK1 (serum-glucocorticoid activated kinase 1), которая является одним из основных медиаторов работы альдостерона в дистальных почечных канальцах [58]. Протеинкиназа SGK1 также активирует канал Kv1.5 в панкреатических клетках поджелудочной железы, что приводит к подавлению процесса высвобождения инсулина [58].

Действие тирозинкиназ, как правило, приводит к подавлению активности каналов. Канал Kv1.2 был первым потенциал-чувствительным каналом, посттрансляционная регуляция которого была установлена: фосфорилирование тирозинов Kv1.2, вызванное активацией мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, приводит к снижению ионного тока через канал [59]. В нейронах

обонятельной луковицы, где каналы Kv1.3 определяют большую часть измеряемого выходного тока, активность каналов подавляется инсулином также через активацию рецепторов тирозинкиназы [60]. Эксперименты по сайт-направленному мутагенезу выявили, что опосредованным образом инсулин вызывает фосфорилирование многочисленных остатков тирозина в каналах Kv1.3. Схожие эффекты действия тирозинкиназы были получены для каналов Kv1.1 [61] и Kv1.5 [62]. Наиболее изученный механизм действия тирозинкиназ - активация эндцитоза Kv1-каналов путем фосфорилирования их N-концевого тирозина [52].

**1.2.3. Участие в регуляции клеточного цикла.** Накоплено большое количество свидетельств о вовлечении ПЧКК в процессы пролиферации клеток. Среди представителей семейства Kv1 участие в клеточном росте изучено для каналов Kv1.3 и Kv1.5 [63]. Под контролем канала Kv1.3 осуществляется пролиферация макрофагов [64], а экспрессия Kv1.3 возрастает в делящихся клетках микроглии гиппокампа [65]. Участие Kv1.5 показано в пролиферации миобластов [66] и подробно изучено для разных типов глиом [67]. Применение Kv1-блокаторов *in vitro* приостанавливает деление клеток в различных типах нормальных и раковых клеток [59, 60].

Существует несколько гипотез, объясняющих участие ПЧКК в контроле клеточного цикла. Первая гипотеза касается изменения мембранного потенциала клетки, которое возникает при продвижении по клеточному циклу. Известно, что поддержание мембранного потенциала на гиперполяризованном уровне необходимое условие продвижения клеток через фазу G1 [70]. Активация ПЧКК ведет к утечке ионов калия из клетки, что вызывает кратковременную гиперполяризацию. Разумное объяснение заключается в том, что ПЧКК необходимы для контроля над специальной триггерной точкой при G1/S переходе. Действительно, экспрессия ПЧКК зависит от стадии клеточного

цикла и временно увеличивается в течение фазы G1 и S [66]. Показано, что активность ионных каналов и сопутствующее изменение мембранного потенциала модулирует работу белков-регуляторов клеточного цикла. Каналы Kv1.3 [71] и Kv1.5 [66] участвуют в регуляции экспрессии циклина или ингибиторов циклин-зависимых киназ [72]. В Т-лимфоцитах присутствие канала Kv1.3 необходимо для продукции IL-2 в начале стадии G1 и для продвижения по клеточному циклу [73]. На глиальных клетках продемонстрировано, что блокаторы каналов семейства Kv1 накладывают арест на фазу G1 и вызывают накопление двух ингибиторов циклин-зависимых киназ (p27 и p21), которые регулируют клеточную пролиферацию и терминальную дифференциацию во множестве типов клеток [72].

Предполагается также, что участие ПЧКК в контроле клеточного цикла реализуется через кальциевую сигнализацию. Гиперполяризация мембранного потенциала вызывает вход ионов кальция из наружной среды в клетку через кальциевые каналы и высвобождение кальция из внутренних компартментов [70]. Кальциевая сигнализация является хорошо изученным триггером пролиферации, воздействуя через несколько разных путей [63].

Альтернативная гипотеза связывает пролиферацию, ПЧКК и объем клеток. Изменения концентрации ионов калия задействовано в изменениях объема клеток при пролиферации. Этот процесс также неразрывно регулируется белками клеточного цикла [74].

**1.2.4. Участие в развитие опухолей.** Принципиальная роль Kv1 каналов в развитии опухолей была обнаружена на основании сравнения уровня экспрессии каналов Kv1.1, Kv1.3 и Kv1.5 в различных типах опухолевых клеток по сравнению с нормальными неизмененными клетками.

Наиболее обширный фактический материал был получен для канала Kv1.3. Известно, что в норме канал Kv1.3 экспрессируется в различных тканях и

типах клеток: в мозге, тимусе, селезенке, лимфатических узлах, фибробластах, В- и Т-лимфоцитах, миндалинах, макрофагах, микроглии, олигодендроцитах, остеокластах, тромбоцитах, печени, скелетной мускулатуре, белой и коричневой жировой ткани [14]. При трансформации тканей в опухолевые экспрессия Kv1-каналов в клетках меняется.

Данные об экспрессии канала Kv1.3 в здоровых и опухолевых клетках молочной железы разнятся. Методом иммуноокрашивания не обнаружено наличия канала Kv1.3 в образцах нормальных клеток груди, но наблюдается повышенное окрашивание в образцах раковых клеток [75]. Другими исследователями, напротив, показана сниженная экспрессия канала Kv1.3 в опухолевых тканях груди по сравнению с нормальными тканями [76, 63]. В одной из работ отмечается положительная корреляция между уровнем экспрессии Kv1.3 и стадией развития опухоли [77]. Для линии рака груди MCF-7 характерно наличие канала Kv1.3 в мембранах митохондрий [78], но не в цитоплазме [79].

Отмечена экспрессия канала Kv1.3 в линии меланомы LOX. Показано, что за счет ассоциации  $\beta$ 1-субъединицы с макромолекулярными комплексами интегринов, каналы Kv1.3 могут регулировать поведение клеток LOX [80]. Селективные проникающие через мембрану лиганды канала Kv1.3 способны подавлять развитие меланомы B16F10 *in vivo* (предположительно, через индукцию апоптоза, см. ниже) [81].

Экспрессия канала Kv1.3 понижена в опухолевых клетках аденокарциномы поджелудочной железы по сравнению с нормальными клетками. Исследованные образцы аденокарциномы содержали повышенный уровень метилирования промотера гена Kv1.3, причем метилирование промотера было ассоциировано с малодифференцированным типом опухоли и чаще встречалось у молодых пациентов [82]. Наличие канала Kv1.3 выявлено в линии клеток легочной аденокарциномы A549. Использование селективного

лиганда маргатоксина (MgTx) и малых некодирующих РНК (shRNA) против Kv1.3 подавляло пролиферацию клеток A549 и развитие опухоли на животной модели [83].

В клетках рака простаты канал Kv1.3 активно экспрессируется на ранней стадии развития опухоли и подвергается супрессии на более поздних этапах [84].

В составе гетеротетрамеров с другими  $\alpha$ -субъединицами Kv1.3 был отмечен в образцах рака толстой кишки человека [85]. Методом иммуноокрашивания установлено, что максимальный уровень экспрессии канала наблюдается на средней стадии развития данного типа опухоли по сравнению с более ранней и поздней стадиями [86].

Функциональная экспрессия в опухолях показана также для каналов Kv1.1 и Kv1.5. В линии рака груди MCF-7 в цитоплазме выявлено наличие канала Kv1.1, при этом близкородственных каналов Kv1.2 и Kv1.3 не обнаружено. Селективные лиганды Kv1.1 подавляют пролиферацию клеток MCF-7 [79]. Другие данные свидетельствуют о сниженной экспрессии канала Kv1.1 в образцах рака груди по сравнению с нормальными клетками [87]. Экспрессия канала Kv1.5, доминирующего канала в скелетной мускулатуре, повышена в некоторых типах человеческих сарком [88]. При этом обнаружена корреляция между степенью злокачественности опухоли и уровнем экспрессии Kv1.5, чего не наблюдается для канала Kv1.3, который также экспрессируется в этих типах опухолей. Показано наличие канала Kv1.5 в нескольких разновидностях человеческой глиомы [89]. Наконец, интересные результаты были получены для канала Kv1.5 совсем недавно. Методом иммуноцитохимии сравнили уровень экспрессии каналов Kv1.3 и Kv1.5 на обширной линейке образцов опухолевых и нормальных тканей пациентов. Обнаружено, что в большинстве случаев, уровень экспрессии канала Kv1.5 повышается в опухолевых клетках, в то время, как экспрессия Kv1.3 не меняется или подвергается супрессии [63].

Полученные данные во многом противоречивы, но они свидетельствуют об активном участии каналов Kv1 в процессах опухолеобразования. Вполне вероятно, что расхождение результатов может быть объяснено тем, что в зависимости от типа клеток имеют место один из двух альтернативных вариантов: 1) повышенная экспрессия канала Kv1 дает преимущество в пролиферации опухолевым клеткам; 2) подавление экспрессии канала вызывает устойчивость к апоптозу, которая также способствует прогрессированию опухолей [1]. Следует обратить внимание на то, что активная экспрессия канала важна на ранних стадиях развития опухолей, когда идет быстрая пролиферация клеток, в то время как устойчивость к апоптозу, вызываемая подавлением экспрессии канала (равно как и множеством других факторов), особенно актуальна на более поздних этапах. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят более детально установить конкретные механизмы вовлечения каналов в процессы опухолеобразования для каждого типа клеток.

**1.2.5. Участие в апоптозе.** Изначально предположение об участии калиевых каналов в апоптозе возникло на почве свидетельств о вовлечении каналов Kv1 в регуляцию клеточного цикла. Известно, что апоптоз довольно часто развивается параллельно с отклонениями пролиферации и дифференциации клеточного цикла. Пролиферация клеток приводит к увеличению клеточного объема, в то время как одним из распространенных признаков апоптоза является уменьшение объема клетки и снижение внутриклеточной концентрации ионов калия [1]. Уменьшение объема клеток, взаимосвязанное с утечкой ионов калия, первоначальное звено таких событий апоптоза, как деполяризация митохондрий, выход цитохрома c из митохондрий, образование апоптосомного комплекса и фрагментация клетки [90]. Снижение внутриклеточной концентрации калия само по себе способствует протеолитическому расщеплению прокаспазы-3 и увеличивает эндонуклеазную активность [91].

В целом роль калиевых каналов в регуляции апоптоза стала очевидной в течение последнего десятилетия. Активация калиевых каналов представляется необходимой для развития процесса уменьшения объема клеток на относительно поздней стадии апоптоза, до изменений в митохондриях и фрагментации ДНК [1]. Тем не менее, остается неразрешенным ряд противоречивых фактов. Так, в некоторых клеточных линиях ингибирование калиевых каналов, вопреки схеме описанной выше, способствует развитию клеток по сценарию апоптоза [92]. Показана также способность клеток ингибировать апоптоз при активации калиевых каналов [93].

Исследования роли Kv1-каналов в индукции апоптоза были начаты на лимфоцитах [94]. Активация канала Kv1.3 в лимфоцитах способствует увеличению выхода ионов калия из клетки, имеющему место на поздней стадии апоптоза [80, 81, 82]. Недостаток репрессии гена Kv1.3 в лимфоцитах вызывает устойчивость к апоптозу [83, 84].

Что касается других каналов семейства Kv1, то было зафиксировано повышение экспрессии канала Kv1.1 в апоптотических гранулярных нейронах мозжечка, при этом нокдаун Kv1.1 при помощи малых интерферирующих РНК (siRNA) позволял существенно увеличить их выживаемость [Hu, 2008]. Клетки ганглия сетчатки крыс экспрессируют каналы Kv1.1, Kv1.2 и Kv1.3; нокдаун при помощи siRNA против каналов Kv1.1 или Kv1.3 значительно снижал гибель этих клеток, в то время применение siRNA против Kv1.2 имело лишь незначительный эффект [99]. Напротив, повышенная экспрессия канала Kv1.1 в культуре нейронов гиппокампа повышает выживаемость клеток при апоптозе, индуцированном различными стимулами [100].

При легочной артериальной гипертензии подавление экспрессии гена Kv1.5 замедляет апоптоз [101]. Транзientная трансфекция гена белка Kv1.5 в гладкомышечных клетках легочной артерии крысы (PASMC) и в фибробластах почки обезьяны (COS-7) увеличивает ток калия, ускоряет потерю клеточного

объема, увеличивает активность каспазы-3 и индуцирует апоптоз [49]. Индукция апоптоза в гладкомышечных клетках легочной артерии при трансфекции гена белка Kv1.5 может служить стратегией против прогрессирующего утолщения стенок сосудов легких и для лечения пациентов с идиопатической формой легочной артериальной гипертензии.

Интересно, что канал Kv1.5 активируется активными формами кислорода (АФК) митохондрий [102], а связка митохондриальные АФК-Kv1.5 была заявлена как сенсор O<sub>2</sub> [103]. В другом физиологическом контексте ранее было показано, что АФК ингибирует ПЧКК, в том числе Kv1.5 [104].

**1.2.6. Митохондриальная локализация каналов и апоптоз.** Неожиданным открытием последних лет явилось обнаружение каналов Kv1.3 во внутренней мембране митохондрий лимфоцитов (клетки линии Jurkat) [105]. Совсем недавно было установлено, что митохондриальной локализацией обладают также каналы Kv1.1 и Kv1.5 в макрофагах [81].

При физиологических условиях, когда каналы открыты, поступление положительного заряда внутрь митохондрий компенсируется выбросом протонов через дыхательную цепь. Изменения в объеме, ожидаемые в состоянии покоя при поступлении калия, компенсируются в свою очередь K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> антипортером, выравнивающим баланс калия. При ингибировании работы канала должна развиваться гиперполяризация внутренней мембраны митохондрии. Специфическое ингибирование митоKv1.3 блокаторами MgTx и ShK действительно вызывало гиперполяризацию [1]. Это подтверждает тот факт, что каналы функционируют и открыты при потенциале покоя митохондрий -180 мВ. Активность канала Kv1.3, измеренная от -60 до +60 мВ (прямые измерения методом patch-clamp при -180 мВ невозможны) имела все признаки нормально функционирующего канала цитоплазматической локализации.

Интересно, что, помимо лимфоцитов, митохондриальное расположение каналов Kv1.3 было подтверждено и для других типов клеток: гиппокампа [106], линии остеосаркомы человека SAOS-2 и мышечной меланомы B16F10 [81], линии рака простаты PC3 и линии рака груди MCF-7 [78], астроцитов [107] и макрофагов J774 [81]. Механизмы, ответственные за двойную локализацию каналов, а также регуляторный фактор, способствующий их работе при столь отрицательном мембранном потенциале до конца не выяснены [1].

Обнаружение митохондриальных каналов Kv1.3 повлекло за собой всплеск исследований их участия в развитии апоптоза. Было обнаружено, что нокаут каналов Kv1.3 в лимфоцитах периферальной крови или их дефицит в цитотоксичных Т-лимфоцитах (CTLL-2) останавливает апоптоз, вызванный различными стимулами, но направленной экспрессии канала в митохондриях достаточно для его восстановления [1]. Был предложен механизм вовлечения митоKv1.3 в апоптоз при участии белка Bax (рис. 7).

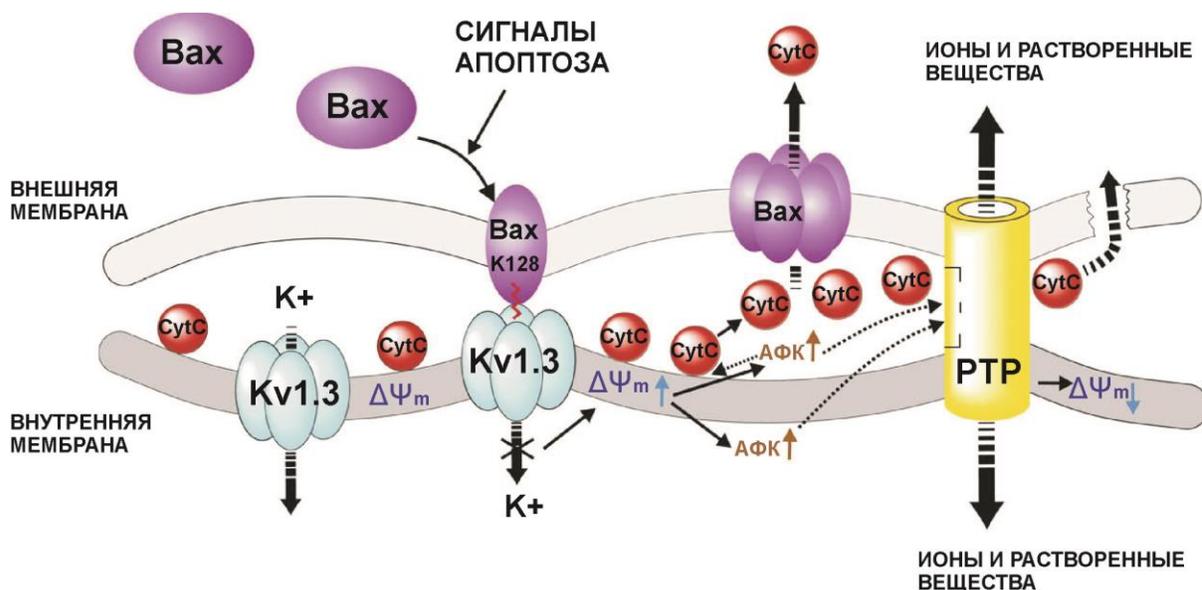


Рис.7. Предполагаемый механизм вовлечения митоKv1.3 в апоптоз при участии белка Bax (по [1]). В состоянии покоя канал Kv1.3 открыт, калий поступает в

матрикс митохондрий. При апоптозе белок Вах, встраиваясь в наружную мембрану митохондрий в виде мономера, ингибирует Kv1.3 (Lys128 взаимодействует с поровым отверстием канала). В результате ток калия останавливается, развивается гиперполяризации внутренней митохондриальной мембраны. Гиперполяризация, конкурируя с дыханием, запускает продукцию АФК, которые в свою очередь, путем окисления липидов, способствует высвобождению цитохрома с из межмембранного пространства в цитозоль; параллельно может осуществляться выход цитохрома с по классической схеме через поры, образованные путем олигомеризации Вах в наружной мембране. Активация транзиентных пор (permeability transition pore, PTP) может быть также спровоцирована окислением остатков цистеина АФК. Открытие PTP приводит к деполяризации мембраны до 0 мВ, разрыву наружной мембраны и окончательному высвобождению цитохрома с в цитозоль.

Инкубирование изолированных митохондрий, содержащих Kv1.3 с Вах или с блокаторами Kv1.3 (MgTx, ShK, Psora-4) вызывало такие типичные события апоптоза, как изменения мембранного потенциала, образования АФК, высвобождение цитохрома с [98]. В митохондриях, лишенных Kv1.3, подобных эффектов не наблюдалось. Белок Вах с мутацией в лизине (ВахK128E), ключевой аминокислоте, которая, как предполагалось, ответственна за взаимодействие с поровой частью канала, не вызывал ингибирование Kv1.3 и сопутствующих про-апоптотических эффектов как в изолированных митохондриях, так и в интактных клетках, экспрессирующих мутантный белок [108]. Полученные результаты подтвердили, что белок Вах связывается с каналом Kv1.3 в митохондриях и запускает апоптоз.

Позднее было показано, что митоKv1.3 может запускать апоптоз и Вах-независимым образом [81]. Интересно это с той точки зрения, что довольно часто опухоли лишены белков Вах/Вак [109]. Существует серьезная проблема

лечения таких опухолей, поскольку довольно большой класс химиопрепаратов, действующих через эти белки, оказывается непригодным (этопозид, цисплатин, адриамицин и др.). Новые мишени, активация которых запускает внутренние пути апоптоза независимым от Вах/Вак образом, вызывают большой интерес. Получены первые обнадеживающие результаты о том, что ингибитор канала Kv1.3 клофазимин эффективно подавляет *in vivo* рост пересаженной мышам меланомы [81].

Причина двойной локализации (митохондриальной и цитоплазматической) Kv1-каналов не известна, но существует ряд предположений. Каналы могут попадать в митохондрии из липидных рафтов или кальвеол плазматической мембраны [1]. Белковый трафик из кальвеол в ЭПР и аппарат Гольджи уже идентифицирован, а далее в митохондрии мембранные белки могут быть транспортированы через контактные сайты митохондрий с ЭПР. Возможны и другие пути, например, незначительные изменения в трансмембранном домене вирусного калиевого канала достаточно для переключения его локализации между митохондрией и плазматической мембраны [110]. Наконец, не смотря на то, что для Kv1-каналов не выявлено наличия классических N-концевых участков, определяющих транслокацию, они могут нести какие-то новые еще не изученные сигнальные последовательности [1].

**1.2.7. Ассоциированные заболевания.** Вовлечение каналов Kv1 в пролонгацию клеточного цикла и участие в апоптозе позволяет рассматривать их как важную составляющую процесса развития злокачественных новообразований. Помимо опухолей каналы ассоциированы с целым рядом аутоиммунных, метаболических и нейрофизиологических заболеваний. В настоящее время пристальное внимание приковано к каналам Kv1 как к новой мишени лечения этих отклонений. Остановимся более подробно на рассмотрении заболеваний,

ассоциированных с каналами Kv1 и фармакологическом потенциале модуляторов этих каналов.

**1.2.7.1. Аутоиммунные заболевания.** Отличительной особенностью канала Kv1.3 является его представленность в клетках иммунной системы. Два основных типа калиевых каналов экспрессируются в Т-лимфоцитах человека: ПЧКК Kv1.3 и кальций-активируемый калиевый канал KCa3.1. Оба типа каналов принимают участие в регулировании мембранного потенциала и кальциевой сигнализации при активации Т-лимфоцитов. Активация Т-лимфоцитов зависит от тока кальция внутрь клетки, которая возможно только в случае если сохраняется отрицательный потенциал на мембране благодаря уравновешивающему выходящему току калия через каналы Kv1.3 и/или KCa3.1. Канал Kv1.3 также присутствует в В-лимфоцитах, которые продуцируют аутоиммунные антитела [111]. Функционирование канала Kv1.3 в В-лимфоцитах необходимое условие их активации.

Интересно, что экспрессия каналов Kv1.3 и KCa3.1 отличается в разных типах клеток иммунной системы. В состоянии покоя экспрессия каналов Kv1.3 (250 копий на клетку) и KCa3.1 (5-35 копий на клетку) одинакова для недифференцированных Т-клеток, центральных (ТСМ) и эффекторных (ТЕМ) клеток памяти [2]. При активации недифференцированных и центральных клеток памяти, число каналов KCa3.1 возрастает до ~ 500 копий на клетку, при этом экспрессия канала Kv1.3 существенно не меняется [112]. И, напротив, при активации эффекторных клеток памяти, существенно увеличивается число каналов Kv1.3 (~ 1500-2000 копий на клетку), а экспрессия канала KCa3.1 остается неизменной [112].

Таким образом, Kv1.3 – это определяющий канал в эффекторных клетках памяти. Эффекторные клетки памяти – это особая популяция клеток памяти, отличающаяся отсутствием рецептора хемокинов CCR7 и рядом других

особенностей. Важно, что именно эта популяция клеток принимает участие в патогенезе таких аутоиммунных заболеваний как, рассеянный склероз, диабет 1 типа, ревматоидный артрит и псориаз [1, 99]. Популяция эффекторных клеток памяти с высоким уровнем экспрессии канала Kv1.3 была обнаружена у больных с рассеянным склерозом (аутореактивные Т-лимфоциты против антигенов миелина), пациентов с диабетом 1 типа (аутореактивные Т-лимфоциты против антигенов инсулинпродуцирующих клеток), больных с ревматоидным артритом (Т-лимфоциты из синовиальной жидкости), а также при выделении Т-лимфоцитов посмертно фильтрацией из участков мозга больных рассеянным склерозом [98, 99, 100].

Блокирование работы канала Kv1.3 могло бы явиться привлекательной мишенью для создания лекарств против аутоиммунных заболеваний с отсутствием побочного эффекта на недифференцированных Т-лимфоцитах и центральных клетках памяти, которые сохраняют способность защищать организм от иммуногенных угроз.

Наличие каналов Kv1.3 в мембране Т-лимфоцитов было открыто в 1984 году [114]. Тогда же было показано, что неспецифический блокатор калиевых каналов 4-АП ингибирует пролиферацию Т-лимфоцитов и секрецию цитокина IL-2 [115]. Исследователи из компании Merck позднее подтвердили эти факты с использованием более селективного блокатора канала Kv1.3 MgTx. Были получены первые свидетельства того, блокирование канала Kv1.3 *in vivo* действительно вызывает подавление иммунного ответа: продолжительное введение MgTx купировало замедленную гиперчувствительность у мини-свиней [116].

Блокаторы канала Kv1.3 вызывают эффект иммуносупрессии путем деполяризации мембраны Т-лимфоцитов [117]. При деполяризации снижается движущая сила для входа кальция в клетку через кальциевые каналы CRAC (calcium-release activated channel). Поскольку Т-лимфоциты клетки небольшого

размера и не имеют существенного запаса кальция во внутренних депо, вход кальция через CRAC совершенно необходимое условие для транслокации фактора активации лимфоцитов NFAT (nuclear factor of activated T cells) в ядро и последующей секреции цитокинов и пролиферации Т-лимфоцитов [2].

Новая волна интереса к каналу Kv1.3 связана с обнаружением того факта, что блокаторы канала вызывают ингибирование кальциевой сигнализации, пролиферации и миграции *in vivo* эффекторных клеток памяти [98, 99, 105]. Блокаторы канала Kv1.3, таким образом, стали рассматривать как специфические иммуномодуляторы, а не просто иммуносупрессоры.

Возможность иммуномодулирования посредством блокирования канала Kv1.3 в эффекторных клетках памяти стимулировала интерес к поиску новых блокаторов Kv1.3 канала среди низкомолекулярных соединений и пептидов природного происхождения (см. п. 1.3 литобзора). После того, как было продемонстрировано, что токсин анемонов ShK эффективно подавляет симптомы и препятствует развитию экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у крыс (общепринятой биологической модели рассеянного склероза) [119], группа исследователей под руководством Джорджа Кэнди (Georgr Candy) разработала несколько новых производных ShK с улучшенными характеристиками [120]. Пептид ShK-186 стал первым Kv1-блокатором, допущенным в 2012 г. до стадии клинических испытаний в качестве препарата против рассеянного склероза (компания Kineta) [<http://www.kinetabio.com/autoimmune.html>]. К концу марта 2013 с успехом была закончена 1 фаза клинических испытаний ShK-186. Низкомолекулярное соединение PAP-1 было допущено до стадии пре-клинических испытаний [121]. Многие другие блокаторы Kv1.3 также показали свою эффективность лечения аутоиммунных отклонений в экспериментах *in vitro* и/или на модельных животных *in vivo*: OSK1 [122], харибдотоксин (ChTx) [123], MgTx [103, 111], калиотоксин (КТХ) [125] и др.

Компания Amgen Inc. с целью повысить эффективность лечебного действия сделала упор на пролонгирование времени циркуляции блокаторов внутри организма. На примере пептида OSK1 и производных пептида ShK была предложена методика конъюгирования пептидных блокаторов с Fc-фрагментами антител или полиэтиленгликолем [126].

Примечательно, что наблюдаемые положительные эффекты при лечении аутоиммунных заболеваний не сопровождается нарушениями работы иммунной системы в целом, поскольку мишенью действия блокатора является только узкая субпопуляция Т-клеток, экспрессирующих канал Kv1.3.

**1.2.7.2. Нейрофизиологические отклонения.** Каналы семейства Kv1 широко представлены в центральной и периферической нервной системе. Важная роль каналов Kv1.1 и Kv1.2 в контроле нервной возбудимости подтверждается тем фактом, что блокаторы канала, такие как DTX, способны вызывать судороги у грызунов [127]. Позже было показано, что для Kv1.1 (-/-) и Kv1.2 (-/-) трансгенных мышей также характерны спонтанные судороги и изменения в ЦНС [33, 115, 116]. У человека несколько мутаций канала Kv1.1 ассоциировано с судорогами, эпизодической атаксией и миокемией [42].

Исследования начала 90-х годов выявили, что канал Kv1.5 – определяющий молекулярный компонент калиевого тока задержанного выпрямления, *I<sub>Kur</sub>* [130]. *I<sub>Kur</sub>* – особый калиевый ток предсердий человека, который играет важную роль на начальной фазе реполяризации потенциала мембраны клеток предсердий [131]. Специфика действия и узкая локализация делают канал Kv1.5 привлекательной мишенью безопасного препарата для лечения аритмий предсердий, особенно фибрилляций. Однако поиски подходящего кандидата на роль лекарства осложняются тем, что степень вовлечения канала Kv1.5 в ток *I<sub>Kur</sub>* у человека отлична от мышей, крыс, кроликов или собак, поэтому тестирование блокаторов на этих видах животных

невозможно [2]. Несмотря на перечисленные трудности, многие фармацевтические компании предпринимали попытки создания ингибиторов Kv1.5 для лечения фибрилляций предсердий. Некоторые препараты прошли стадию преклинических испытаний, а одно из соединений, варнакалант, полностью завершило все стадии клинических испытаний и выпускается в виде коммерческого препарата [132].

**1.2.7.3. Астма.** Каналы Kv1.3 и KCa3.1 рассматривают как мишень для лечения астмы. Блокаторы каналов замедляют развитие патологических процессов, ассоциированных с астмой, сразу в нескольких типах клеток (лимфоцитах, фибробластах, тучных клетках и клетках эпителия) [133]. Однако, эффективность использования блокаторов для комплексного лечения астмы у человека пока не исследована.

**1.2.7.4. Заболевания пародонта.** Заболевания пародонта – это распространенный тип воспалительных процессов, приводящих к необратимой резорбции костной ткани альвеолярного отростка и последующей потере зубов. Заболевания пародонта начинаются как смешанные бактериальные инфекции с участием различных штаммов грамотрицательных бактерий в деснах. Мембранный белок T-лимфоцитов, цитокин RANKL, является ключевым фактором дифференцировки и активации остеокластов, ответственных за резорбцию костной ткани. Установлено, что блокада функции RANKL, предотвращает резорбцию костной ткани пародонта. Разработка средств терапии, направленных на снижение экспрессии белка RANKL является перспективной стратегией для улучшения не только резорбции костной ткани, но и снижения воспаления. Показано, что калиевые каналы, Kv1.3 и KCa1 играют важную роль в T-клеточной пролиферации и продукции провоспалительных цитокинов. Блокаторы канала Kv1.3 подавляют экспрессию

RANKL в активированных Т-клетках памяти, что в свою очередь снижает побочные эффекты иммунологических заболеваний и предотвращает воспалительную резорбцию кости при заболеваниях пародонта [134].

**1.2.8. Функции в метаболизме.** Исследование, проведенное в 2003 году на нокаутных мышах, выявило прежде неизвестную роль канала Kv1.3 в регуляции веса тела [135]. Действительно, вес тела Kv1.3 (-/-) мышей оказался значительно меньше, чем у контрольных однопометных животных. Кроме того, нокаутные мыши были защищены от ожирения: при помещении на рацион с высоким содержанием жира они набирали меньше веса. В то время как интенсивность потребления пищи существенно не отличалась, интенсивность основного обмена, измеренная непрямой калориметрией, у нокаутных мышей была значительно выше, чем у контрольных животных. При этом маловероятно, что уменьшение веса тела могло быть объяснено неспецифичным действием генного нокаута, поскольку мыши были не отличимыми от контрольных однопометных животных своим поведением и имели одинаковую продолжительность жизни. Удивителен также тот факт, что мыши сохранили функционирующую иммунную систему и никаких дефектов в пролиферации клеток или апоптозе. Нормальная работа клеток, лишенных каналов Kv1.3, по-видимому, достигается путем компенсированного увеличения хлорных каналов (в 50 раз). Полученные данные свидетельствуют, что каналы Kv1.3 могут входить в метаболические пути регулирования веса тела, предположительно увеличивая термогенезис, а ингибиторы каналов способны увеличивать интенсивность основного обмена, препятствуя ожирению, и не сказываясь на работе иммунной системы [135].

Дальнейшие исследования на нокаутных мышах выявили новую информацию о роли канала Kv1.3 в метаболических процессах организма. Так, было обнаружено, что острое ингибирование (2 ч) активности каналов Kv1.3 у

мышей дикого типа и мышей, страдающих от ожирения и диабета, увеличивает чувствительность к инсулину вне зависимости от веса тела. Уровень накопления глюкозы у Kv1.3 (-/-) мышей в жировой ткани и скелетной мускулатуре увеличен по сравнению с контрольными мышцами того же веса. Ингибирование активности Kv1.3 у мышей дикого типа подавляет активность JNK-киназы, снижает секрецию цитокинов IL-6 и TNF- $\alpha$  и способствует транслокации глюкозного транспортера GLUT4 в плазматическую мембрану [125, 126]. Новые результаты позволяют рассматривать Kv1.3 как фармакологическую мишень для лечения диабета.

**1.3. Модуляторы каналов семейства Kv1.** Модуляторы калиевых каналов семейства Kv1 можно разбить на две категории: небольшого размера органические молекулы и пептидные лиганды, выделенные из ядов животных. Остановимся более подробно на характеристике и тех и других.

**1.3.1. Пептидные лиганды ядов.** Токсины, способные связываться с ПЧКК были обнаружены в ядах хищных морских улиток-конусов, змей, пауков, морских анемонов и скорпионов [138]. Они содержат от 18 до 60 аминокислотных остатков и образуют от двух до четырех дисульфидных связей, формирующих компактную глобулу белка, устойчивую к денатурации. Пептидные токсины могут иметь различные варианты укладки, включающие  $\alpha$ -спирали (токсины актиний),  $\beta$ -складчатые слои (токсины морских улиток-конусов) или комбинацию обоих типов структур (токсины скорпионов и змей).

Все выделенные пептидные токсины каналов семейства Kv1 ингибируют работу каналов по типу поровых блокаторов, т.е. путем физического преграждения поры канала [9]. Сложилась концепция “функциональной диады”, объясняющая аффинность лигандов присутствием в их составе ключевой детерминанты из изученной пары положительно-заряженных и гидрофобных

аминокислотных остатков [139]. Такие диады были идентифицированы в токсинах различного происхождения и в не зависимости от того, как белок свернут [140]. При связывании с каналом положительно-заряженный аминокислотный остаток, как правило, лизин, располагается в поре, а гидрофобный остаток (ароматический или алифатический) взаимодействуют с обрамляющим пору кластером ароматических аминокислот. В настоящее время все больше фактов свидетельствует в пользу мультиточечной схемы взаимодействия, которая предполагает, что помимо функциональной диады, другие детерминанты также необходимы для высокоаффинного контакта токсина с каналами Kv1.

**1.3.1.1. Токсины морских улиток.** Конусы (сем. *Conidae*) – это группа хищных брюхоногих моллюсков, которые парализуют своих жертв с помощью яда. В улитках-конусах было найдено более 50 различных пептидов, имеющих разнообразные молекулярные мишени. Среди мишеней выявлены рецепторы, ассоциированные с G-белками, транспортеры нейротрансмиттеров, ферменты. Но наиболее охарактеризованными являются пептиды-лиганды ионных каналов. Лиганды семейства Kv1 были обнаружены в группе kM-конотоксинов (например, RPK, слабо активный лиганд Kv1.2 [141]) и в группе I-конотоксинов (например, ViTx, слабо активный лиганд Kv1.1 и Kv1.3 [142]). Токсины улиток-конусов (конотоксины) отличаются особенностями химического строения, поскольку могут включать D-аминокислотные остатки и целый ряд пост-трансляционных модификаций [143]. Методами ядерного магнитного резонанса (ЯМР) показано, что большинство конотоксинов в растворе принимают вид  $\beta$ -гофрированных листов и связываются с помощью архитектурного мотива, получившего название “цистеиновый узел” (“inhibitor cystine knot”) [138].

**1.3.1.2. Токсины ядов змей.** Наиболее опасные группы змей – это семейство *Viperidae* (гадюки и ямкоголовые) и семейство *Elapidae* (кобры, крайты и коралловые аспиды). Яды этих змей представляют собой сложные многокомпонентные смеси, включающие множество биологически активных соединений. В состав ядов могут входить органические молекулы (например, пурины), ферменты (фосфолипазы, ингибиторы фосфолипаз, сериновые протеазы), полипептидные токсины с анти-коагулятивными, гемолитическими и гипотензивными свойствами, лиганды рецепторов и ионных каналов. Блокаторы ПЧКК среди общего разнообразия токсинов встречаются не часто. Токсины Kv1 каналов, найденные в ядах змей мамба (род *Dendroaspis*), получили название дендротоксинов. Это пептиды, длиной 57-60 аминокислот, содержащие 3 дисульфидные связи. Они обладают пико- и нано-молярной активностью в отношении каналов Kv1.1, Kv1.2 и Kv1.6 [138]. Недавно было показано, что представитель белкового семейства CRISP белок натрин из яда кобры (*Naja naja atra*), традиционно рассматриваемый как блокатор кальциевых каналов, также является слабым ингибитором Kv1.3 канала. Установлено, что за связывание с каналом ответственен цистеин-обогащенный домен этого белка (CRD) [144].

**1.3.1.3. Токсины пауков.** Состав ядов пауков отличается разнообразием компонентов и включает в себя неорганические соли, полиамины и их производные, нуклеиновые кислоты, свободные аминокислоты, пептиды, белки. Яды пауков – источники высокоспецифических веществ, действующих на различные системы мембранного транспорта – ионные каналы, ионотропные рецепторы и др. [145]. В ядах пауков обнаружены блокаторы представителей семейств ПЧКК Kv2 и Kv4. Интересно, что большинство из них обладает аффинностью не к поровой части канала, а к потенциал-чувствительному домену. Среди таких токсинов можно отметить пептиды ханатоксины 1-2

(NaTx1, NaTx2), селективно связывающие канал Kv2.1, гетероподатоксины 1-3 (HrTx2), фриксотоксины 1-2 (PaTx), воздействующие на каналы Kv4, строматоксин 1 (ScTx1), блокатор Kv2.2 и Kv4.2, гетероскодратоксины 1-2 (HmTx1, HmTx2) [138]. Все эти пептиды обладают длиной 25-40 аминокислот. Информация о лигандах каналов семейства Kv1, выделенных из ядов пауков, отсутствует.

**1.3.1.4. Токсины актиний.** Актинии, или морские анемоны (отр. *Actiniaria*), – отряд морских стрекающих животных из класса коралловых полипов. Токсины актиний содержатся в специальных стрекательных клетках, книдоцитах, которые животные используют для охоты на добычу и защиты от врагов. Книдоциты содержат очень небольшой объём яда, но он чрезвычайно сильный. В состав яда входят нейротрансмиттеры, ингибиторы протеаз, фосфолипазы, цитолизины, нейротоксины-модуляторы ионных каналов, преимущественно натриевых. В актиниях были обнаружены одни из самых эффективных лигандов каналов группы Kv1: пептиды ShK [146] и BgK [147]. Опубликован также ряд токсинов, обладающих активностью в отношении ПЧКК (HmK, AeK, AsKS и др.), точная мишень которых пока не установлена [138]. Структурная организация токсинов актиний представляет собой смесь  $\alpha$ -спиралей и/или  $3_{10}$  – спиралей.

**1.3.1.5. Токсины скорпионов.** Скорпионы (лат. *Scorpiones*) — отряд членистоногих из класса паукообразных, насчитывающий около 1500 видов. Наиболее ядовитыми таксономическими группами являются сем. *Buthidae* (773 вида) и сем. *Chactidae* (152 вида). Яд скорпионов содержит множество токсичных и нетоксичных компонентов, таких как модуляторы ионных каналов (натриевых, калиевых, кальциевых и хлорных), ферменты (фосфолипаза A2, кислая фосфатаза, рибонуклеаза, ацетохолинэстераза и др.), биогенные амины,

различные соли, мукопротеины, нуклеотиды, липиды, гликозаминогликаны, гистамин, серотонин и пр. Блокаторы калиевых каналов содержат от 25 до 45 аминокислотных остатков и от 3 до 4 дисульфидных связей. В зависимости от мишени действия выделяют три группы калиевых токсинов:  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -КТх. Блокаторы каналов семейства Kv1 принадлежат к самой многочисленной группе  $\alpha$ -КТх (табл. 2). В структурном отношении токсины этой группы представляют собой короткие участки  $\alpha$ -спирали, соединенные с двумя или тремя анти-параллельными  $\beta$ -складчатыми слоями [138]. Подобная структура – является универсальным каркасом многих пептидов с различными функциями, включая некоторые антимикробные пептиды, например, дефензины беспозвоночных и растений, подластитель бразеин, сериновые протеазы из рапса.

Табл. 2. Некоторые представители группы  $\alpha$ -КТх скорпионов [138].

Семейство		Токсин	Вид*	Мишень действия
$\alpha 1$	1.1	ChTX	Lqh	Kv1.3, Kv1.2, K <sub>Ca</sub> 3.1, K <sub>Ca</sub> 1.1, Kv1.6, Shaker
	1.2	Lq2	Lqh	Kv
	1.3	IbTX	Bt	K <sub>Ca</sub> 1.1
$\alpha 2$	2.1	NTX	Cn	Kv1.3, Kv1.1, Kv1.7
$\alpha 2$	2.2	MgTX	Cm	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6, Kv1.7, K <sub>Ca</sub> 3.1
	2.5	HgTx1	Cl	Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.6
$\alpha 3$	3.1	KTX	Am	Kv1.3, Kv1.1, Kv1.2
	3.2	AgTX2	Lqh	Kv1.3, Kv1.6, Kv1.1, Shaker
	3.6	BmKTX	Bm	Kv1.3

	3.7	OSK1	Os	Kv1.3, Kv1.1, Kv1.2 (K <sub>Ca</sub> 3.1)
α4	4.2	Tsk	Ts	K <sub>Ca</sub> 2
α5	5.1	LTX	Lqh	K <sub>Ca</sub> 2.2, K <sub>Ca</sub> 2.3
	5.2	P05	Am	K <sub>Ca</sub> 2.2, K <sub>Ca</sub> 2.3
α6	6.1	Pi1	Pi	Kv1.2, K <sub>Ca</sub> 2.2
	6.2	MTX	Sm	Kv1.2, K <sub>Ca</sub> 3.1, K <sub>Ca</sub> 2 (Kv1.3)
	6.3	HsTx1	Hs	Kv1.3, Kv1.1 (K <sub>Ca</sub> 3.1)
	6.4	Pi4	Pi	Kv1.2, Shaker (SK)
α7	7.1	Pi2	Pi	Kv1.2, Kv1.3, Kv1.1
α8	8.1	P01	Am	K <sub>Ca</sub> 2.3 (K <sub>Ca</sub> 2.1, K <sub>Ca</sub> 2.2)
	8.6	MeuTXKα-1	Be	Kv1.3
α9	9.1	BmP02	Bm	(K <sub>Ca</sub> 2)
α10	10.1	CoTX1	Cn	Kv1.2 (Shaker)
α11	11.1	PBTX1	Psp	(Kv1.3, Kv1.2)
α12	12.1	BuTX	Ts	K <sub>Ca</sub> 3.1 (Kv1.2)
α13	13.1	Tc1	Tc	Shaker
α14	14.1	BmKK1	Bm	не установлено
α15	15.1	Aa1	Aa	не установлено
α16	16.1	TmTX	Bt	не установлено
α17	17.1	BmKK4	Bm	не установлено
α18	18.1	Tc32	Tc	Kv1.3 ( <i>Shaker</i> )
α19	19.1	BmBKTX1	Bm	Insect K <sub>Ca</sub> 1.1

\* Lqh, *Leiurus quinquestriatus hebraeus*; Cm, *Centruroides margaritatus*; Cl, *Centruroides limbatus*; Am, *Androctonus mauretanicus*; Os, *Orthochirus*

*scrobiculosus*; Ts, *Tityus serrulatus*; Pi, *Pandinus imperator*; Sm, *Scorpio maurus*; Hs, *Heterometrus spinnifer*; Bm, *Mesobuthus martensii*; Be, *Mesobuthus eupeus*; Cn, *Centruroides noxius*; Psp, *Parabuthus species*; Tc, *Tityus cambridgei*; Aa, *Androctonus australis*; Bt, *Mesobuthus tamulus*.

Как и большинство природных блокаторов, токсины, выделенные из ядов скорпионов, проявляют высокую активность в отношении канала Kv1.3 и с разной эффективностью связываются с другими каналами семейства Kv1. К примеру, AgTx2, OSK1, NTX и KTX связываются с Kv1.3 с пикомолярной аффинностью, а их аффинность к каналу Kv1.1 всего лишь в 2,6-110 раз меньше [148]. Другие пептиды, такие как HsTx1, Mokatoxin-1, ChTx, обладают более высокой селективностью в отношении канала Kv1.3 по сравнению с каналом Kv1.1, но активны на других близкородственных каналах, в т.ч. Kv1.2 [138].

Селективность токсинов может быть усилена за счет введения точечных мутаций. Например, если у синтетического аналога OSK1 заменить аминокислоты, которые консервативны для большинства представителей группы  $\alpha$ -КТх-3, но отсутствуют у природного OSK1 (Glu16  $\rightarrow$  Lys16 и Lys20  $\rightarrow$  Asp20), то он проявит почти в 5 раз большую селективность по отношению к каналу Kv1.3 [122]. Ключевой аминокислотой С-концевого участка большинства токсинов группы  $\alpha$ -КТх-3 является замыкающий Lys38. Удаление С-концевого участка у OSK1 приводит к полной потере активности в отношении каналов Kv1.1-Kv1.3 [149].

Замечено, что высокоаффинные токсины канала Kv1.3 склонны иметь высокий положительный заряд аминокислотной цепи [150]. В целом, принято полагать, что более высокий положительный заряд С-концевой половины коррелирует с повышенной селективностью к каналу Kv1.3 в сравнении с каналом Kv1.2 [150].

### **1.3.2. Непептидные лиганды.**

**1.3.2.1. Неселективные блокаторы калиевых каналов.** На заре изучения ионных каналов для распознавания калиевых каналов использовали 4-аминопиридин (4-АП) и тетраэтиламмоний (ТЭА) (рис. 8). Эти соединения обладают способностью блокировать многие калиевые каналы в микро- и миллимолярном диапазоне, но не проявляют или проявляют слабый эффект на натриевых и кальциевых каналах.

Долгое время полагали, что четвертичные аммониевые катионы, к которым относится ТЭА, могут блокировать калиевые каналы только с цитоплазматической стороны [141, 142]. Однако впоследствии было обнаружено, что ТЭА отличает также способность блокировать некоторые, но не все, калиевые каналы с внеклеточной стороны [153]. Внеклеточный сайт связывания калиевых каналов селективен для ТЭА, в то время как внутриклеточный сайт помимо ТЭА, связывает и многие его производные. Аффинность к внутриклеточному сайту связывания возрастает с ростом гидрофобности производных. Предполагается, что это объясняется превалированием гидрофобных сил при взаимодействии блокатора и аминокислотных остатков поры канала с внутриклеточной стороны [153]. Аффинность ТЭА с внешней стороны строго определяется наличием аминокислотных остатков в определенных положениях внешней поры канала. Связывание ТЭА резко возрастает, если в области, граничащей с селективным фильтром, присутствует остаток ароматической аминокислоты (тирозин в положении 82 в канале KcsA) [154].

Другие широко используемые блокаторы ПЧКК с низкой селективностью – органические соединения хинин, d-тубокурарин, верапамил, эмопамил и др. (рис. 8). Они относятся к группе высоко гидрофобных катионов, которые блокируют калиевые каналы путем физического перекрытия порового отверстия при помощи аммонийной группы [2].

Иной механизм блокады показан для 4-АП, который содействует закрытию активационных ворот канала [16, 145]. Интересно, что 4-АП проявляет некоторые свойства гидрофобных катионов: он способен проникать внутрь канала *Shaker* в открытой конформации, конкурировать за связывание с ТЭА в открытой конформации канала и оставаться запертым в закрытой конформации. Тем не менее, малые размеры 4-АП, а также недостаток ионизированных групп при физиологическом рН не дают возможность этой молекуле физически перекрывать канал для тока калия.

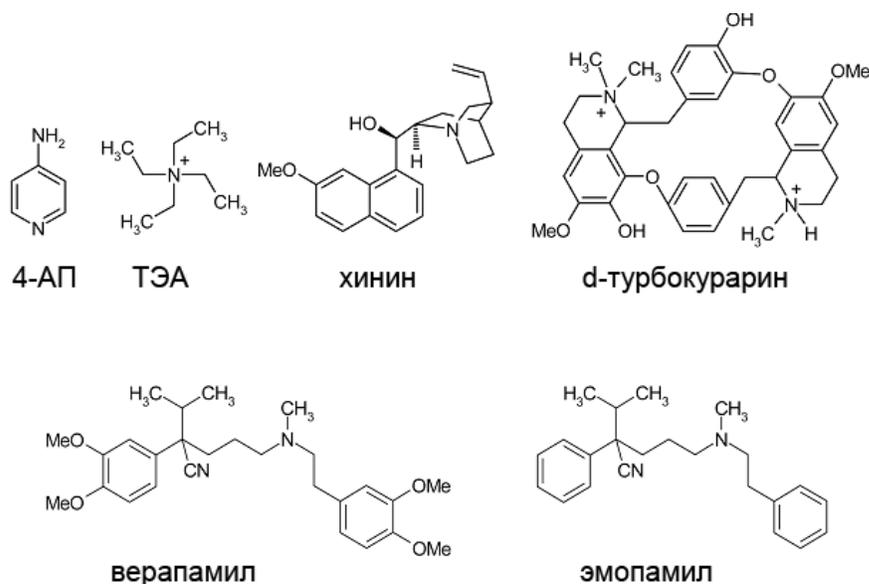


Рис. 8. Низкоселективные блокаторы калиевых каналов.

**1.3.2.2. Селективные блокаторы каналов семейства Kv1.** Более активные и селективные блокаторы каналов семейства Kv1, которые были открыты за последние 10-15 лет, можно разбить на две группы. Первая группа включает типичных представителей комбинаторных библиотек. К этой группе относится дигидрохиолин CP-339818, пиперидин UK-78282 и трифенилэтилен А. Их отличает простая структура и наличие большого числа атомов азота и галогенов. Соединения CP-339818 и UK-78282 были найдены в середине 90-х годов в результате работ, проводимых американской компанией Pfizer по

поиску новых низкомолекулярных блокаторов перспективных с точки зрения фармакологии канала Kv1.3. Данные соединения связываются преимущественно с каналами, инактивированными по С-типу. Значение  $IC_{50}$  для этих соединений на канале Kv1.3 составляет ~ 200 нМ. Не смотря на то, что SR-339818 и UK-78282 были первыми обнаруженными низкомолекулярными блокаторами с наномолярной активностью, большого успеха в дальнейшем они не имели, поскольку были недостаточно селективны в отношении каналов группы Kv1, а также проявляли активность в отношении натриевых каналов.

Вторая группа блокаторов состоит из компонентов природного происхождения, которые богаты атомами кислорода и имеют более сложную стехиометрию. Сюда входят: терпеноиды (коррелоид и кандилалид В), псоралены и келлиноны [2]. Остановимся более подробно на рассмотрении представителей этих групп.

**Терпеноиды.** В результате исследовательских работ, проводимых фармацевтической фирмой Merck, из экстракта коста-риканского дерева *Spathaea correa* в 1998 году было выделено вещество, получившее название коррелид (рис. 9) [155]. По своему химическому строению это пентациклический тритерпен, содержащий нетипичное лактонное кольцо [156]. Коррелид блокирует канал Kv1.3 с  $Kd \sim 100$  нМ и ингибирует пролиферацию Т-лимфоцитов. Его аналоги с более удачными фармакологическими свойствами подавляют *in vivo* замедленную гиперчувствительность у мини-свиней. Был предложен механизм блокирующего действия коррелида. Данная молекула “прижимается” к гидрофобному окружению сегмента S6 с цитоплазматической стороны своей липофильной частью и хелатируют проходящие ионы калия при помощи полярной ацетильной группы [2, 150].

Не смотря на достаточно высокую эффективность, коррелид и его производные не самые удачные кандидаты с точки зрения фармакологии, поскольку помимо канала Kv1.3 они также блокируют другие каналы семейства

Kv1 с сопоставимой эффективностью (Kv1.2, Kv1.5, Kv1.6 и особенно Kv1.1). Кроме того, сложность структуры молекулы, включающая 15 хиральных атомов углерода, делает синтез новых аналогов трудоемким и дорогим.

Исследователи из компании Merck также изолировали три новых соединения группы дитерпеноидных пиранов, названных кандилалиды А-С. Они были получены из культуральной среды гриба *Sesquicillium candelabrum*. Кандилалид В (рис. 9), наиболее активный компонент из данных соединений, блокирует вытекание рубидия через канал Kv1.3 с  $IC_{50} = 1,2$  мкМ [2].

**Псоралены.** Основываясь на сообщениях о том, что чай из листьев растения *Ruta graveolens* помогает в лечении рассеянного склероза, группа ученых из Кильского университета (Германия) выделили из экстракта листьев этого растения вещество 5-метоксиспорален (рис. 9), которое оказалось низкоаффинным блокатором Kv1.3 канала [158]. Лекарство на основе 5-метоксиспоралена было использовано для лечения псориаза, но в отношении рассеянного склероза оказался не очень пригоден из-за своей фототоксичности. Были проведены дальнейшие структурно-функциональные исследования полученного соединения с целью снизить его фототоксичность и увеличить активность и селективность действия [2]. Благодаря этим обширным исследованиям были разработаны и синтезированы новые соединения Psora-4 [159] и PAP-1 [160] (рис. 9).

Psora-4 на сегодняшний день один из наиболее активных низкомолекулярных блокаторов канала Kv1.3. Psora-4 блокирует Kv1.3 частотно-зависимым образом с коэффициентом Хилла равным 2 и  $IC_{50} = 3$  нМ, связываясь преимущественно с каналом, инактивированным по С-типу [159]. Данное соединение обладает в 17-70 раз большей активностью в отношении канала Kv1.3 по сравнению с родственными каналами семейства Kv1 (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4 и Kv1.7), за исключением канала Kv1.5 ( $IC_{50} = 7.7$  нМ). Psora-4 не блокирует каналы HERG, Kv3.1, кальций-активируемые калиевые каналы

(IKCa1, SK1–SK3, BKCa), нейрональный канал NaV1.2. Слабая дифференциация между каналами Kv1.3 и Kv1.5 ограничивает применимость Psora-4 как иммуномоделирующего препарата, но возможно дальнейшие разработки приведут к созданию более селективного аналога Psora-4 [114].

PAP-1 блокирует Kv1.3 с  $IC_{50} = 2$  нМ и с коэффициентом Хилла равным 2, т.е. лишь немного эффективнее Psora-4, но он менее липофилен и гораздо более селективен, а значит более применим для использования *in vivo*. Активность PAP-1 на канале Kv1.3 в 25–125 раз выше, чем на каналах Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5, Kv1.6 и Kv1.7, и более чем в 1000 раз выше, чем на более отдаленных каналах Kv2.1, Kv3.1, Kv4.2, Kv11.1 (hERG) и KCa [160]. PAP-1 не обладает токсичностью в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Лекарства на его основе можно принимать как перорально, так и в виде мазей. Экспериментально доказана его эффективность при лечении замедленной гиперчувствительности [160], псориаза [161], диабета 1 типа [5].

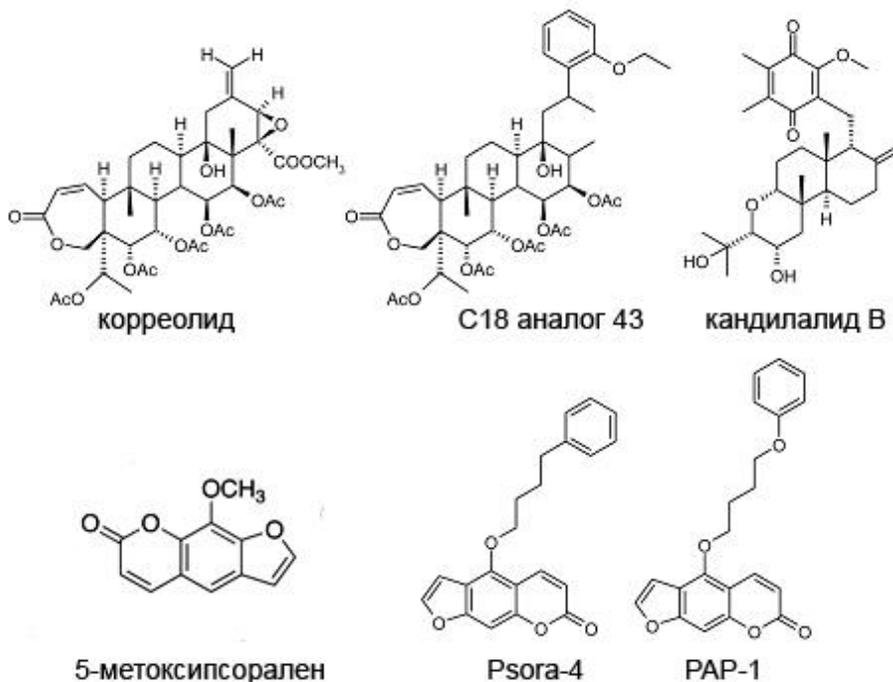


Рис. 9. Специфические блокаторы ПЧКК из группы терпеноидов и псораленов.

**Келлиноны.** Разработка келлинонов началась с изолирования 5-ацетил-4,7-диметокси 6-гидроксибензофурана - келлинона из растения *Ammi visnaga*, который по химическому строению может быть отнесен к открытому варианту лактонного кольца псораленов. Позднее было синтезировано три различных класса аналогов этого соединения: (1) халконовые производные келлинона, (2) димеры келлинона и (3) производные келлинона, алкилированные в 4 и 7 положении атомов углерода [2]. Все три класса соединений ингибируют Kv1.3 с  $IC_{50}=100-500$  нМ и показывают в 3-10 раз большую селективность по сравнению с другими каналами семейства Kv1, не токсичны и подавляют пролиферацию Т-лимфоцитов при микромолярных концентрациях. Интересно, что различные производные келлинонов и псораленов, не смотря на схожесть своих структур, проявляют различные механизмы блокирования канала. Psora-4 и PAP-1 блокируют Kv1.3, связываясь с каналом, инактивированным по С-типу. Соответственно, они достигают максимума блокирующей активности после нескольких повторных открытий канала [160]. Келлиноны, замещенные по 3 положению атома углерода, такие как халкон-16, и келиноны, замещенные по 4 положению атома углерода, вероятно, являются блокаторами, взаимодействующими с открытым состоянием канала. Поэтому максимум их блокирующей способности приходится на первый деполяризационный импульс [162]. Кинетика блокирования келлинона, замещенного по 7 положению атома углерода, представляет собой среднее между кинетикой связывания канала только в открытой конформации и частотно-зависимым блоком проводимости. Для келлинона, замещенного по 7 положению атома углерода, также как и для Psora-4, и PAP-1, характерен коэффициент Хилла равный 2. Не смотря на то, что кооперативность до сих пор не была строго доказана для этих соединений, вероятнее всего, она имеет место. Данное заключение опирается на детальные исследования, проведенные Шмалхофером (Schmalhofer) и соавторами. Результаты работы свидетельствуют о наличии у канала Kv1.3 двух сайтов

связывания, которые обладают положительной аллостерической кооперативностью [163].

**Другие блокаторы.** Интересные результаты были получены группой ученых из Калифорнийского университета под руководством Дирка Траунера (Dirk Trauner). За основу разработки блокаторов непептидной природы взяли пептидную модель расположения молекулы внутри порового отверстия [164]. Используя в качестве каркаса тетрафенилпорфирин, авторы исследования разместили четыре положительно-заряженных группы на оптимальном расстоянии для установления связи с четырьмя остатками аспарагиновой кислоты (Asp38) во внешнем поровом отверстии канала Kv1.3. Методом конкурентного замещения радиоактивно-меченных пептидов показано, что тетрафенилпорфирин в отношении канала Kv1.3 обладает  $Kd = 20\text{--}150$  нМ; блокирование тока калия, определенное методом patch-clamp, наступает, начиная с микромолярного диапазона. Экспериментов по мутационному анализу и компьютерного моделирования, подтверждающего предполагаемое расположение молекулы при связывании, пока сделано не было. Авторы исследования разумно замечают, что использование тетрафенилпорфирина в фармакологии затруднительно в виду непостоянства его заряда и слишком высокого молекулярного веса. Кроме того, до сих пор не изучен вопрос селективности его действия. Тем не менее, такого рода структуры, способные образовывать одновременно четыре солевых мостика с четырьмя остатками аспарагиновой кислоты в белке, могут быть удобным базисом для прикрепления флуорофоров. Подобные конструкции могли бы явиться альтернативой флуоресцентно-меченым пептидам или антителам. Кроме того, тетрафенилпорфирины могут быть использованы для синтеза металлопорфиринов для визуализации и кристаллографических исследований [164].

Соединение клофазимин было известно под именем препарата Lamprene (фирмы Novartis) начиная с 1960-х годов. Оно повсеместно используется в клиниках в качестве лекарства от лепры, постулезного псориаза и дискоидной красной волчанки. Однако не так давно было обнаружено, что клофазимин ингибирует канал Kv1.3 с  $IC_{50} = 400$  нМ и предотвращает отторжение трансплантированной кожи человека у иммунодефицитных мышей с человеческими Т-лимфоцитами [165]. Кроме того, клофазимин эффективно подавляет *in vivo* рост пересаженной мышам меланомы [81].

Клофазимин может быть либо использован в качестве шаблона для дальнейшего дизайна новых блокаторов Kv1.3 канала, либо напрямую направлен на клинические испытания. Во втором случае предварительно должен быть проведен тщательный анализа по преобладанию его положительного лечебного действия над известными для него рисками со стороны ЖКТ и кожных покровов. Кроме того, результаты, полученные для клофазимина, следует интерпретировать с особой тщательностью, поскольку это соединение обладает широким спектром биологической активности. Известно, что клофазимин стимулирует фосфолипазы, увеличивает фагоцитоз макрофагами и взаимодействует с ДНК [2].

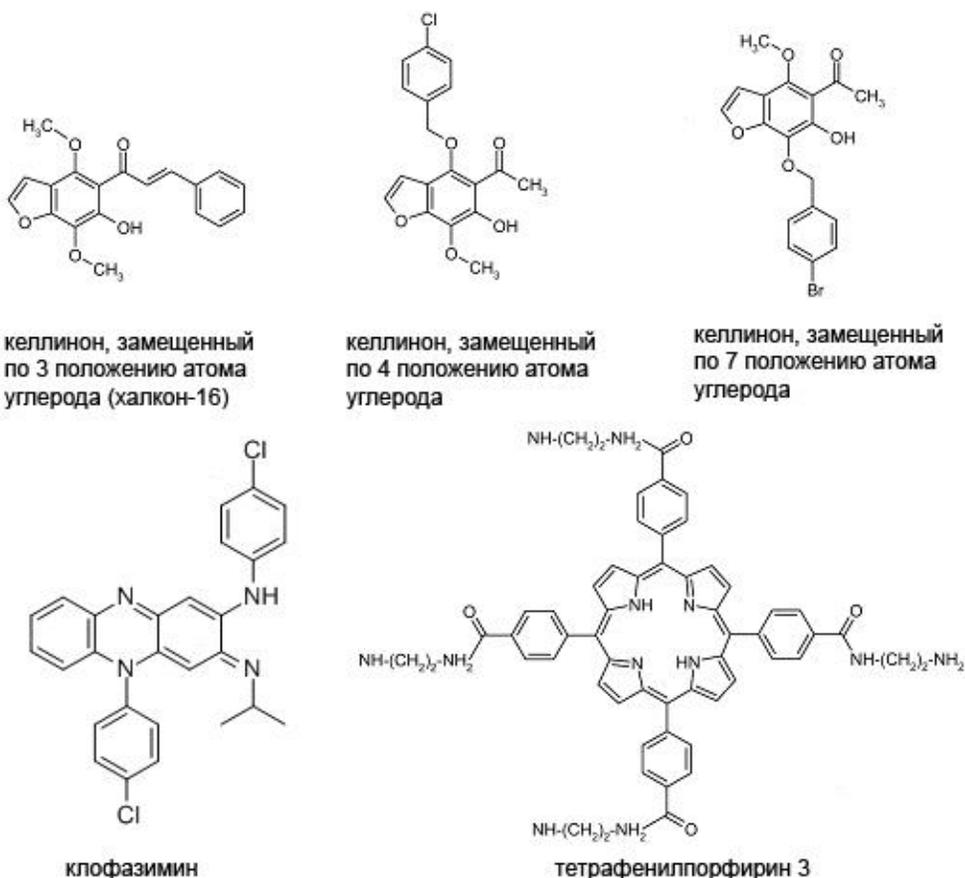


Рис. 10. Специфические блокаторы ПЧКК из группы келлинонов, а также клофазимин и тетрафенилпорфирин 3.

**1.4. Методы поиска и исследования новых блокаторов Kv1-каналов.** На сегодняшний день рациональный дизайн модуляторов ионных каналов еще только начинает развиваться, поэтому акцент в поисковых программах для нужд фармакологии остается на случайном, реже прицельном обнаружении необходимых соединений. В то же время системы высокопроизводительного скрининга (ВПС), которые активно используются для поиска модуляторов ферментов и рецепторов, сопряженных с G-белками, мало применяются в случае ионных каналов из-за определенных технологических трудностей. Наиболее традиционными и общепринятыми методами поиска и изучения лигандов ионных каналов, в том числе калиевых каналов семейства Kv1,

являются электрофизиологический метод локальной фиксации потенциала (технология patch-clamp) и радиолигандный метод анализа.

**Методы электрофизиологии.** Метод локальной фиксации потенциала (технология patch-clamp) - наиболее распространенный электрофизиологический подход для изучения ионных каналов. Существует множество вариантов и конфигураций этого метода. Фрагмент клеточной мембраны (“patch”) изолируют при помощи специальной микропипетки. Потенциал мембраны фиксируют на постоянном уровне электронным блоком управления с обратной связью (рис. 11). Движение ионов через мембрану оценивают по силе тока, которая нужна для поддержания мембранного потенциала на заданном значении. Для сохранения электронейтральности, вход положительно заряженных ионов внутрь клетки, например, калия, компенсируется испусканием электронов из электрода, расположенного в цитоплазме. И напротив, выход положительных ионов из клетки компенсируется уменьшением электронов в цитоплазме.

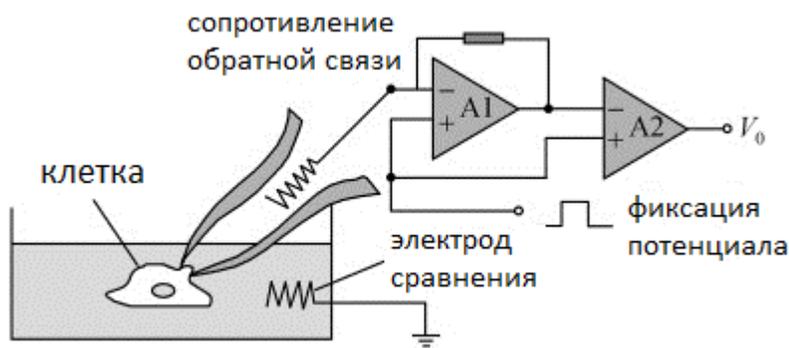


Рис. 11. Принцип технологии patch-clamp в ее классическом виде [166].

Метод patch-clamp очень чувствительный, он позволяет изучать взаимодействие молекул блокаторов с одиночными каналами в составе мембраны. Электрофизиологический метод по праву считается “золотым стандартом” исследования ионных каналов, однако он не может быть

использован при скрининге большого числа соединений за короткий промежуток времени. В классическом виде технология patch-clamp трудоемка, требует набора специализированных навыков в электрофизиологии и позволяет проводить не более десятков измерений в день [8].

Одной из модификаций классического patch-clamp является разработанная в конце 90-х годов технология планарного patch-clamp на специальных микрочипах (рис. 12а). Если в классическом patch-clamp пипетка позиционируется на неподвижной клетке, то в планарном, напротив, клеточная суспензия наносится на микрочип с упорядоченными отверстиями субклеточного диаметра. Клетка оседает на отверстие и подсасывается к нему с помощью отрицательного давления и в результате формируется гигаомный контакт. Далее исследование проводится по тому же принципу, что и в традиционном patch-clamp. Создание мультиэлектродных чипов позволило одновременно снимать показания от множества клеток одновременно (рис. 12б) [166].

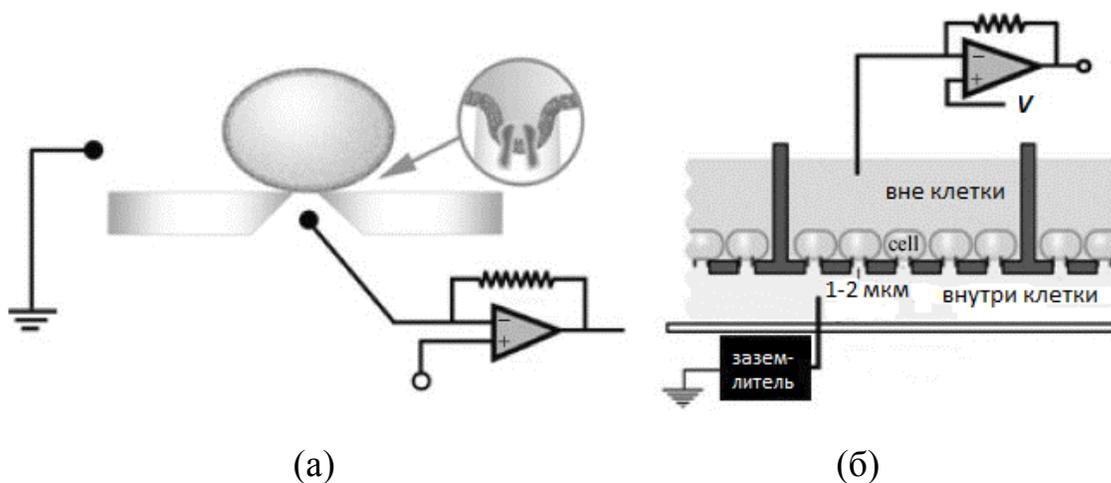


Рис. 12. Принцип устройства микрочипа (а) для технологии планарного patch-clamp (б) [166].

Основное преимущество планарного patch-clamp состоит в том, что эксперимент выполняется значительно проще, требует меньшей квалификации

от исследователя и занимает меньше времени. Достаточно много измерений может быть выполнено одно за другим в автоматическом режиме. По утверждению авторов методики, этот метод позволяет легче осуществлять перфузию внутриклеточного содержимого, а также более точно дозировать исследуемые или тестовые фармакологические вещества. С помощью этого метода относительно легко работать с клетками, обычно находящимися во взвешенном состоянии — в частности, с клетками крови [167].

Вместе с тем, метод планарного patch-clamp имеет ряд существенных ограничений. Основное состоит в том, что исследуемые клетки должны находиться в суспензии. Соответственно, не существует возможности работать с фрагментами ткани, невозможно изучать взаимодействие клеток друг с другом. Для мобилизации клеток необходимо использовать ферменты-протеазы, которые могут модифицировать поведение изучаемых ионных каналов [167].

Все вышесказанное приводит к тому, что планарный patch-clamp находит применение главным образом в фармакологических скрининговых исследованиях, где требуются массовые измерения, но не столь распространен в области фундаментальной науки.

Для нужд фармакологии на основе метода планарного patch-clamp разработано большое количество приложений. Линейка коммерчески доступных устройств начинается от средне производительных систем высокой точности таких, как PatchXpress (Molecular Devices), Qpatch 8 и 16 (Sophion) [168] и PatchLiner (Nanion) [169], которые могут тестировать до 100 компонентов в день, и продолжается более производительными платформами IonWorks HT (Molecular Devices), Quattro (Molecular Devices) [170], а также Qpatch HT и Qpatch HTX (Sophion) [171], которые могут тестировать тысячи компонентов в день.

**Радиолигандный анализ.** Радиолигандный метод анализа позволяет детектировать замещение радиоактивно-меченного лиганда анализируемым соединением из комплексов с ионным каналом, экстрагированным вместе с мембраной или в составе мицелл. Для каналов семейства Kv1 были проведены исследования с использованием радиоактивно-меченных токсинов из ядов скорпионов: MgTx [172], HgTx [173], NTX [174] и др. Не смотря на то, что радиоактивные методики быстры, просты в использовании и воспроизводимы, их существенными недостатками являются вред для здоровья человека, проблема утилизации радиоактивных отходов, необходимость соблюдения особых лабораторных условий работы с радиоактивностью, и в больших масштабах исследований они довольно дороги. В связи с этим за последние 10-15 лет наметился уход от использования радиоактивных методик. Были предложены новые подходы для поиска и исследования модуляторов ионных каналов.

**Флуоресцентные методики.** Большой упор исследователей был направлен на создание биоконъюгатов пептидных токсинов с флуоресцентными красителями. Использование флуоресцентно-меченных лигандов как зондов для детекции взаимодействия блокаторов с каналом позволяет визуализировать процесс связывания лиганда и часто упростить процедуру детекции. Пептидные блокаторы каналов семейства Kv1 без потери своих биологических свойств были успешно конъюгированы с такими флуоресцентными красителями, как Cy3, Alexa488 и Alexa546 [175]. Конъюгирование пептидов с некоторыми другими флуоресцентными метками было менее удачным. Совокупность полученных работ свидетельствует о том, что при создании флуоресцентных зондов на основе пептидных токсинов для структурно-функциональных исследований важно как место конъюгирования флуорофора с пептидом, так и выбор флуоресцентной метки. В качестве примера успешного дизайна можно назвать синтезированный в 2002 году флуоресцентно-меченный пептидный

блокатор из яда скорпиона – HgTx [176]. Он был с успехом использован для обнаружения локализации канала Kv1.3 в срезах мозга крысы [176], а позднее с использованием флуоресцентной микроскопии единичных молекул на клеточных линиях Jurkat [7]. С использованием метода проточной цитометрии показано взаимодействие между флуоресцентно-меченым аналогом пептида ShK (ShK-F6CA) и T-лимфоцитами крови крысы и человека [6]. Безусловно, цитометрические исследования с использованием флуоресцентно-меченных блокаторов каналов обладают большим потенциалом, но пока находятся только на стадии разработки.

Другие подходы базируются на том факте, что активация ионных каналов приводит, во-первых, к движению заряженных ионов через клеточную мембрану, а, во-вторых, выражается в сопутствующем изменении мембранного потенциала. Изменение мембранного потенциала проще всего визуализировать, используя потенциал-чувствительные мембранные красители и измеряя флуоресценцию клеток через дно микроплашек. Фоновая флуоресценция в наружном растворе может быть дополнительно снижена за счет оптической схемы прибора, как это, например, осуществляется в широко используемой системе FLIPR<sup>®</sup> (Molecular Devices) или полностью подавлена добавлением непроникающей краски-тушителя, например, Brilliant Black (наборы, включающие смесь флуоресцентного индикатора и краску-тушитель коммерчески доступны) [8]. Преимуществом второго варианта является возможность использовать в качестве считывающего устройства более простые и дешевые флуоресцентные ридеры.

Первые результаты по использованию мембранных красок и флуоресцентных ридеров для поиска новых Kv1-лигандов в многокомпонентных библиотеках внушают оптимизм [177]. Данная методика обладает неоспоримым преимуществом в эффективности и скорости скрининга.

К недостаткам данной системы можно отнести повышенный уровень ложноположительных результатов.

**Методы вытекания рубидия и таллия.** На принципе детекции движения ионов через мембрану основан метод вытекания рубидия (rubidium efflux assay). Рубидий, относящийся к группе щелочных металлов, не встречается в клетках и тканях эукариот, но его ионный радиус близок по размеру к иону калия, что позволяет ему проходить через селективные калиевые и неселективные катионные каналы. Концентрация рубидия в клетках отражает состояние калиевых каналов (открытое/закрытое) и может быть легко измерена методом атомно-абсорбционной спектроскопии [178]. Однако, как и в случае электрофизиологического метода, процедура исследования калиевых каналов методом вытекания рубидия требует специализированного оборудования и не подходит при скрининге большого числа соединений. В современной вариации на тему этого метода используются ионы таллия, которые также обладают способностью проходить через открытые калиевые каналы. Попадая внутрь клеток, ионы таллия взаимодействуют с флуоресцентным красителем, предварительно заруженным в цитоплазму (например, ВТС), отчего флуоресценция последнего меняется [179].

Более подробно ознакомиться с последними достижениями в области разработки систем поиска модуляторов ионных каналов можно в обзорах [176, 177].

## **Глава 2. Материалы и методы**

### **2.1. Реагенты**

Рекомбинантный КТХ, ТЭА, 4-АП, лизоцим и мелиттин были получены из Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, США).

Экспрессия рекомбинантных пептидов OSK1 и AgTx2, а также флуоресцентное мечение рекомбинантного AgTx2 было осуществлено к.х.н.

Ю.В. Корольковой (Лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН), как описано ранее [183, 184].

Цельные яды 19 видов пауков (*Thanatus sp.*, *Araneus marmoreus*, *Agelenopsis potteri*, *Tibelus oblongus*, *Paracoelotus birulai*, *Tegenaria agrestis*, *Araneus grossus*, *Pisaura mirabilis*, *Thomisus onustus*, *Heriaeus sp.*, *Agelena orientalis*, *Latrodectus tadjicus*, *Eresus niger*, *Latrodectus pallidus*, *Linothele sp.*, *Steatoda sp.*, *Segestria sp.*, *Tegenaria sp.*, *Micrommata virescens*), 6 видов скорпионов (*Buthacus arenicola*, *Androctonus amoreuxi*, *Leiurus quinquestriatus*, *Mesobuthus martensii* Karsch, *Orthochirus scrobiculosus scrobiculosus*, *Mesobuthus eupeus*) и секрет жабы *Bufo bufo* были предоставлены для исследований коллегами из Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН.

Яд скорпиона *Heterometrus laoticus* и змей 7 видов (*Macrovipera lebetina obtusa*, *Vipera nikolskii*, *Walterinnesia aegyptia*, *Bitis arietans*, *Cryptelytrops honsonensis*, *Dendroaspis angusticeps*, *Bungarus multicinctus*) были предоставлены д.х.н. Ю.Б. Уткиным (лаборатория молекулярной токсикологии ИБХ РАН).

## **2.2. Клонирование и экспрессия гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6)**

Плазмидные ДНК, содержащие гены рекомбинантных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), были получены к.б.н. О.В. Некрасовой (группа нанобиоинженерии ИБХ РАН) и клонированы в вектор pET28a, как описано ранее [182].

Ночную культуру клеток *E. coli* BL21(DE3) (фирмы Novagen), трансформированных плазмидой pET28KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), инокулировали в 100 мл среды LB, содержащей 40 мкг/мл канамицина, до начальной мутности, соответствующей OD<sub>560</sub> = 0,3 о.е./см. Культуру индуцировали при OD<sub>560</sub>=0,6-0,9 о.е./см добавлением ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид) до конечной концентрации 50 мкМ и продолжали выращивание в течение 22 ч при 25-37°C. Уровень экспрессии белка детектировали путем разделения белков клеточного

лизата электрофорезом в денатурирующем 13,5% полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли [Laemmli, 1970].

### **2.3. Приготовление сферопластов из клеток *E. coli* BL21(DE3)**

Суспензию клеток *E. coli* BL21(DE3), содержащих гибридный белок KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), суммарной оптической плотностью  $OD_{560} = 3$  о.е., осаждали центрифугированием при 6 тыс. об/мин в течение 3 мин при 8-10°C. Осадок суспендировали в 0,9 мл буфера, содержащего 10 мМ Трис-НСl, pH 8, 0,5 М сахарозы, и распределяли в 3 пробирки по 0,3 мл. К каждой пробе добавляли 0,7 мл свежеприготовленного раствора лизоцима до конечной концентрации 10 мкг/мл (100 U/мл) и перемешивали. Пробу инкубировали 7 мин, затем добавляли 1 мл раствора состава 10 мМ Трис-НСl, pH 8, 0,6 мМ ЭДТА, тщательно перемешивали и инкубировали еще 15-17 мин. По прошествии этого времени добавляли раствор  $MgCl_2$  до конечной концентрации 10 мМ. Все операции проводили на льду. Полученную суспензию сферопластов ( $\sim 10^6$  клеток/мкл) хранили при 4°C в течение не более 10-14 дней.

### **2.4. Методика проведения экспериментов по анализу взаимодействия лигандов каналов Kv1.x с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе мембраны сферопластов**

Для проведения экспериментов по связыванию лигандов с гибридными белками суспензию сферопластов с гибридными белками KcsA-Kv1.3 и KcsA-Kv1.x (x=1,6) разбавляли до концентрации  $10^3$  и  $10^4$  клеток/мкл, соответственно (если не указано иначе), в буфере состава 50 мМ Трис-НСl, pH 7,5, 0,25 М сахароза, 0,3 мМ ЭДТА, 4 мМ KCl, 50 мМ NaCl, 10 мМ  $MgCl_2$ , 0,1% БСА. Сферопласты инкубировали 1-1,5 ч с исследуемыми компонентами на шейкере при 150 об./мин и 20-23°C. Образцы помещали в 12-луночную силиконовую камеру flexiPERM (Perbio, Бельгия) со стеклянным дном толщиной 0,17 мм,

осаждали клетки на стекло, центрифугируя в течение 6 мин при  $200\times g$ , и переносили под микроскоп для анализа.

В эксперименте по определению константы связывания с R-AgTx2 сферопласты инкубировали с возрастающей концентраций R-AgTx2 в течение 1-1,5 ч. Для проведения конкурентного вытеснения R-AgTx2 и расчета константы диссоциации  $K_{ap}$  немеченых лигандов сферопласты инкубировали с фиксированной концентрацией R-AgTx2 (9,1 нМ для KcsA-Kv1.1; 4,9 нМ для KcsA-Kv1.3; 5,5 нМ для KcsA-Kv1.6) и возрастающей концентрацией лигандов в течение 1-1,5 ч.

## **2.5. Получение флуоресцентных изображений**

Изображения зон образца размером  $146\times 146$  мкм получали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM710 META (Zeiss, Германия) и 63-кратного масляно-иммерсионного объектива  $\alpha$  Plan-Apochromat с числовой апертурой 1,46. Диаметр конфокальной диафрагмы соответствовал 2,3 дискам Эйри, что обеспечивало толщину оптического среза 3,4 мкм. Изображения оцифровывали с шагом 0,13 мкм/пиксель. Разрешение в плоскости препарата составляло 0,3 мкм.

Флуоресценцию R-AgTx2 возбуждали гелий-неоновым лазером на длине волны 543 нм, а испускание флуоресценции регистрировали с помощью длинноволнового барьерного фильтра с границей 585 нм. Для изменения уровня сигнала флуоресценции в пределах установленного динамического диапазона варьировали мощность лазера на образце (0,2-10,8 мкВт) при сохранении неизменными всех прочих настроек сканирования.

## **2.6. Анализ данных**

Полученные флуоресцентные изображения обрабатывали при помощи программы ImageJ (National Intsitute of Health, США). Определяли среднюю по

площади клетки интенсивность флуоресценции, которая пропорциональна количеству R-AgTx2 в комплексах с гибридными белками на поверхности сферопластов. С использованием выборки данных, полученных не менее, чем от 120 клеток, для каждого измерения с учетом нормировки на мощность лазера рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции R-AgTx2 на мембране клеток  $I_{cp}$  и стандартное отклонение этого значения. Анализ результатов во всех случаях проводили на основании 2-3 независимых экспериментов. Для построения графиков и расчета по ним параметров взаимодействия лигандов с гибридными белками использовали программу GraphPad Prism (GraphPad Software, США).

## **2.7. Методика поиска лигандов каналов Kv1.x в ядах животных**

Цельные яды пауков, скорпионов, змей и секрет жабы анализировали по их способности конкурировать с R-AgTx2 за связывание с гибридными белками KcsA-Kv1.x ( $x=1,3,6$ ) на поверхности сферопластов. Для этого сферопласты с гибридными белками KcsA-Kv1.x ( $x=1,6$ ) или KcsA-Kv1.3 разводили в буфере состава 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 0,25 М сахараза, 0,3 мМ ЭДТА, 4 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub> (или BaCl<sub>2</sub>), 0,1% БСА соответственно до концентраций  $5 \times 10^4$  и  $10^4$  клеток/мкл. Навески ядов растворяли в воде и смешивали с суспензией сферопластов. Смесь инкубировали 5 мин, затем добавляли R-AgTx2 (4,9 нМ, если не указано иначе), инкубировали еще 1 ч при 20-23°C и проводили измерения, как описано выше. В качестве положительного контроля использовали конкурентное вытеснение R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.x немечеными Kv1-лигандами AgTx2 или OSK1. В качестве отрицательного контроля вместо цельных ядов (или фракций яда после его хроматографического разделения) добавляли эквивалентное количество воды к суспензии сферопластов.

### 2.7.1. Анализ ядов пауков и секрета жабы

Яды пауков были получены от 10-20 взрослых животных обоих полов электростимуляцией, немедленно заморожены и лиофилизированы. Навески ядов пауков растворяли в деионизованной воде до необходимой концентрации. Яды пауков *Thanatus sp.*, *A. marmoreus*, *A. potteri*, *T. oblongus*, *P. birulai*, *T. agrestis*, *A. grossus*, *P. mirabilis*, *T. onustus* тестировали в максимальной концентрации 98 мкг/мл при концентрации R-AgTx2 – 4,9 нМ. Яды пауков *Heriaeus sp.1*, *A. orientalis*, *L. tadzhicus*, *E. niger*, *L. pallidus*, *Linothele sp.*, *Steatoda sp.*, *Segestria sp.*, *Tegenaria sp.*, *M. virescens* тестировали в максимальной концентрации 185 мкг/мл при концентрации R-AgTx2 – 5,5 нМ. Секрет жабы *B. bufo* тестировали в максимальной концентрации 2,5 мг/мл при концентрации R-AgTx2 – 5,7 нМ.

### 2.7.2. Анализ ядов змей

Навески ядов змей растворяли в деионизованной воде до концентрации 10 мг/мл. Максимальная протестированная концентрация ядов змей составила 0,89 мг/мл. Концентрация R-AgTx2 во всех экспериментах была 5,3 нМ.

### 2.7.3. Фракционирование и анализ яда скорпиона *H. laoticus*

Яд *H. laoticus* получали от животных, собранных в провинции Ан Зянг на Юге Вьетнама. Для отбора использовали электростимуляцию. Собранный яд высушивали в эксикаторе над безводным CaCl<sub>2</sub> и хранили при -20<sup>0</sup>C [184]. Цельный яд *H. laoticus* тестировали в максимальной концентрации 2,5 мг/мл при концентрации R-AgTx2 – 5,7 нМ.

Работа по разделению цельного яда скорпиона *H. laoticus* на фракции была проведена сотрудниками лаборатории молекулярной токсикологии ИБХ РАН. В результате первой стадии хроматографии было получено 5 фракций, из которых одна обладала выраженной токсичностью на мышах. Эту фракцию подвергли дальнейшему разделению методом обращенно-фазовой

хроматографии. В результате было собрано 25 фракций, из которых 6 обладали токсичностью. Эти фракции подвергли дополнительной очистке с помощью обращенно-фазовой хроматографии [184].

Очищенные фракции яда скорпиона *H. laoticus* были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории молекулярной токсикологии ИБХ РАН и исследованы в данной работе при помощи разработанных клеточных систем с гибридными конструкциями KcsA-Kv1.x (x=1,3) согласно методике, описанной выше.

#### **2.7.4. Анализ ядов скорпионов *B. arenicola* и *A. amoreuxi*. Фракционирование и анализ ядов скорпионов *O. scrobiculosus* и *M. eureus***

Навески ядов скорпионов *B. arenicola*, *A. amoreuxi*, *O. scrobiculosus* и *M. eureus* растворяли в деионизованной воде до концентрации 10 мг/мл. Максимальная протестированная концентрация ядов скорпионов составила 1 мг/мл. Концентрация R-AgTx2 во всех экспериментах – 8 нМ.

Работа по разделению цельных ядов скорпионов *O. scrobiculosus* и *M. eureus* на отдельные компоненты была проведена аспирантом А.И. Кузьменковым (Лаборатория нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН). Цельный яд *O. scrobiculosus* (1 мг лиофилизованного порошка) был растворен в 100 мкл буфера состава 10 мМ Трис-НСl, рН 7,0, 150 мМ NaCl и разделен на 4 фракции при помощи гель-фильтрации. Цельный яд *M. eureus* (4 мг лиофилизованного порошка) был растворен в 300 мкл деионизованной воды, отфильтрован с пределом фильтрации 30 кДа и разделен на 3 фракции при помощи гель-фильтрации. Более подробно хроматографическая методика описана в статье [183]. Полученные фракции анализировались мной по их способности конкурировать с R-AgTx2 за связывание с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3) на поверхности сферопластов.

Фракции, которые показали способность вытеснять R-AgTx2, были дополнительно разделены А.И. Кузьменковым на субфракции при помощи обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ). Полученные субфракции анализировались мной по их способности конкурировать с R-AgTx2 за связывание с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3) на поверхности сферопластов.

Измерения проводили согласно разработанной методике, описанной выше. В случае яда *O. scrobiculosus* сферопласты, продуцирующие гибридные белки KcsA-Kv1.1 или KcsA-Kv1.3, инкубировали соответственно с 9 или 4,9 нМ R-AgTx2 и фракциями (68 мкг/мл) или субфракциями (0,16 мкг/мл или более) яда *O. scrobiculosus*. В случае яда *M. eureus* сферопласты, продуцирующих гибридные белки KcsA-Kv1.1 или KcsA-Kv1.3, инкубировали соответственно с 7,3 нМ или 5,5 нМ R-AgTx2 и фракциями или субфракциями яда *O. scrobiculosus*.

Приблизительная оценка количества вещества, содержащегося во фракциях и субфракциях, была дана по их поглощению на 210 нм. Площадь под пиками фракций/субфракций была соотнесена с площадью пиков молекулярных стандартов с известной концентрацией и схожими массами и коэффициентами экстинкции. В результате минимальное количество протестированного компонента яда *O. scrobiculosus* составило ~3 пмоль, а количество наиболее представленного компонента было ~300 пмоль.

Для проведения конкурентного вытеснения R-AgTx2 и расчета константы диссоциации  $K_{ap}$  пептида MeuKTX-1 из яда *M. eureus* сферопласты инкубировали с фиксированной концентрацией R-AgTx2 (7,3 нМ для KcsA-Kv1.1; 5,5 нМ для KcsA-Kv1.3) и возрастающей концентрацией пептида в течение 1-1,5 ч.

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Разработка флуоресцентной методики измерения и анализа взаимодействия лигандов с гибридными белками KcsA-Kv1.x на поверхности мембраны сферопластов

Подготовка и применение клеточных систем для поиска и изучения блокаторов Kv1-каналов включает следующие основные этапы (рис. 13): (1) экспрессию гибридных белков KcsA-Kv1.x ( $x=1,3,6$ ) в составе мембраны бактерий *E. coli*; (2) приготовление сферопластов из клеток *E. coli* путем удаления клеточной стенки без повреждения мембраны; (3) измерение концентрационной зависимости связывания флуоресцентно-меченного лиганда R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x ( $x=1,3,6$ ) на поверхности сферопластов с целью определения констант диссоциации комплексов R-AgTx2 с KcsA-Kv1.x ( $x=1,3,6$ ); (4) измерение концентрационной зависимости конкурентного связывания флуоресцентно-меченного лиганда R-AgTx2 и немеченного лиганда с гибридными белками KcsA-Kv1.x ( $x=1,3,6$ ) на поверхности сферопластов с целью подтверждения способности немеченого лиганда связываться с KcsA-Kv1.x и определения аффинности этих взаимодействий.

Для осуществления этапа (3) сферопласты инкубировали с R-AgTx2 в оптимизированном по составу (см. п. 3.2.2) буфере и получали флуоресцентные изображения методом ЛСКМ. Анализировали полученные изображения, определяя интенсивность флуоресценции R-AgTx2 на мембране каждой измеренной клетки и среднюю по выборке клеток интенсивность флуоресценции R-AgTx2 на мембране клеток  $I_{cp}$ . Строили зависимость параметра  $I_{cp}$ , который пропорционален среднему количеству комплексов R-AgTx2 с гибридным белком на мембране сферопластов, от концентрации

добавленного R-AgTx2. Определяли константу диссоциации ( $K_d$ ) R-AgTx2 с гибридными белками.

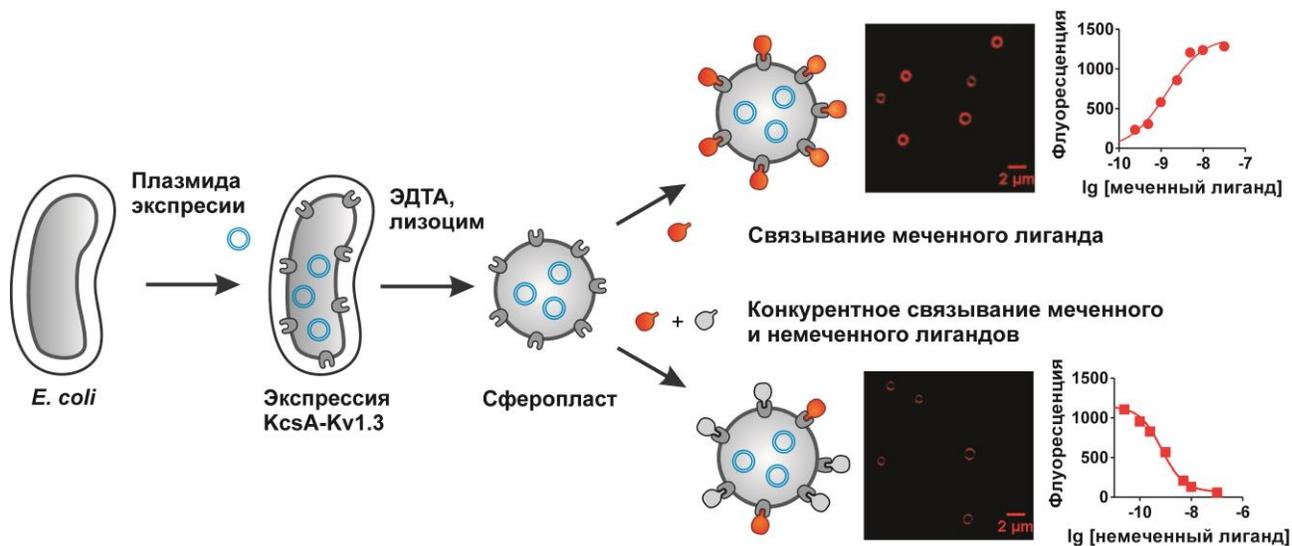


Рис. 13. Общая схема методики анализа взаимодействий лигандов каналов Kv1.3 с гибридными белками KcsA-Kv1.3 в составе мембраны сферопластов.

На этапе (4) проводили аналогичные измерения с добавлением немеченного лиганда при фиксированной концентрации R-AgTx2. Достоверное уменьшение параметра  $I_{cp}$  являлось подтверждением вытеснения R-AgTx2 из центра связывания немеченным лигандом. Строили зависимость параметра  $I_{cp}$  от концентрации добавленного немеченного лиганда. Определяли кажущуюся константу ингибирования связывания немеченного лиганда ( $K_{ap}$ ) с гибридными белками.

В данном разделе представлены результаты разработки методики анализа взаимодействий лигандов каналов Kv1.x с гибридными белками KcsA-Kv1.x в составе мембраны сферопластов.

### 3.1.1. Подбор условий детекции взаимодействия R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе мембраны сферопластов методом ЛСКМ

В качестве флуоресцентно-меченного лиганда в работе использовали агитоксин-2 (AgTx2), меченный 5(6)-карбокситетраметилродамином (R-AgTx2). AgTx2 – пептидный токсин из яда скорпиона *L. quinquestriatus*. AgTx2 (4,1 кДа) – высокоаффинный блокатор каналов Kv1, который связывается с поровой частью канала с наружной стороны мембраны (в соотношении 1:1) и блокирует ионный ток. При связывании R-AgTx2 с гибридными белками происходит локальное увеличение концентрации R-AgTx2, которое выражается в появлении флуоресценции на поверхности сферопластов (рис. 14). Поверхностная флуоресценция и округлая форма клетки свидетельствуют об интактности мембраны сферопластов и являются контрольным индикатором правильной процедуры их приготовления.

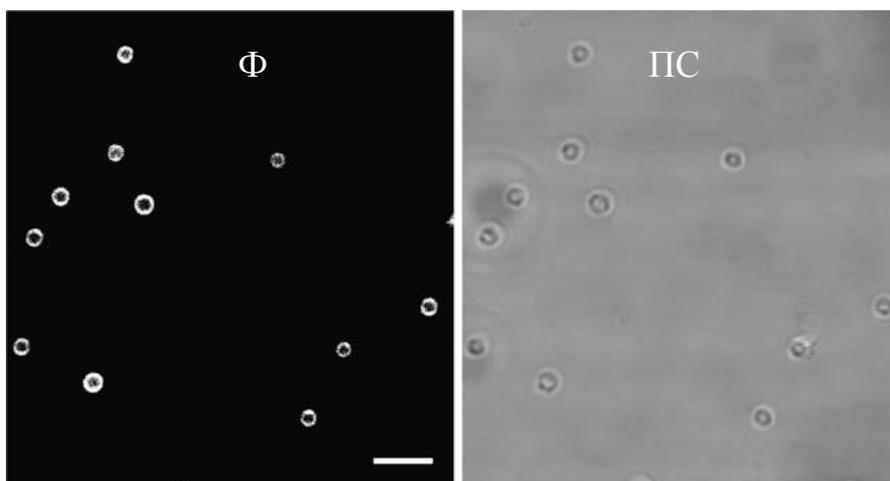


Рис. 14. Связывание R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.3 в составе мембраны сферопластов *E. coli*. На представленных микрофотографиях видно, что флуоресцентный сигнал детектируется на поверхности клеточной мембраны сферопластов бактерий. (Ф) – флуоресцентные изображения в диапазоне длин волн > 585 нм; (ПС) – изображения клеток в проходящем свете. Метка масштаба – 5 мкм.

В экспериментах установлено, что для обеспечения однородности связывания R-AgTx2 со сферопластами и воспроизводимости уровня

связывания необходимо вести инкубацию при мягком перемешивании раствора и обеспечить время инкубации не менее 60 мин, за которое достигается равновесное связывание.

Показано, что R-AgTx2 эффективно связывается с гибридными каналами KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) на поверхности сферопластов. Установлено, что интенсивность флуоресценции R-AgTx2  $I_{cp}$  в условиях насыщения связывания и одинаковых условиях инкубации и регистрации изображений убывает в ряду KcsA-Kv1.3  $\geq$  KcsA-Kv1.1 > KcsA-Kv1.6. Величина  $I_{cp}$  отражает количество доступных для связывания гибридных белков на мембране. Как видно на рис. 15, представленность гибридных белков на мембране в целом согласуется с общим уровнем экспрессии KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в тотальном клеточном лизате, но эффективность встраивания этих белков в мембрану (доля экспрессированного белка, встроившегося в мембрану клеток) заметно снижается в том же ряду: KcsA-Kv1.3  $\gg$  KcsA-Kv1.1  $\geq$  KcsA-Kv1.6. Этот результат указывает на необходимость не только оптимизации общего уровня экспрессии целевых мембранных белков в клетках *E. coli*, но и тщательного подбора условий, усиливающих встраивание этих белков в мембрану (см. п. 3.2.2).

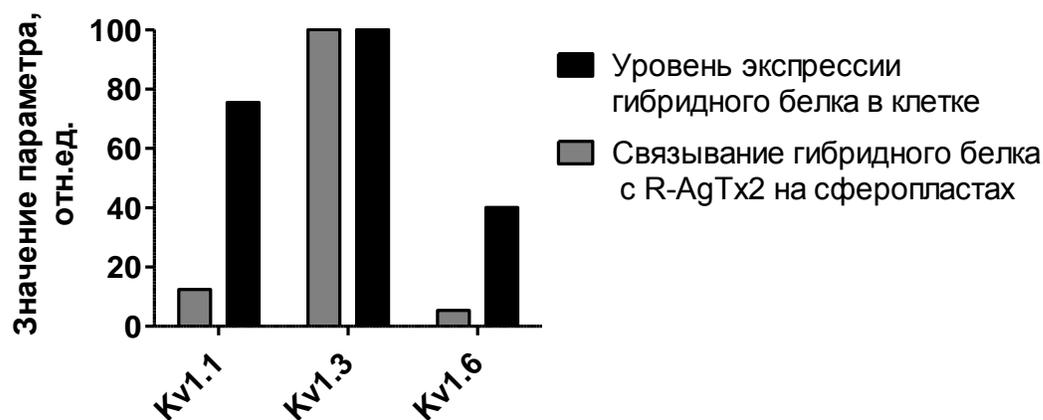


Рис. 15. Сравнение относительных уровней экспрессии гибридных белков в клетке (измерены денситометрическим методом по результатам ДСН-ПААГ

электрофореза) и относительных уровней встраивания гибридных белков в мембрану клеток (определены путем измерения относительных интенсивностей флуоресценции R-AgTx2, связанного с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) на поверхности сферопластов в условиях насыщения связывания). Уровни экспрессии и связывания R-AgTx2 на KcsA-Kv1.3 приняты за 100%.

Детектируемого связывания R-AgTx2 со сферопластами, полученными из нетрансформированных клеток *E. coli*, а также из клеток, продуцирующих канал KcsA, не являющийся мишенью действия AgTx2, не обнаружено. Это подтверждает, что R-AgTx2 специфически связывается с поровой петлей Kv1.x (x=1,3,6) в составе гибридного белка на мембране. Связывание R-AgTx2 с целыми клетками *E. coli*, продуцирующими KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), измеренное в контрольных экспериментах, было пренебрежимо мало, что доказывает, необходимость этапа приготовления сферопластов для обеспечения доступа лигандов к KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе мембраны.

Как отмечено выше, при правильной подготовке клеток к измерениям более 96% сферопластов, наблюдаемых в проходящем свете, интенсивно связывают на своей поверхности R-AgTx2 (рис. 14). При насыщении связывания распределение сферопластов по интенсивности сигнала флуоресценции R-AgTx2, связанного с Kv1.x на мембране, подчиняется нормальному распределению (рис. 16). Следовательно, популяции сферопластов являются однородными по уровню экспрессии KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) на мембране. Этот факт является основанием для использования параметра  $I_{cp}$  в качестве характеристики количества комплексов между R-AgTx2 и KcsA-Kv1.x (x=1,3,6).

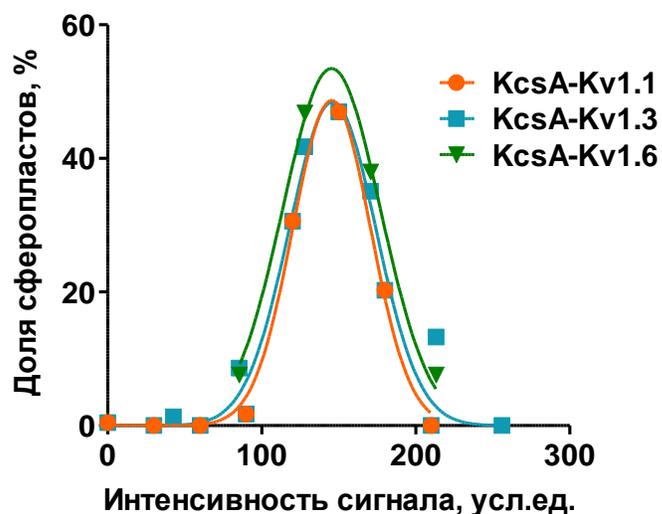


Рис. 16. Распределение сферопластов, продуцирующих KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), по интенсивности сигнала флуоресценции комплексов R-AgTx2 с гибридными белками в условиях насыщения связывания. Величина достоверности аппроксимации нормальным распределением ( $R^2$ ) равна 0,95 и 0,99 соответственно для KcsA-Kv1.3 и KcsA-Kv1.x (x=1,6).

Оптимизация условий регистрации флуоресцентных изображений при помощи ЛСКМ была осуществлена на примере сферопластов, продуцирующих KcsA-Kv1.3 и адаптирована для аналогичных экспериментов с участием гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,6). Чтобы обеспечить количественный анализ связывания лигандов с гибридными белками с высоким отношением сигнал/шум, мы фиксировали напряжение на ФЭУ равным 700 В, а мощность возбуждающего лазера в каждой серии экспериментов подбирали так, чтобы при насыщении связывании R-AgTx2 максимальный сигнал от сферопластов был не более 90% от уровня насыщения детектора. Выбранное напряжение ФЭУ обеспечивает высокое усиление сигнала при минимальном уровне собственных шумов ФЭУ. Уменьшение сигнала от сферопластов, связанное с вытеснением R-AgTx2 из комплексов или с низкой концентрацией R-AgTx2 (при измерении концентрационной зависимости связывания), компенсировали

увеличением мощности лазера. При количественном анализе измеренные от клеток интенсивности флуоресценции нормировали на мощность лазера. Диапазон мощностей лазера, применявшийся в исследованиях (0,2-11 мкВт) не вызывал фотообесцвечивания флуорофора в составе R-AgTx<sub>2</sub>, что подтверждено сравнением результатов повторных измерений одних и тех же сферопластов. Линейная зависимость интенсивности флуоресценции R-AgTx<sub>2</sub> от мощности лазера была подтверждена экспериментально.

Контролируя интактность приготовленных сферопластов, флуоресцентные изображения измеряли при диаметре конфокальной диафрагмы, соответствующей 0,5-1 диаметра диска Эри. Эти условия измерения обеспечивали высокое аксиальное разрешение (0,45-1,5 мкм), необходимое для подтверждения мембранного связывания R-AgTx<sub>2</sub> и отсутствия проникновения лиганда в цитоплазму клеток (рис. 17).

Для количественного анализа связывания R-AgTx<sub>2</sub> на мембране сферопластов измерения проводили при диаметре конфокальной диафрагмы 2,3 диска Эри. В этих условиях конфокальный микроскоп регистрирует сигнал от слоя образца больше, чем диаметр сферопластов (1-1,5 мкм), обеспечивая измерение всей флуоресценции, ассоциированной с каждой клеткой (рис. 17). Дополнительно такой режим измерений позволяет скомпенсировать влияние небольшого разброса в положении центров сферопластов по оси z на измеряемый сигнал.

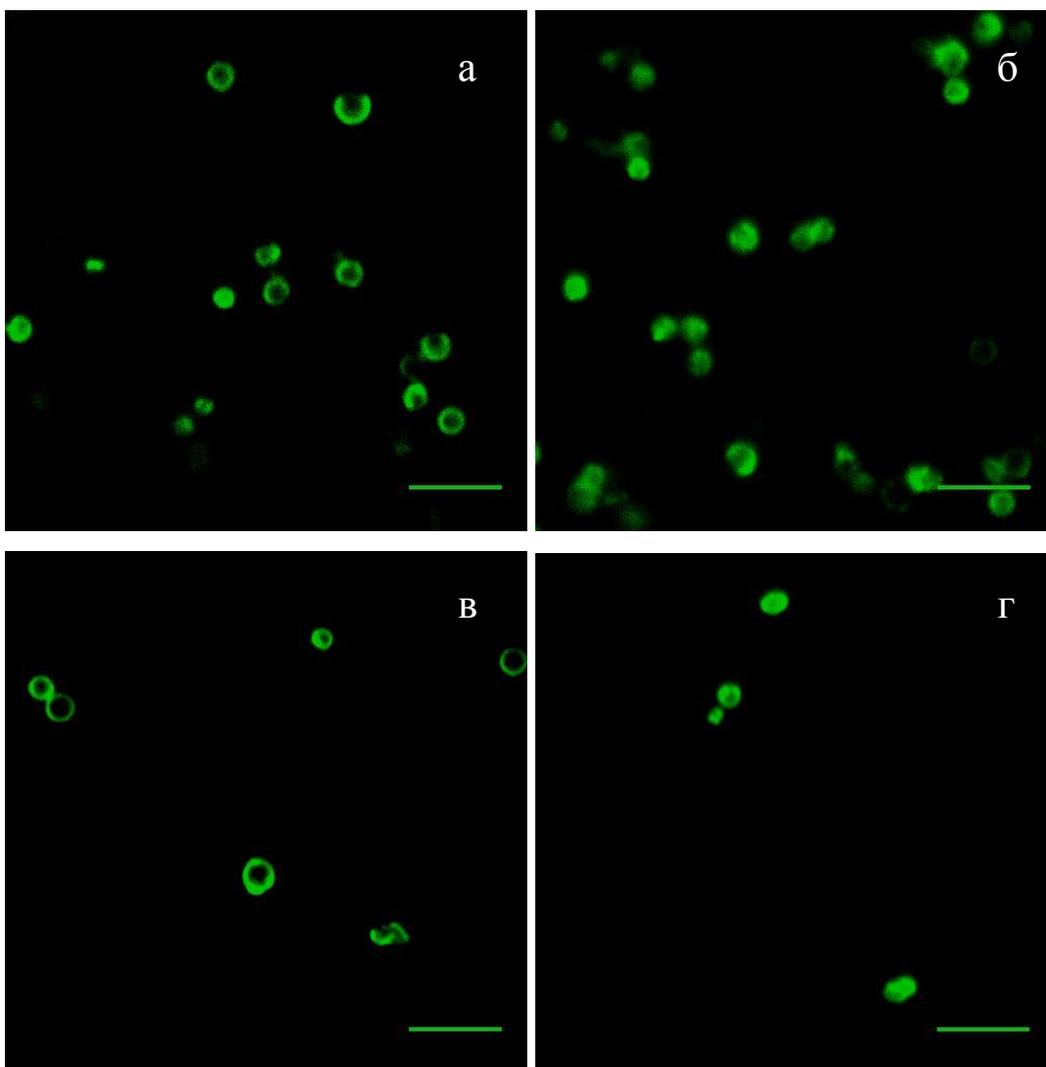


Рис. 17. Связывание R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.1 (а, б) и KcsA-Kv1.3 (в, г) в составе мембраны сфероластов в зависимости от диаметра конфокальной диафрагмы - 1 (а, в) и 2,3 (б, г) диска Эри. Увеличение диаметра конфокальной диафрагмы обеспечивает измерение всей флуоресценции, ассоциированной с каждой клеткой. Метка масштаба 4 мкм.

### 3.1.2. Разработка методики измерения констант диссоциации комплексов лигандов с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6)

На первом этапе работы была разработана методика количественной оценки связывания R-AgTx2 с гибридными белками в составе мембраны сфероластов на примере гибридного белка KcsA-Kv1.3.

Для оценки константы диссоциации ( $K_d$ ) комплексов R-AgTx2 и KcsA-Kv1.3 были измерены зависимости насыщения связывания R-AgTx2 при различных концентрациях сферопластов (и соответственно KcsA-Kv1.3). Результаты представлены в виде зависимости  $I_{cp}$  от концентрации R-AgTx2 (рис. 18).

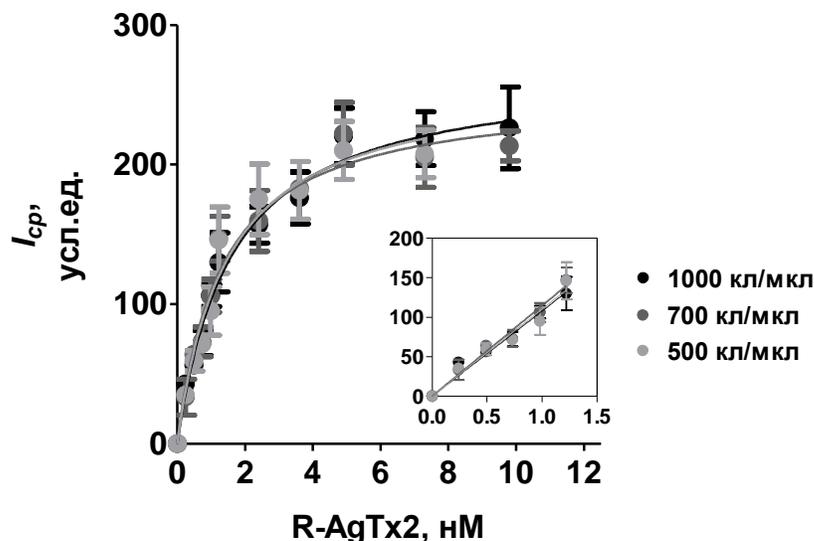


Рис. 18. Зависимости насыщения связывания R-AgTx2 с KcsA-Kv1.3 при различной концентрации сферопластов. На вставке приведены результаты, полученные в диапазоне низких концентраций R-AgTx2 (0-1,5 нМ).

Установлено, что экспериментально измеренные зависимости с высокой точностью могут быть описаны в приближении одного центра связывания функцией Хилла при помощи алгоритма нелинейной регрессии по формуле:

$$I_{cp}([L]) = (I_{max} \times [L]) / (K_d + [L]) \quad (1),$$

где  $I_{max}$  – значение параметра  $I_{cp}$  при насыщении связывания,  $[L]$  – концентрация R-AgTx2,  $K_d$  – концентрация R-AgTx2, при которой интенсивность сигнала  $I_{cp}$  составляет 50% от  $I_{max}$ .

Применимость формулы (1) для описания экспериментальных данных означает, что взаимодействие между R-AgTx2 и KcsA-Kv1.3 может быть описано выражением:



и

$$K_d = ([L] - [L_b])([R] - [R_b])/[LR] \quad (3),$$

где  $[L]$  и  $[L_b]$  концентрации добавленного и связавшегося R-AgTx2,  $[R]$  и  $[R_b]$  концентрации добавленного и связавшегося KcsA-Kv1.3 соответственно,  $[LR]$  концентрация образовавшихся комплексов.

Выражение (3) может быть преобразовано в (1) при соблюдении условия, что  $[L] \gg [R]$  и  $[LR]/[R] = I_{cp}([L])/I_{max}$ . Как было показано ранее [182] на один сфероласт приходится порядка  $10^5$  копий KcsA-Kv1.3. Таким образом, условия эксперимента (рис. 18), при котором  $[L]$  варьирует в диапазоне 0,25–10 нМ, а концентрация  $[R]$  равна 0,08, 0,12 или 0,17 нМ не противоречат условию  $[L] \gg [R]$ . Совпадение измеренных зависимостей (рис. 1) при разных концентрациях сфероластов (500-1000 кл/мкл) подтверждает, что титрование проводилось при  $[L] \gg [R]$  и поэтому не зависело от  $[R]$ .

Важно отметить, что даже при высокой плотности гибридных белков KcsA-Kv1.3 в мембране сфероластов не наблюдается эффекта кооперативности связывания (положительного или отрицательного), что говорит о том, что образование комплексов не влияет на способность соседних гибридных белков связывать лиганды.

В результате проведенных экспериментов была определена константа диссоциации ( $K_d$ ) комплексов R-AgTx2 и KcsA-Kv1.3 равная  $1,4 \pm 0,2$  нМ.

Уровни экспрессии гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,6) в мембране сферопластов были в 10-15 раз ниже, чем для KcsA-Kv1.3. Поэтому в экспериментах с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,6) концентрацию сферопластов можно было увеличить в 10 раз, по сравнению с аналогичными экспериментами с KcsA-Kv1.3, не нарушая при этом условия  $[L] \gg [R]$ . Повышенная концентрация сферопластов позволила упростить и ускорить статистический набор данных от клеток.

Были измерены зависимости насыщения связывания R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,6) и аппроксимированы согласно протоколу, разработанному на примере KcsA-Kv1.3 (рис. 19). Значения  $K_d$  для комплексов R-AgTx2 с KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.6 составили соответственно  $3,4 \pm 0,9$  нМ и  $4,7 \pm 1,9$  нМ.

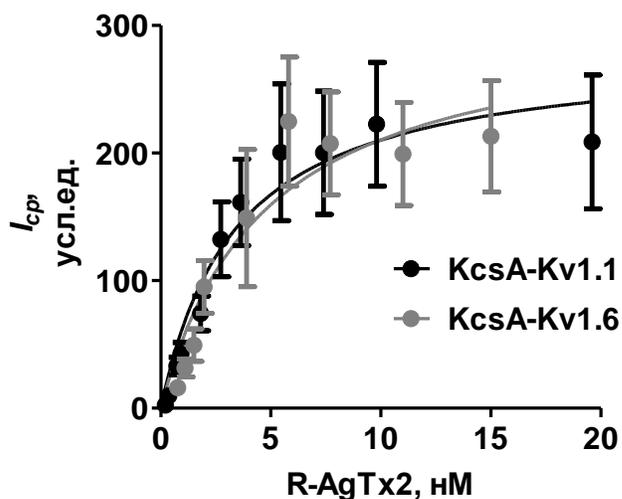


Рис. 19. Зависимости насыщения связывания R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.6 на поверхности мембраны сферопластов.

На втором этапе была разработана методика оценки аффинности немеченных Kv1-лигандов при измерениях методом конкурентного ингибирования связывания.

Были измерены зависимости конкурентного связывания AgTx2 и R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) (рис. 20).

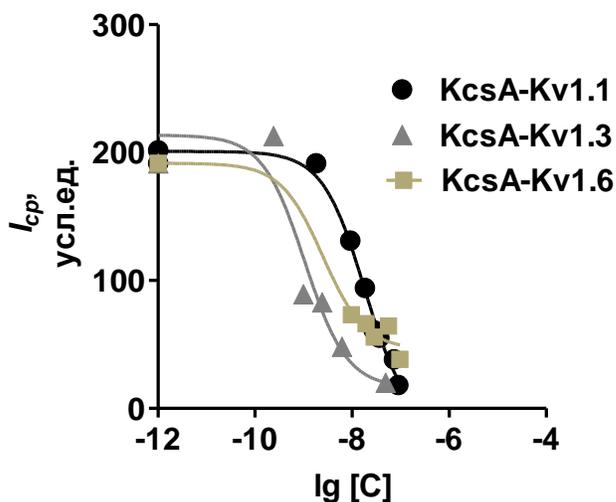


Рис. 20. Концентрационные зависимости вытеснения R-AgTx2 из комплексов с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) немеченным лигандом AgTx2. Концентрация R-AgTx2 – 9,1 нМ (KcsA-Kv1.1), 4,9 нМ (KcsA-Kv1.3) и 5,5 нМ (KcsA-Kv1.6). [C] – концентрация AgTx2, М.

Для определения концентрации AgTx2, которая приводит к вытеснению 50% R-AgTx2 из комплексов с гибридными белками ( $IC_{50}$ ) экспериментальные данные аппроксимировали в приближении одного центра связывания с помощью алгоритма нелинейной регрессии по формуле:

$$I_{cp} = I_m / (1 + 10^{(\lg[C] - \lg IC_{50})}) \quad (4),$$

где  $C$  – концентрация добавленного лиганда, а  $I_m$  численно равна  $I_{cp}$  при  $[C]=0$ .

Для расчета кажущейся константы диссоциации ( $K_{ap}$ ) конкурирующих (немеченых) лигандов использовали уравнение Ченга-Прусова:

$$K_{ap} = IC_{50} / (1 + [L^*] / K_d) \quad (5),$$

где  $IC_{50}$  – концентрация исследуемого лиганда, которая приводит к вытеснению 50% R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.3,  $[L^*]$  – равновесная концентрация свободного R-AgTx2, которая при выполнении условия  $[L_b] \ll [L^*]$  принимается равной концентрации добавленного R-AgTx2 ( $[L]$ ).

Полученные значения  $K_{ap}$  для AgTx2 представлены в табл. 4. Видно, что AgTx2 взаимодействует с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) с наномолярной аффинностью; сродство к поровой части каналов убывает в ряду KcsA-Kv1.3 > KcsA-Kv1.6 > KcsA-Kv1.1. По сравнению с флуоресцентно-меченым аналогом AgTx2 связывается с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) лучше в 0,75, 6,7 и 3,9 раз, соответственно. Снижение аффинности R-AgTx2 к KcsA-Kv1.x (x=3,6) по сравнению с AgTx2 объясняется стерическими затруднениями, вызванными присутствием флуоресцентной метки. В случае KcsA-Kv1.1 метка не мешает связыванию R-AgTx2.

### **3.2. Разработка состава и оптимизация свойств компонентов клеточных систем. Разработка протоколов подготовки компонентов к измерениям.**

Разработанный метод анализа взаимодействия лигандов калиевых каналов Kv1 с гибридными белками в составе мембраны сферопластов был использован для создания биоинженерных бактериальных клеточных систем поиска и изучения лигандов Kv1-каналов.

#### **3.2.1. Оптимизация экспрессии гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе мембраны *E. coli***

В основе разрабатываемых клеточных систем лежит высокоэффективная экспрессия в мембране бактерий *E. coli* гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). Впервые гибридные белки KcsA-Kv1.x (x=1-6) были получены группой французских ученых в 2000 году путем встраивания участка Р-петли калиевых каналов человека Kv1.x (x=1-6) в гомологичный участок бактериального канала

KcsA [185]. Участок Р-петли калиевых каналов принимает активное участие в связывании пептидных блокаторов и отвечает за избирательность взаимодействия пептид-канал. Показано, что гибридные белки сохраняют способность связывать поровые блокаторы Kv1-каналов в составе мицелл детергента [185,186]. В нашей работе мы использовали гибридные белки для создания методами биоинженерии бактериальных линий клеток, экспрессирующих эти белки в плазматической мембране в тетрамерной форме, способной связывать лиганды Kv1-каналов. Схема конструирования гибридных конструкций и первичная последовательность пересаженных участков эукариотических каналов Kv1.x (x=1,3,6) приведены на рис. 21.

KcsA            AERGAPGAQLITYPRALWWSVETATTVGYGDLYP  
KcsA-Kv1.1    AEAEEAESHFSSIPDALWWSVETATTVGYGDLYP  
KcsA-Kv1.3    AEADDPTSFGSSIPDALWWSVETATTVGYGDLYP  
KcsA-Kv1.6    AEADDDDSLFPSSIPDALWWSVETATTVGYGDLYP

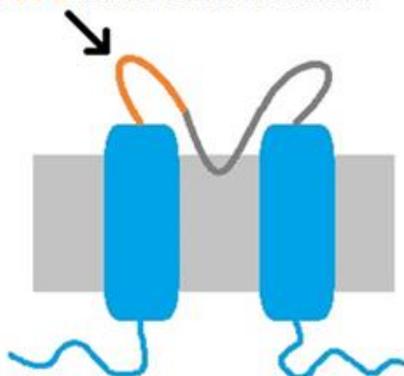


Рис. 21. Схема переноса участка Р-петли калиевых каналов человека Kv1.x (1,3,6) в гомологичный участок бактериального канала KcsA. Приведены аминокислотные последовательности участка поровой Р-петли каналов KcsA и гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). Оранжевым цветом выделен пересаженный участок, который является сайтом связывания лигандов эукариотических каналов Kv1.x (x=1,3,6).

Для экспрессии гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) полученные гены клонировали в вектор pET28a и трансформировали культуру клеток *E. coli* штамма BL21(DE3). Проведен отбор клонов с максимальным уровнем

экспрессии целевых белков. Отбор клонов выполняли на основе анализа уровня биосинтеза гибридного белка методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. Дополнительно для этих клонов контролировали встраивание гибридных белков мембрану клеток по способности связывать R-AgTx2. На основе отобранных клонов были получены штаммы продуценты со стабильным уровнем биосинтеза гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) и высокой представленностью этих белков на мембране клеток. Хранение штаммов-продуцентов осуществляется при -80°C в 15% растворе глицерина. Оценка жизнеспособности штаммов-продуцентов и их обновление в хранилище производится не реже 1 раза в год.

Оптимальные условия выращивания клеток *E. coli*, экспрессирующих гибридный белок KcsA-Kv1.3 (Табл. 1), были определены ранее [182]. В этих условиях обеспечивается образование приблизительно  $10^5$  копий белка KcsA-Kv1.3, встроенного в мембрану и способного связывать лиганды Kv1.3.

При подборе условий высокой экспрессии белков KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.6 в клетках *E. coli* варьировали следующие параметры: состав среды, концентрацию индуктора (ИПТГ), точку индукции, температуру и время выращивания клеток.

По результатам оптимизации условий выращивания клеток *E. coli*, экспрессирующих гибридный белок KcsA-Kv1.1, оказалось, что максимум биосинтеза целевого белка достигается при тех же параметрах, что и в случае KcsA-Kv1.3 (Табл. 3). В то же время при оптимальных условиях выращивания клеток уровень биосинтеза белка KcsA-Kv1.1 оказывается в 1,3 раз ниже, чем белка KcsA-Kv1.3 (рис. 15). Кроме того, количество копий белка KcsA-Kv1.1, встроенного в мембрану и способного связывать лиганды Kv1.1, уменьшается в 8 раз по сравнению с клетками, экспрессирующими KcsA-Kv1.3 (рис. 15). Значительное снижение экспрессии KcsA-Kv1.1 на мембране сферопластов по сравнению с KcsA-Kv1.3 не является проблемой, т.к. позволило увеличить

концентрацию клеток, на которых проводятся измерения, соблюдая при этом условие  $[R] \ll [L]$ . Наличие в поле зрения объектива микроскопа большего числа клеток (50-100 шт. в кадре) дало возможность ускорить набор данных, необходимых для статистически достоверного анализа.

При оптимальных условиях выращивания клеток с KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.3 (Табл. 3) уровни экспрессии белков KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.6 в тотальном клеточном лизате были сопоставимы, однако белок KcsA-Kv1.6 имел очень низкий уровень встраивания в мембрану. Поэтому для KcsA-Kv1.6 была проведена дополнительная работа по поиску условий, усиливающих встраивание этого белка в мембрану. В качестве маркера мембранного встраивания KcsA-Kv1.6 использовали измерение числа комплексов, которые могут быть образованы между R-AgTx2 и гибридными белками в составе мембраны сферопластов. В результате проведенных исследований удалось определить условия выращивания клеток, обеспечивающие высокий стабильный уровень мембранной экспрессии KcsA-Kv1.6, необходимый для разработки бактериальной клеточной системы.

Оптимальные условия выращивания штаммов продуцентов гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) представлены в табл. 3. Белковый форез тотального клеточного лизата штаммов-продуцентов приведен на рис. 22.

Табл. 3. Оптимальные условия экспрессии гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в клетках *E. coli* штамма BL21DE3.

Гибридный белок	Среда	Концентрация индуктора ИПТГ, мкМ	Точка индукция, о.е.	Температура выращивания, °С	Время выращивания, ч
KcsA-Kv1.1	LB	50	0,9	37	22

KcsA- Kv1.3	LB	50	0,9	37	22
KcsA- Kv1.6	LB	50	0,6-0,7	25	22

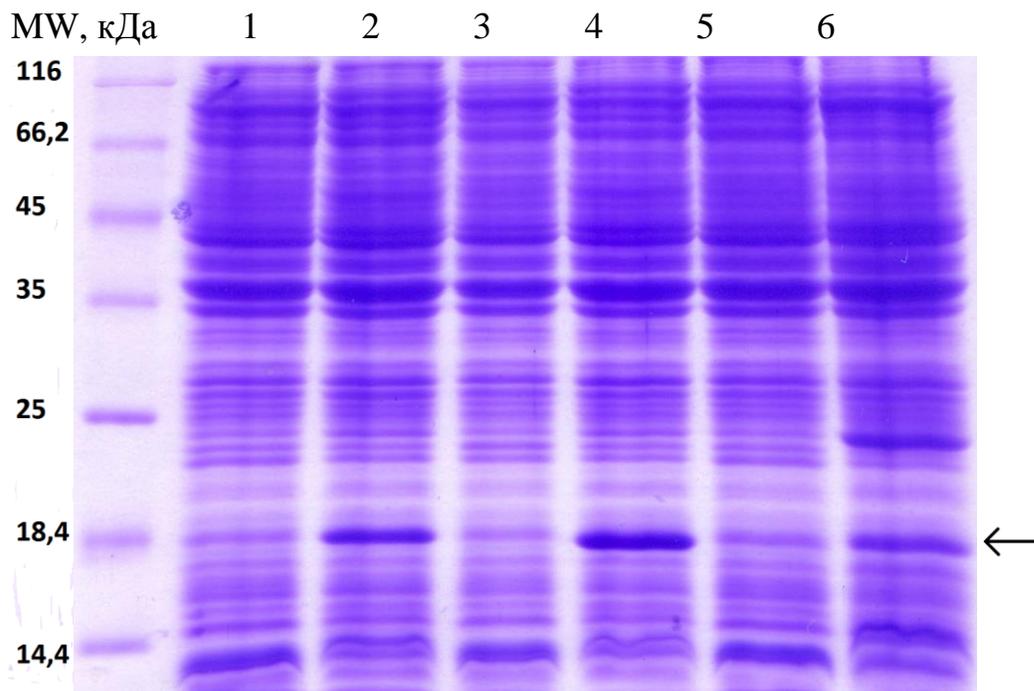


Рис. 22. Разделение белков клеточного лизата *E. coli* BL21(DE3), продуцирующих белки KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), методом электрофореза в денатурирующем 13,5% полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ). Дорожки 1, 3, 5 – лизат клеток с плазмидами соответственно KcsA-Kv1.1, KcsA-Kv1.3, KcsA-Kv1.6 до индукции ИПТГ, дорожки 2, 4, 6 – те же образцы спустя 22 ч после индукции ИПТГ. Стрелкой отмечена полоса мономера белка KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). Условия выращивания клеток с KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) смотри в табл. 3.

Полученные бактериальные клетки были подвергнуты процедуре приготовления сферопластов. Процедура включала стадии обработки ЭДТА и лизоцимом. Однородность приготовленных сферопластов оценивали методами оптической микроскопии, как описано в разделе 3.1.1. Протокол приготовления

сферопластов был разработан ранее для клеток, экспрессирующих KcsA-Kv1.3 [182], и описан в разделе 2.3 главы Материалы и методы. Проведенные исследования подтвердили эффективность этого протокола для клеток, экспрессирующих KcsA-Kv1.x (x=1, 6).

### **3.2.2. Изучение влияния компонентов буфера на результаты измерений связывания лигандов с гибридными белками Kv1.x (x=1,3,6)**

Компоненты клеточного буфера могут модулировать взаимодействия лигандов с ионными каналами. Поэтому мы изучили влияние компонентов буфера на связывание R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) на поверхности сферопластов.

Согласно опубликованным данным [187] для поддержания осмотического баланса бактериальные сферопласты рекомендуется хранить в буфере с высокой концентрацией сахарозы (0,1-0,5 М). На примере R-AgTx2 и KcsA-Kv1.3 мы исследовали влияние сахарозы на взаимодействие лигандов с гибридными белками. Нами установлено, что сахароза в диапазоне концентраций 0-0,5 М не влияет на связывание R-AgTx2 с KcsA-Kv1.3 (рис. 23). При этом подтверждено, что присутствие сахарозы в буфере стабилизирует сферопласты, в результате чего время хранения препарата сферопластов без потери их свойств повышается до 14 дней. Для проведения экспериментов была выбрана концентрация сахарозы 0,25 М.

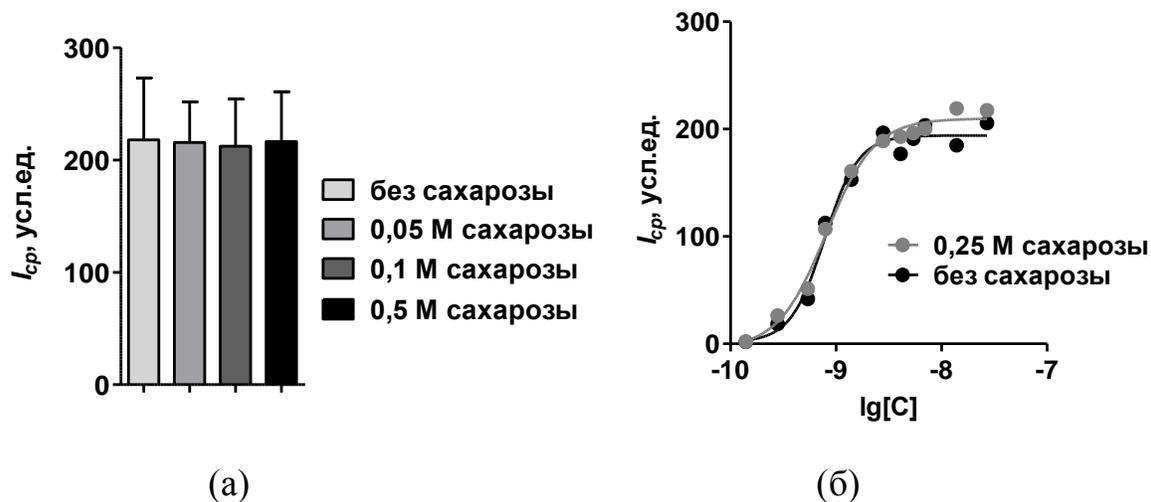


Рис. 23. Связывание R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.3 при различной концентрации сахарозы в буфере (а). Зависимость параметра  $I_{cp}$  от концентрации добавленного R-AgTx2 в присутствии 0,25 М сахарозы и в отсутствии сахарозы в буфере (б). Состав буфера для связывания: 50 мМ Трис-НCl, pH 7,5, 0,3 мМ ЭДТА, 2 мМ KCl, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% БСА.

Было изучено влияние концентрации KCl в буфере на связывание R-AgTx2 с гибридным белком KcsA-Kv1.3 (рис. 24а). Обнаружено, что KCl влияет на величину сигнала флуоресценции R-AgTx2 при насыщении связывания с KcsA-Kv1.3 ( $I_{max}$ ). Как было указано выше, данный параметр отражает максимальное число комплексов, которые могут быть образованы между R-AgTx2 и гибридными белками на мембране. Исходя из полученных результатов, при концентрации KCl 2-20 мМ содержание гибридных белков, принимающих лиганд-связывающую конформацию, достигает максимума. При отсутствии KCl доля белков, находящихся в лиганд-связывающей конформации, заметно снижается. Согласно оценке соотношение между гибридными белками, которые связывают и не связывают лиганд, составляет в этом случае 1:1,6.

Результаты эксперимента по изучению влияния KCl на способность R-AgTx2 образовывать комплексы с гибридными белками KcsA-Kv1.1

представлены на рис. 24б. Анализ колоколообразной зависимости свидетельствует о том, что: (1) присутствие небольшой концентрации ионов калия увеличивает связывание R-AgTx2; (2) оптимум связывания приходится на 2-25 мМ KCl; (3) концентрация KCl в буфере свыше 25 мМ приводит к снижению связывания R-AgTx2.

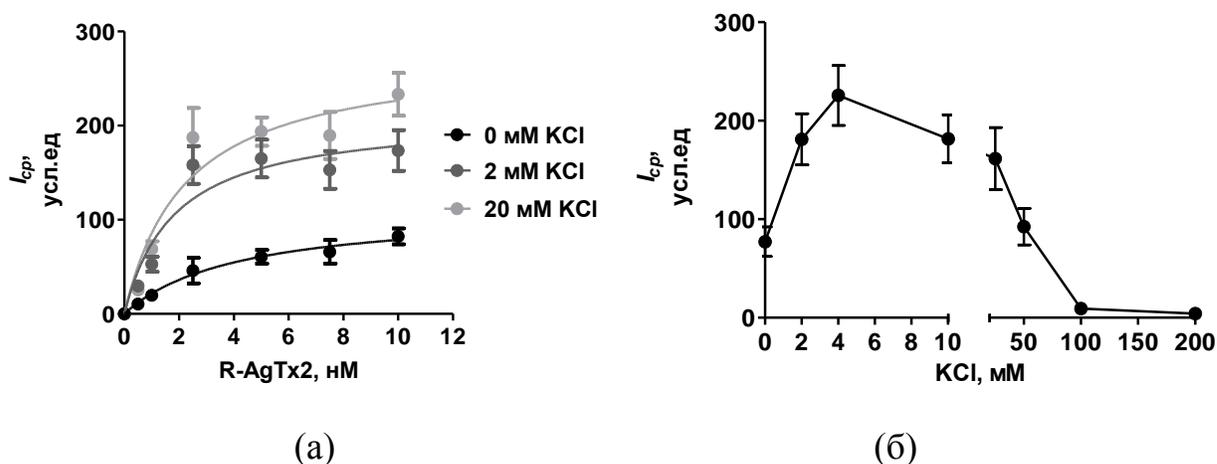


Рис. 24. Связывание R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.3 при разной концентрации KCl в буфере (а). Влияние концентрации KCl на связывание R-AgTx2 (19 нМ) с гибридным белком KcsA-Kv1.1 (б). Состав буфера: 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,25 М сахароза, 0,3 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% БСА.

Было доказано, что влияние KCl на связывание лигандов опосредовано именно ионами калия, а не изменением общей осмолярности или ионной силы раствора. Для этого измерили максимальное число комплексов, которые могут быть образованы между R-AgTx2 и KcsA-Kv1.3, при фиксированной концентрации KCl 2 мМ и других компонентов буфера, и изменяемой концентрации NaCl – 48, 50 и 68 мМ. При изменении концентрации ионов натрия различий в связывании R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.3 обнаружено не было. Для всех последующих экспериментов была выбрана

концентрация KCl – 4 мМ, как обеспечивающая наилучшее связывание лигандов и соответствующая физиологическим значениям.

Обнаружено, что повышение концентрации NaCl в буфере ведет к снижению максимального числа комплексов, которые могут быть образованы между R-AgTx2 и гибридными белками (рис. 25). Методика количественного анализа взаимодействия лигандов с гибридными белками предполагает избыток концентрации лиганда над рецептором, поэтому в данном случае снижение концентрации доступных для связывания лигандов гибридных белков не критично. Эта особенность, связанная с повышением ионной силы раствора, наиболее заметно проявляется в случае гибридного белка KcsA-Kv1.1 и менее существенна в случае KcsA-Kv1.3 и KcsA-Kv1.6. В большинстве проведенных нами исследований концентрация NaCl в буфере составляла 50 мМ.

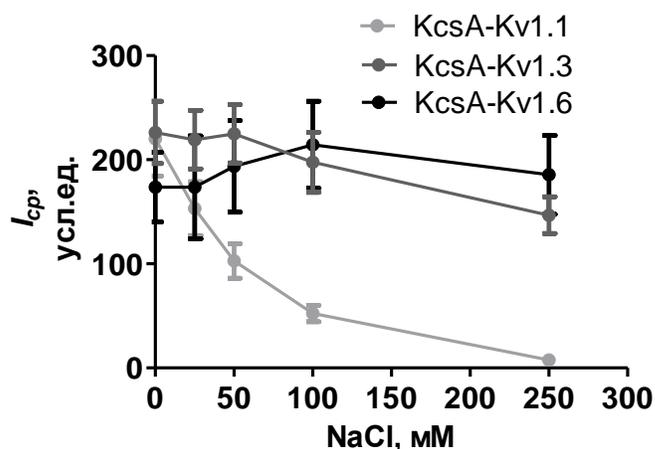


Рис. 25. Влияние концентрации NaCl на связывание R-AgTx2 (6 нМ) с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). Состав буфера: 50 мМ Трис-HCl, pH 7,5, 0,25 М сахараза, 0,3 мМ ЭДТА, 4 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% БСА.

Были измерены зависимости насыщения связывания R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) при высокой и низкой ионной силе (рис. 26). Установлено, что возрастание ионной силы буфера не только приводит к снижению максимального числа комплексов между R-AgTx2 и

гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,6) на поверхности сферопластов, но также оказывает влияние на константу диссоциации R-AgTx2. Аффинность R-AgTx2 к гибридным белкам KcsA-Kv1.x (x=1,6) при снижении ионной силы буфера возрастают соответственно в 2,3 и 1,6 раза. Аффинность R-AgTx2 к гибриднему белку KcsA-Kv1.3 не меняется.

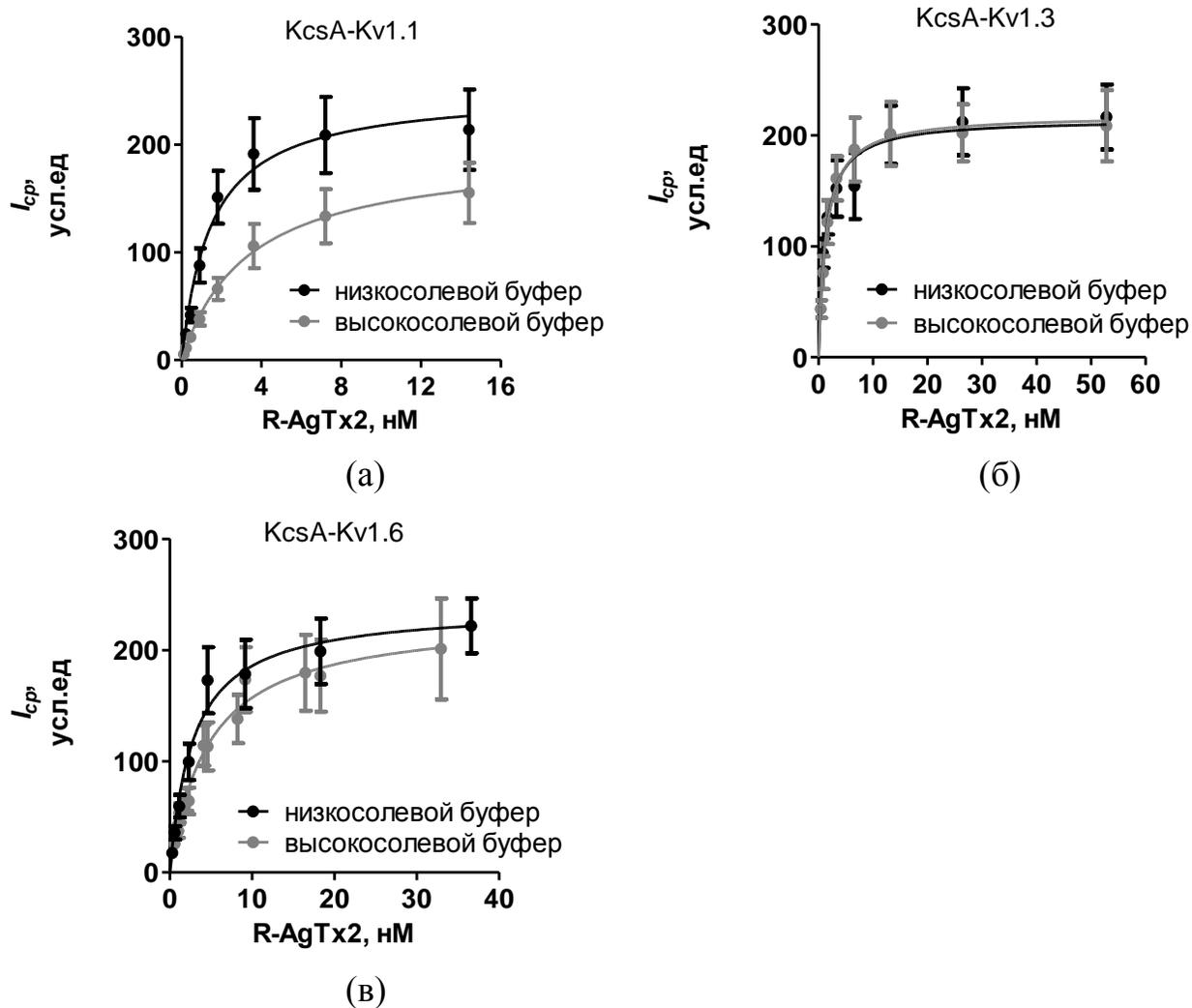


Рис. 26. Связывание R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.1 (а), KcsA-Kv1.3 (б), KcsA-Kv1.6 (в) в буферах разного состава. Высокосолевой буфер: 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,25 М сахараза, 0,3 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl, 4 мМ KCl,

10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% БСА. Низкосолевой буфер: 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,25 М сахараза, 0,3 мМ ЭДТА, 0 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% БСА.

Показано, что отсутствие в буфере ионов магния приводит к слипанию сферопластов, что затрудняет анализ изображений сферопластов. Зависимости числа образующихся комплексов между R-AgTx2 и KcsA-Kv1.3 от концентрации ионов магния в диапазоне 0-10 мМ не обнаружено.

### **3.3. Характеристика специфичности взаимодействия клеточных систем с известными лигандами Kv1-каналов**

Разработанные клеточные системы были охарактеризованы по специфичности связывания лигандов каналов Kv1.x (x=1,3,6).

Был исследован набор известных лигандов Kv1 каналов, включающий низкомолекулярные соединения ТЭА и 4-АП, а также высокоаффинные пептидные блокаторы из ядов скорпионов AgTx2, КТХ и OSK1. Были получены данные по конкурентному связыванию Kv1-лигандов и R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) (рис. 27). Обнаружено, что КТХ, AgTx2 и OSK1 конкурируют с R-AgTx2 за связывание с KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в наномолярном диапазоне концентраций, ТЭА – в милимолярном диапазоне, а 4-АП не влияет на образование комплексов между R-AgTx2 и KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) даже при высоких концентрациях (50 мМ). Вычисленные значения  $K_{ap}$  приведены в табл. 4.

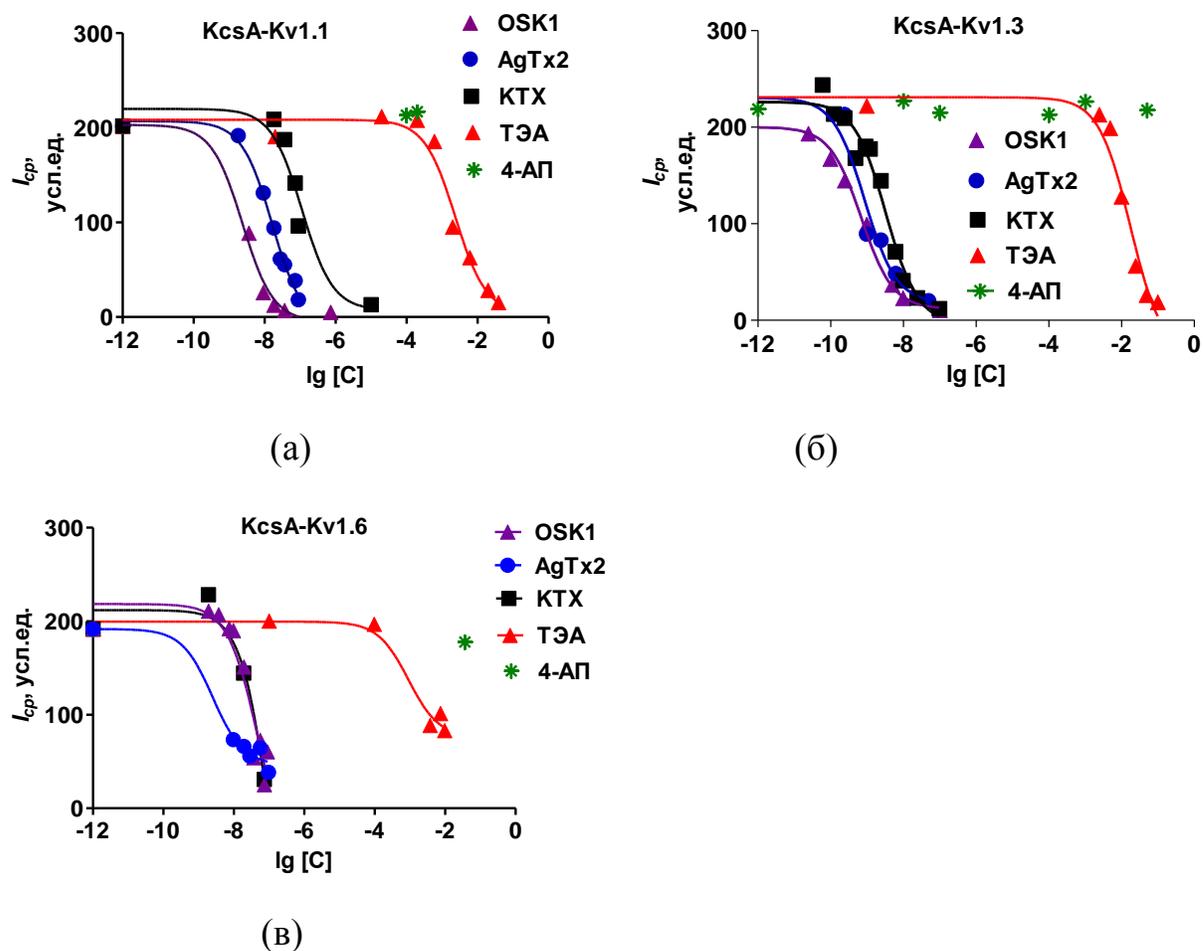


Рис. 27. Вытеснение R-AgTx2 Kv1-лигандами из комплексов с гибридными белками KcsA-Kv1.1 (а), KcsA-Kv1.3 (б) и KcsA-Kv1.6 (в). [C] – концентрация лигандов, М.

Табл. 4. Аффинность лигандов Kv1 к природным каналам Kv1.x (x=1,3,6) и гибридным белкам KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), измеренная различными методами.

	$K_{ap}$ , нМ			$K_d$ , нМ		
	KcsA-Kv1.1 <sup>а</sup>	KcsA-Kv1.3 <sup>а</sup>	KcsA-Kv1.6 <sup>а</sup>	Kv1.1	Kv1.3	Kv1.6
AgTx2	4,5±1,2	0,21±0,10	1,2±0,5	0,13 <sup>б</sup>	0,2 <sup>д</sup>	0,036 <sup>и</sup>
OSK1	0,64±0,18	0,16±0,10	23±11	0,6 <sup>в</sup>	0,014 <sup>в</sup>	Нет данных
KTX	31±9	0,78±0,10	63±38	41 <sup>г</sup> 1,1 <sup>е</sup>	0,65 <sup>д</sup> 0,1 <sup>е</sup>	Нет данных

				14 <sup>ж</sup>	2 <sup>ж</sup>	
ТЭА	$(0,6 \pm 0,2) \times 10^6$	$(12 \pm 5) \times 10^6$	$(0,4 \pm 0,2) \times 10^6$	$0,3 \times 10^{6\Gamma}$ $(0,52 \pm 0,08) \times 10^{6^3}$	$(8 \pm 3) \times 10^{6Д}$	$(2,8 \pm 0,2) \times 10^6$ <sub>3</sub>
4-АП	$>5 \times 10^6$	$>0,2 \times 10^6$	$>36 \times 10^6$	$0,29 \times 10^{6\Gamma}$	$0,19 \times 10^{6Д}$	$(0,3-1,5) \times 10^6$

<sup>а</sup> Результаты наших измерений для KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в сферопластах

<sup>б</sup> Данные метода Patch-clamp для каналов Kv1.1 крысы, экспрессированных в ооцитах ксенюса [188].

<sup>в</sup> Данные метода Patch-clamp для каналов Kv1.1, экспрессированных в мышинных клеточных линиях [122].

<sup>г</sup> Данные метода Patch-clamp для мышинных каналов Kv1.1, экспрессированных в клеточной линии L929 [189].

<sup>д</sup> Данные метода Patch-clamp для каналов Kv1.3 [190].

<sup>е</sup> Данные метода Patch-clamp для каналов Kv1.1 и Kv1.3, экспрессированных в ооцитах ксенюса [191].

<sup>ж</sup> Данные метода Patch-clamp для каналов Kv1.1 и Kv1.3, экспрессированных в клетках млекопитающих [191].

<sup>з</sup> Данные метода Patch-clamp для каналов Kv1.1 и Kv1.6, экспрессированных в ооцитах ксенюса [192].

<sup>и</sup> Данные метода Patch-clamp для каналов Kv1.6, экспрессированных в ооцитах ксенюса [193].

4-АП не конкурирует с R-AgTx2 за связывание с внеклеточным участком линкера S5-S6 гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), поскольку область связывания этой молекулы расположена с внутриклеточной стороны поры канала [16].

Для ТЭА существует два сайта связывания, расположенных на внешней и внутренней стороне порового отверстия Kv1-каналов [194]. Поскольку области связывания R-AgTx2 и ТЭА частично перекрываются, разработанные клеточные системы с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) подходят для обнаружения ТЭА и измерения его аффинности к внешнему сайту связывания.

Пептидный блокатор OSK1 – наиболее активный из исследованных лигандов канала Kv1.3. Ранее было показано [122], что OSK1 при концентрации 14 пМ вызывает 50% ингибирование тока калия через мышинные каналы Kv1.3, экспрессированные в культуре клеток мышей. В нашей системе он в 10 раз

менее активен. Одной из возможных причин расхождения в результатах может быть разница в аминокислотной последовательности петли S5-S6 у гибридного белка KcsA-Kv1.3 и мышинового канала Kv1.3. Другим объяснением разброса в полученных значениях  $K_d$  может быть различие в ряде экспериментальных факторов, таких как концентрация ионов калия в среде, ионная сила буфера, тип клеток, экспрессирующих каналы Kv1.3. К примеру, аффинность пептида КТХ различается на порядок при экспрессии канала Kv1.3 в клетках линии Jurkat или в ооцитах ксенопуса, и в 200 раз при тестировании изолированных каналов Kv1.3 при 0 и 100 мМ NaCl (в 5 мМ KCl, 20 мМ Трис-HCl) [186].

Отметим, что активность AgTx2 на изолированных белках KcsA-Kv1.3 в 30 раз ниже, чем на сферопластах, в то время как активность КТХ на изолированных гибридных белках KcsA-Kv1.3 в 5 раз выше, чем на сферопластах [185]. Аффинность всех протестированных лигандов, за исключением ТЭА, при связывании с KcsA-Kv1.1 была равна или ниже аффинности к KcsA-Kv1.3, что соответствует опубликованным данным (табл 1). Значения  $K_{ap}$  ТЭА для KcsA-Kv1.1 в 20 раз выше, чем для KcsA-Kv1.3, а согласно более ранним результатам patch-clamp аффинность ТЭА к каналам Kv1.1 и Kv1.3 отличается в 14-25 раз. Полученные результаты подтверждают, что в отношении гибридного белка KcsA-Kv1.1 в составе мембраны сферопластов сохраняется профиль специфичности связывания лигандов характерный для канала Kv1.1.

В отличие от каналов Kv1.1 и Kv1.3 профиль специфичности лигандов канала Kv1.6 исследован мало. Существуют данные об аффинности ТЭА и AgTx2 к Kv1.6. В нашей системе ТЭА связывается с KcsA-Kv1.6 в 30 раз лучше по сравнению с KcsA-Kv1.3 и в 1,5 раз лучше по сравнению с KcsA-Kv1.1. Согласно опубликованным результатам аффинность ТЭА к каналу Kv1.6 лучше в 2,7 раза по сравнению с каналом Kv1.3 и хуже в 5-9 раз по сравнению с каналом Kv1.1. Опубликована только одна работа по измерению  $K_d$  AgTx2 к

каналу Kv1.6 [193]. Однако, константы диссоциации AgTx2, полученные в данной работе для Kv1-каналов, не повторились впоследствии в других исследованиях, что вынуждает с подозрением относиться к достоверности результатов для канала Kv1.6. Наличие аффинности токсинов скорпионов OSK1 и KTX к поровому участку канала Kv1.6 была продемонстрирована в данной работе впервые.

### **3.4. Анализ структурных особенностей взаимодействия пептидов AgTx2, KTX и OSK1 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6)**

Гибридные белки KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), различающиеся всего на 6 а.о. в участке S5-P-линкера, но сохраняющие профиль специфичности связывания лигандов каналов Kv1.x (x=1,3,6) человека, – удобный инструмент для структурно-функционального исследования.

Все изученные в работе пептидные лиганды каналов Kv1 (AgTx2, KTX, OSK1) принадлежат к группе  $\alpha$ -КТх3 токсинов скорпионов. Вторичная и в значительной степени третичная структура токсинов данной группы консервативна [138]. Она включает участок альфа-спирали, связанный с двумя антипараллельными  $\beta$ -листами ( $\beta$ 2 и  $\beta$ 3) при помощи двух дисульфидных связей. На N-концевом участке токсина расположена еще одна область  $\beta$ -структуры ( $\beta$ 1), соединенная третьей дисульфидной связью с  $\beta$ 3-листом (рис. 28). При образовании комплексов с каналами вторичная структура пептидов не претерпевает значимых изменений [195].

Пептиды KTX и AgTx2 различаются между собой по четырем а.о., а от OSK1 – соответственно по семи и девяти а.о. (табл. 5). Интересно, что аминокислотные различия между токсинами расположены преимущественно в области  $\beta$ 1- и  $\alpha$ -структур и не затрагивают область структуры  $\beta$ 2, которая непосредственно контактирует с поверхностью канала и содержит такие функционально важные остатки как R24 и K27 [196].

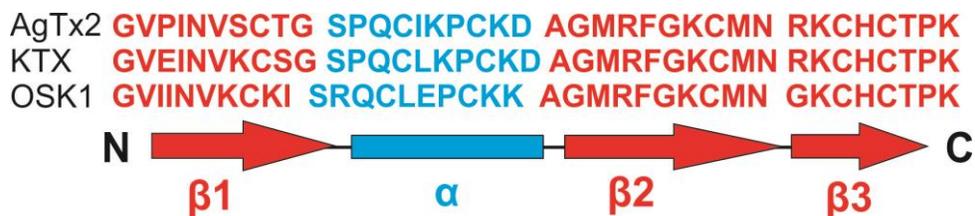


Рис. 28. Первичная и вторичная структура токсинов скорпионов группы  $\alpha$ -КТх3, которые были исследованы в данной работе.

Табл. 5. Различающиеся а.о. токсинов группы  $\alpha$ -КТх3, которые были исследованы в данной работе. Расположение а.о. по столбцам отражает их представленность в элементах вторичной структуры пептидов.

	$\beta 1$	$\alpha$	$\beta 3$
AgTx2 $\rightarrow$ OSK1	P3 $\rightarrow$ I3 S7 $\rightarrow$ K7 T9 $\rightarrow$ K9 G10 $\rightarrow$ I10	P12 $\rightarrow$ R12 I15 $\rightarrow$ L15 K16 $\rightarrow$ E16 D20 $\rightarrow$ K20	R31 $\rightarrow$ G31
AgTx2 $\rightarrow$ KTX	P3 $\rightarrow$ E3 S7 $\rightarrow$ K7 T9 $\rightarrow$ S9	I15 $\rightarrow$ L15	
KTX $\rightarrow$ OSK1	E3 $\rightarrow$ I3 S9 $\rightarrow$ K9 G10 $\rightarrow$ I10	P12 $\rightarrow$ R12 K16 $\rightarrow$ E16 D20 $\rightarrow$ K20	R31 $\rightarrow$ G31

Согласно результатам, полученным в данной работе (табл. 4), OSK1 – наиболее высокоаффинный лиганд каналов Kv1.x (x=1,3,6). Замечено, что пептид OSK1 отличается от многих родственных токсинов семейства  $\alpha$ -КТх3 несколькими нетипичными а.о.: R12, E16, K20. Показано, что при замене всех трех а.о. на более консервативные а.о. (R12P, E16K, K20D), способность OSK1

блокировать ионный ток через каналы Kv1.1 и Kv1.3 снижается в 4-5 раз [122]. Интересно, что замены E16K и K20D по отдельности также снижают аффинность OSK1 в несколько раз, а вот одновременная замена E16K и K20D вызывает обратный эффект усиления связывания [122]. Пептиды AgTx2 и KTX, в отличие от OSK1, содержат консервативный для  $\alpha$ -KTx3 набор а.о. (P12, K16, D20), при этом соответствующие константы диссоциации AgTx2 и KTX при связывании с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3) в 1,3-48 раз ниже по сравнению с OSK1.

Методом ЯМР было показано, что существенный химический сдвиг при связывании KTX с гибридным каналом KcsA-Kv1.3 характерен также для L15 и E3. Авторы исследования сделали вывод, что L15 способен напрямую контактировать с поверхностью поры канала, в то время как E3 влияет на связывание токсина опосредованно через образование  $\beta$ 1- $\beta$ 3 контакта [195]. Мы полагаем, что различия в а.о. в этих двух положениях определяют разницу в аффинности KTX и AgTx2: константы диссоциации AgTx2 при связывании со всеми тремя гибридными белками выше.

Среди элементов структуры поровой P-петли каналов, наиболее важными при связывании пептидных лигандов являются область селективного фильтра и участок S5-P линкера. Область селективного фильтра – консервативная структура калиевых каналов, которая при конструировании гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) не менялась. Участок S5-P линкера, где у гибридных белков были введены аминокислотные замены, напротив, отличается повышенной вариабельностью и ответственен за специфичность узнавания токсин-канал.

Методом молекулярной динамики показано, что при связывании AgTx2 и KTX с каналом Kv1.3 контакты с токсинами образуют такие а.о. S5-P линкера, как D386 (D64 у KcsA-Kv1.3) и G380 (G58 у KcsA-Kv1.3) [197] (табл. 6).

Табл. 6. Первичная последовательность пересаженного участка S5-P линкера гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6).

Нумерация а.о.	KcsA	KcsA-Kv1.1	KcsA-Kv1.3	KcsA-Kv1.6
52	R	A	A	A
53	G	E	D	D
54	A	E	D	D
55	P	A	P	D
56	G	E	T	D
57	A	S	S	S
58	Q	H	G	L
59	L	F	F	F
60	I	S	S	P
61	T	S	S	S
62	Y	I	I	I
63	P	P	P	P
64	R	D	D	D

Исходный бактериальный канал KcsA не способен связывать токсины семейства  $\alpha$ -КТх3. Показано, что всего одна аминокислотная замена в участке S5-P линкера (R64D) увеличивает сродство AgTx2 к каналу KcsA на 3 порядка [198]. Дополнительная замена (T61S) увеличивает аффинность AgTx2 еще в 3 раза [198]. Присутствие данных замен у всех трех гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), по-видимому, объясняет высокие значения констант диссоциации исследованных токсинов семейства  $\alpha$ -КТх3 (табл. 4). Возможные контакты D64 с токсинами группы  $\alpha$ -КТх3 включают а.о. R24 и R31 [197] и R12 [199].

Еще одним ключевым а.о. пересаженного участка S5-P линкера является G58 гибридного белка KcsA-Kv1.3 (H58 и L58 соответственно у KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.6). Из литературных источников известно, что замена аналогичного

а.о. G380 у канала Kv1.3 на более объемные заместители – H380 (как в канале Kv1.1) или L380 (как в канале Kv1.6) приводит к снижению активности КТХ соответственно на 3 и 4 порядка. Снижение активности объясняется тем, что более объемные заместители мешают плотной посадке токсина на пору канала [200]. В нашей работе показано, что AgTx2, КТХ и OSK1 имеют наибольшее сродство к гибриднему белку KcsA-Kv1.3, в то время как аффинность пептидов к гибридным белкам KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.6 снижается в 4-143 раз.

Подводя итог, можно заключить, что гибридные белки KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), имеющие всего 6 аминокислотных замен в участке S5-P линкера, существенно различаются по профилю специфичности связывания пептидных лигандов. Способность гибридных белков связывать токсины группы  $\alpha$ -КТх3 в значительной мере определяется а.о. D64 и S61, которые отсутствуют у исходного бактериального канала KcsA. Важным фактором, влияющим на избирательность взаимодействия, является размер боковой цепи а.о. в 58 положении гибридного белка. Более высокая аффинность к гибридным белкам пептида OSK1 по сравнению с AgTx2 и КТХ может быть объяснена присутствием в  $\alpha$ -спиральном участке нетипичных для группы  $\alpha$ -КТх3 а.о.: R12, E16 и K20. Разница в константах диссоциации близкородственных пептидов AgTx2 и КТХ, вероятно, определяется аминокислотными заменами в положениях 3 и 15  $\beta$ 1-листа и  $\alpha$ -спирального домена.

### **3.5. Поиск высокоаффинных пептидных лигандов Kv1-каналов в ядах животных при помощи разработанных клеточных систем**

С помощью разработанных в данной работе систем осуществлен поиск потенциально активных лигандов поровой части каналов Kv1.x (x=1,3,6) в составе цельных ядов пауков (19 видов), скорпионов (7 видов), змей (7 видов) и секрета жабы (1 вид).

Фактором, затрудняющим использование разработанных систем при тестировании цельных ядов животных, является присутствие в их составе мембрано-литических компонентов. Как было продемонстрировано на примере мембрано-литического пептида из яда пчелы мелиттина, повреждение мембраны приводит к перераспределению сигнала R-AgTx2, который теперь обнаруживается по всему объему клетки (рис. 29).

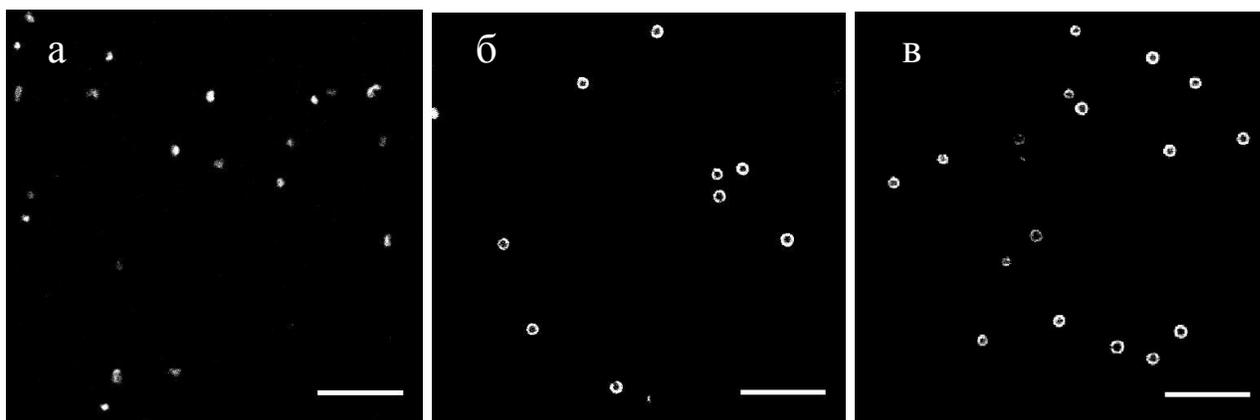


Рис. 29. Типичные конфокальные флуоресцентные изображения связывания R-AgTx2 (5 нМ) с гибридным белком KcsA-Kv1.3 на поверхности сферопластов *E. coli* при добавлении в реакционную смесь 10 мкМ мелиттина (а), цельного яда *Thanatus sp.* (98 мг/л) (б), без добавления (в). Метка масштаба 10 мкм.

Протестированные образцы ядов скорпионов и секрет жабы не вызывали видимого повреждения структуры сферопластов в концентрациях, выбранных для тестирования Kv1-лигандов.

Образцы ядов змей содержали мембрано-литические компоненты, по всей видимости, фосфолипазы. Для тестирования ядов змей был использован буфер, в котором  $MgCl_2$  был заменен на аналогичную концентрацию  $BaCl_2$ . Замена ионов магния на барий позволила в большинстве случаев подавить активность фосфолипаз, имеющих в качестве протетической группы ионы кальция. При этом использование буфера с ионами бария не оказывало влияние на структуру

сферопластов (форма, диаметр) и на характер взаимодействия R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3) в течение 2-3 ч после смешивания образцов. Яды змей *M. lebetina obtusa* и *B. arietans* вызывали существенный лизис мембраны сферопластов (>70%) даже при использовании буфера с заменой ионов магния на барий.

Яды двух видов пауков (*E. niger* и *L. pallidus*) содержали мембрано-литические компоненты, предположительно, пептидной природы (яды пауков – известный источник мембраноактивных пептидов). Подобрать состав буфера, нивелирующий действие мембрано-литических компонентов, в этих ядах не удалось, поэтому их анализ при помощи разработанных клеточных систем не проводился.

В результате проведенной работы обнаружено, что секрет жабы, а также все протестированные яды пауков не содержат компонентов, способных конкурировать с R-AgTx2 за связывание с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). Все протестированные яды скорпионов (табл. 7), а также яды змей 4 видов (*D. Angusticeps*, *B. Multicinctus*, *V. nikolskii*, *W. aegyptia*) проявляли активность в отношении хотя бы одного из гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6).

Табл. 7. Результаты поиска Kv1 лигандов в цельных ядах скорпионов.

	Вид	Связывание с KcsA-Kv1.1	Связывание с KcsA-Kv1.3	Связывание с KcsA-Kv1.6
1	<i>Buthacus arenicola</i>	+	+	+
2	<i>Androctonus amoreuxi</i>	+	+	+
3	<i>Leiurus quinquestriatus quinquestriatus</i>	Нет данных	+	Нет данных
4	<i>Mesobuthus martensii</i> Karsch	Нет данных	+	Нет данных
5	<i>Heterometrus laoticus</i>	+	+	+
6	<i>Mesobuthus eupeus</i>	+	+	+
7	<i>Orthochirus scrobiculosus</i>	+	+	+

### 3.5.1. Анализ ядов пауков

Два протестированных яда паука *E. niger* и *L. pallidus* обладают выраженной мембранно-литической активностью, поэтому анализ их активности не проводился.

Среди остальных ядов 17 видов пауков не нашлось ни одного, способного конкурировать с R-AgTx2 за связывание с KcsA-Kv1.3. Согласно простым расчетам, лиганд с  $K_{ap} = 1$  нМ вытесняет 50% R-AgTx2 (4,9 нМ) из комплексов с KcsA-Kv1.3 в концентрации 4,5 нМ. Исходя из того, что молекулярный вес лигандов канала Kv1.3 – 4 кДа (усреднено по известным лигандам из ядов скорпионов), предел детекции такого гипотетического лиганда ( $K_{ap} = 1$  нМ) должен быть 18 мкг/л. Таким образом, наши данные свидетельствуют, что протестированные яды пауков не содержат вообще или содержат меньше, чем 0,000018, 0,018 и 18% (по массе) Kv1.3 лигандов с константами  $K_{ap}$  равными 1 пМ, 1 нМ и 1 мкМ соответственно. Дополнительно, мы протестировали яды 10 видов пауков (*Heriaeus sp.*, *A. orientalis*, *L. tadzhicus*, *E. niger*, *L. pallidus*, *Linothele sp.*, *Steatoda sp.*, *Segestria sp.*, *Tegenaria sp.*, *M. virescens*) на способность к связыванию с гибридным белком KcsA-Kv1.1. В этих ядах целевой активности не обнаружено (рис. 30).

При этом известно, что яды пауков содержат лиганды Kv1 каналов типа ханатоксина [138]. Токсины такого типа связываются с потенциал-чувствительным доменом S1-S4 и препятствуют активации канала. Они не являются поровыми блокаторами, их сайт связывания расположен далеко от P-петли. По этой причине наши тест-системы не подходят для идентификации таких пептидов.

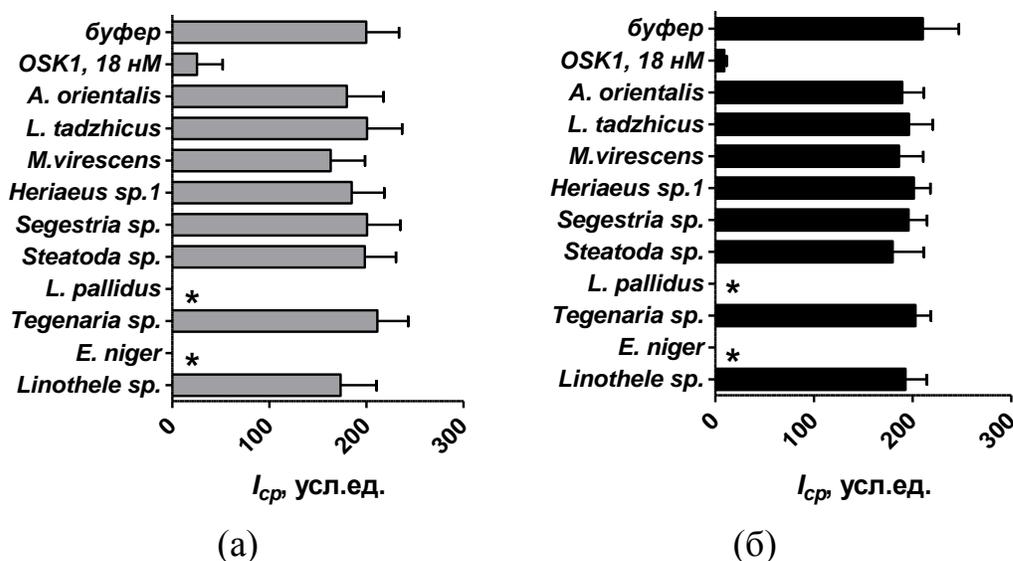


Рис. 30. Конкурирование R-AgTx2 и некоторых протестированных ядов пауков за связывание с гибридными белками KcsA-Kv1.1 (а) и KcsA-Kv1.3 (б). Концентрация ядов – 185 мкг/мл. Концентрация R-AgTx2 – 5,5 нМ. Звездочкой обозначены яды, обладающие выраженной мембрано-литической активностью.

### 3.5.2. Анализ ядов змей

Яды змей *M. lebetina obtusa* и *B. arietans* существенно лизировали мембраны сферопластов, поэтому анализ их активности не проводился.

Способность вытеснять R-AgTx2 из комплексов хотя бы с одним из гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3) показали яды змей мамбы *D. angusticeps*, крайта *B. multicinctus*, гадюки *V. nikolskii* и кобры *W. aegyptia*.

Было показано, что яды змей видов *D. angusticeps* и *B. multicinctus* связываются с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3) (рис. 31). Вычисленные значения  $IC_{50}$  цельного яда *D. angusticeps* при вытеснении 5,3 нМ R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.3 составили соответственно  $0,08 \pm 0,01$  мг/мл и  $2,7 \pm 1,1$  мг/мл. Вычисленные значения  $IC_{50}$  цельного яда *B. multicinctus* при вытеснении 5,3 нМ R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.3 составили соответственно  $0,4 \pm 0,1$  мг/мл и  $0,27 \pm 0,06$  мг/мл (рис.32).

Яды змей *V. nikolskii* и *W. aegyptia* связываются только с KcsA-Kv1.1 со значениями  $IC_{50}$  соответственно  $\sim 1,8$  мг/мл и  $\sim 1,6$  мг/мл (рис. 32а).

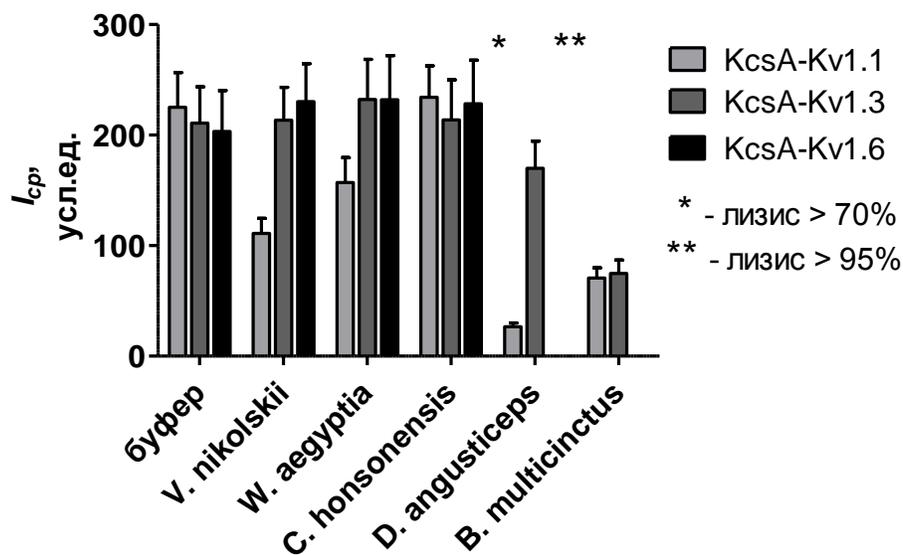


Рис. 31. Связывание R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в присутствии цельных ядов змей. Концентрация R-AgTx2 – 5,5 нМ.

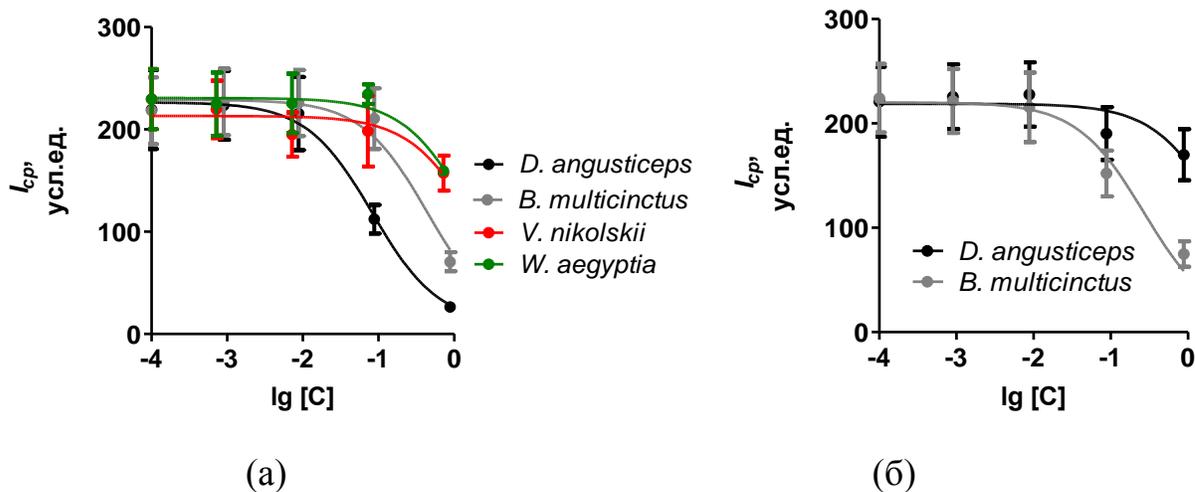


Рис. 32. Вытеснение R-AgTx2 цельными ядами змей из комплексов гибридными белками KcsA-Kv1.1 (а) и KcsA-Kv1.3 (б). [C] – концентрация ядов змей, мг/мл. Концентрация R-AgTx2 – 5,3 нМ.

Таким образом, наблюдается избирательность действия ядов змей на конкретные каналы семейства Kv1: яд *D. angusticeps* более активно связывается с поровой частью канала Kv1.1, яд *B. multicinctus* – с поровой частью канала Kv1.3. Яды змей *V. nikolskii* и *W. aegyptia* связываются с поровой частью канала Kv1.1 со схожей активностью и не связываются с поровой частью каналов Kv1.3 и Kv1.6.

Активность яда *D. angusticeps* на каналах Kv1.1 и Kv1.3, выявленная в нашей работе, объясняется присутствием в составе ядов дендротоксинов или других неописанных ранее Kv1-блокаторов. Из опубликованных данных известно, что в яде змеи *D. angusticeps* содержатся блокаторы Kv1-каналов с наномолярной аффинностью:  $\delta$ -DTX (Kv1.1, Kv1.2),  $\alpha$ -DTX (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.6) и DaE1/DaE2 (Kv1.1) (перечислены в порядке убывания значения  $IC_{50}$  для Kv1.1) [201]. В яде змеи *B. multicinctus* присутствует  $\beta$ -бунгаротоксин, который одно время считали блокатором ПЧКК [202], но последние исследования отвергают его способность блокировать Kv1 каналы [203]. Для точного установления активных компонентов требуются дополнительные исследования.

Информация о наличии Kv1-блокаторов в ядах змей *V. nikolskii* и *W. aegyptia* в научных публикациях отсутствует. Присутствие блокаторов Kv1-каналов в составе ядов змей *V. nikolskii* и *W. Aegyptia* обнаружено нами впервые. Планируется продолжение исследований этих ядов для выделения и идентификации индивидуальных активных компонентов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что разработанные клеточные системы подходят для поиска лигандов в составе ядов змей, а проблемы, связанные с присутствием в составе ядов активных фосфолипаз, во многих случаях могут быть успешно преодолены.

### **3.5.3. Анализ яда скорпиона *H. laoticus* и его компонентов**

Одним из ядов скорпионов, показавшим способность вытеснять R-AgTx2 из центров связывания с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3) был яд скорпиона *H. laoticus*. Данный скорпион распространен в Юго-Западном Вьетнаме, его яд обладает сравнительно невысокой токсичностью, но проявляет противоболевую и противовоспалительную активность. Эти свойства свидетельствуют о возможном наличии в его составе соединений, воздействующих на иммунную систему. Сотрудники лаборатории молекулярной токсикологии ИБХ РАН совместно с их вьетнамскими коллегами провели серию экспериментов по идентификации в составе яда *H. laoticus* таких соединений, используя в качестве теста биологической активности токсичность для мышей.

Цельный яд скорпиона и очищенные соединения, показавшие целевую активность на мышах, были подвергнуты анализу при помощи разработанных в данной работе систем поиска лигандов каналов Kv1.x (x=1,3).

Нами было обнаружено, яд скорпиона *H. laoticus* конкурирует с R-AgTx2 за связывание с поровой частью каналов Kv1.x (x=1,3) [184]. Дальнейший анализ очищенных фракций яда выявил, что среди фракций с токсичностью на мышах только одна способна вытеснять R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.x (x=1,3) и, следовательно, содержащийся в ней полипептид является блокатором поровой части каналов Kv1.x (x=1,3). Этот пептид получил название хетлаксин (hetlaxin от HETerometrus LAoticus toXIN).

Была определена эффективность взаимодействия нового токсина с поровой частью каналов Kv1.1 и Kv1.3. Исследовано конкурентное ингибирование связывания R-AgTx2 с KcsA-Kv1.x (x=1,3) хетлаксином (рис. 33). Установлено, что хетлаксин связывается с обоими каналами, а величина  $K_{ap}$  для каналов Kv1.1 и Kv1.3 составляет соответственно  $0,8 \pm 0,3$  мкМ и  $59 \pm 6$  нМ.

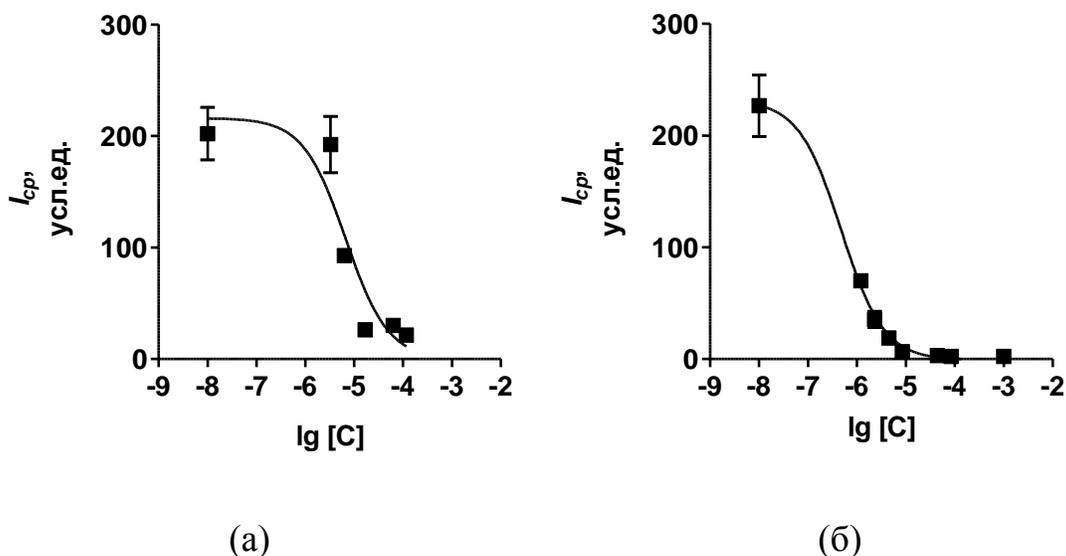


Рис. 33. Конкурирование хетлаксона из яда скорпиона *H. laoticus* с 5 нМ R-AgTx2 за связывание с гибридными конструкциями KcsA-Kv1.1 (а) и KcsA-Kv1.3 (б). [C] – концентрация хетлаксона, М.

Следует отметить, что к настоящему времени из яда скорпиона *H. laoticus* выделены два токсина [204], 200]. Один из них, гетероскорпин\_1 (Heteroscorpine\_1, HS\_1) обладает инсектицидной и антибактериальной активностями. Данные о действии этого токсина на калиевые каналы отсутствуют. Другой токсин HelaTx1 взаимодействует с различными подтипами потенциал-чувствительных калиевых каналов, обладая наибольшим сродством к Kv1.1 ( $IC_{50} = 9,9 \pm 1,6$  мкМ). Этот токсин взаимодействует также с каналом Kv1.3, но с очень низким сродством. Так, при концентрации 30 мкМ он ингибирует ответ канала лишь на 20%. Выделенный в данной работе токсин имеет гораздо большее сродство к поровой части Kv1.3. Таким образом, впервые из яда скорпиона *H. laoticus* выделен токсин, обладающий сродством к Kv1.3 в наномолярном диапазоне. Обнаружение этого блокатора подтверждает предположение, что иммуномодулирующий эффект яда *H. laoticus* опосредован

воздействием через канал Kv1.3, локализованный в клетках иммунной системы человека.

Хетлаксин был подвергнут дальнейшим исследованиям сотрудниками лаборатории молекулярной токсикологии ИБХ РАН. Была установлена его молекулярная масса (3669,2 Да) [184] и определена первичная структура [206].

#### **3.5.4. Анализ яда скорпиона *O. scrobiculosus* и его компонентов**

Известно, что в яде скорпиона *O. scrobiculosus* содержится два высокоаффинных лиганда каналов семейства Kv1: OSK1 – блокатор каналов Kv1.1-Kv1.3 и OSK2 – специфический блокатор канала Kv1.2. Мы провели комплексное исследование яда скорпиона *O. scrobiculosus* на предмет обнаружения новых поровых блокаторов каналов Kv1.1 и Kv1.3. Второй важной задачей этого исследования было изучение применимости разработанных клеточных систем для упрощения процедуры выделения этих блокаторов из яда.

Концентрация цельного яда *O. scrobiculosus*, которая приводит к вытеснению 50% R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.3, составила  $7,0 \pm 1,3$  нг/мл (рис. 34). Для яда *O. scrobiculosus* величина параметра  $IC_{50}$  почти на три порядка меньше, чем величина  $IC_{50}$ , полученная для ядов змей. Возможно, это объясняется присутствием в яде скорпионов более высокоаффинных лигандов канала Kv1.3, либо массовая доля таких компонентов выше.

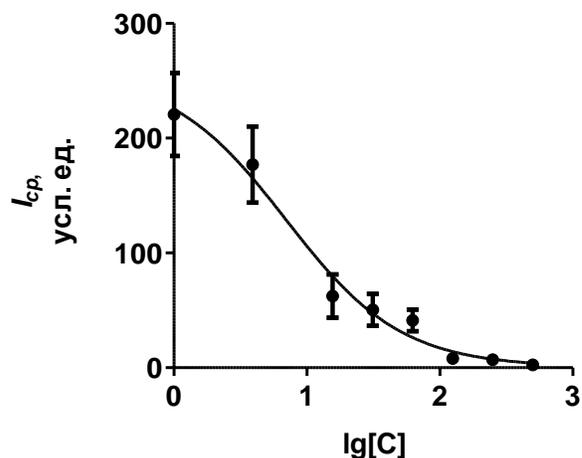


Рис. 34. Конкурирование R-AgTx2 и яда *O. scrobiculosus* за связывание с гибридным белком KcsA-Kv1.3. [C] –концентрация яда *O. scrobiculosus* в образце, нг/мл. Концентрация R-AgTx2 – 4,9 нМ.  $IC_{50}=7,0\pm 1,3$  нг/мл.

Цельный яд *O. scrobiculosus* был разделен на 4 фракции при помощи гель-фильтрации Кузьменковым А.И. Фракции III и IV показали способность конкурировать с R-AgTx2 за связывание с KcsA-Kv1.x (x=1,3) (рис. 35). Отрицательный результат, полученный для фракций I и II, означает, что эти фракции не содержат или содержат меньше, чем 0,000023, 0,023 и 22,6% (по массе) лигандов KcsA-Kv1.x (x=1,3), имеющих константу  $K_{ap}$  равную 1 пМ, 1 нМ и 1 мкМ, соответственно.

Далее фракции III и IV были разделены при помощи ОФ-ВЭЖХ соответственно на 43 и 19 субфракций. Каждая субфракция содержала один основной компонент и не более двух минорных, как было подтверждено при помощи MALDI масс-спектрометрии и аналитической хроматографии Кузьменковым А.И. Субфракции III-6 и IV-6 показали существенную способность конкурировать с R-AgTx2 за связывание с KcsA-Kv1.x (x=1,3) (рис. 36). Мы предполагаем, что основной компонент остальных фракций не способен связываться с KcsA-Kv1.x (x=1,3) или имеет константу  $K_{ap} > 140$  нМ.

Низкоаффинные Kv1 лиганды, возможно, присутствуют в субфракциях III-11, III-12, III-15 и III-16, где заметно частичное вытеснение R-AgTx2. Субфракции III-5 и III-7 (вероятно, также III-8, III-9, III-10) содержат в качестве побочного компонента основной компонент субфракции III-6, чем объясняется их частичная активность. Субфракция III-29 вызывала эффект снижения флуоресцентного сигнала, но без концентрационной зависимости. Мы предполагаем, что данная субфракция содержит компоненты, обладающие неспецифическим воздействием на связывание R-AgTx2 с гибридными белками.

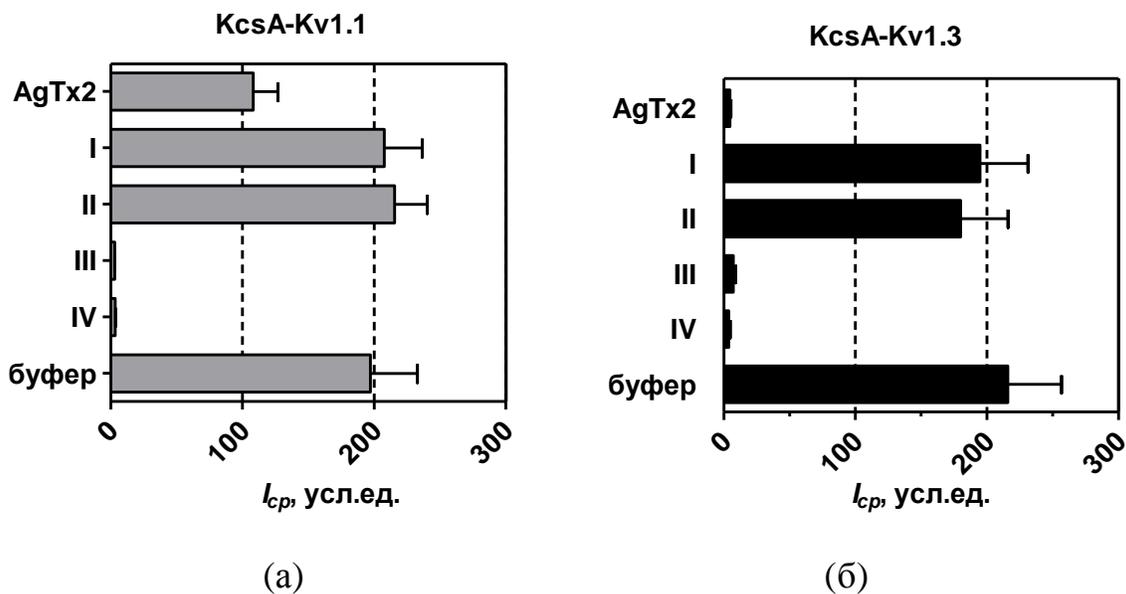
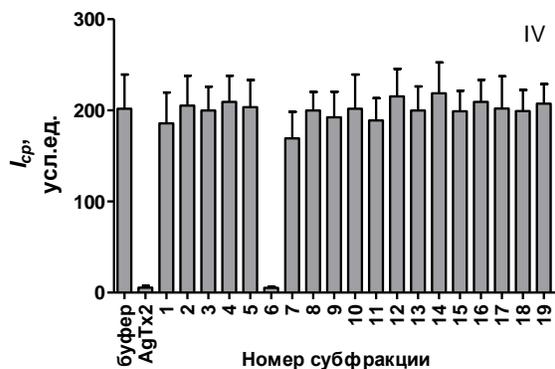


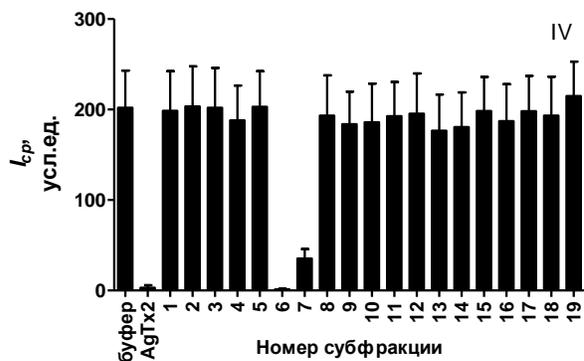
Рис. 35. Анализ яда *O. scrobiculosus*. Значение параметра  $I_{cp}$  при связывании R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.1 (а) или KcsA-Kv1.3 (б) в присутствии фракций яда после проведения гель-фильтрации, AgTx2 или буфера.

Субфракции III-6 и IV-6 – содержат один и тот же индивидуальный компонент, как было показано при помощи ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии MALDI Кузьменковым А.И. При разделении на фракции при помощи гель-фильтрации один и тот же компонент попал в две фракции. Измеренные молекулярные массы компонента исходного и алкилированного по

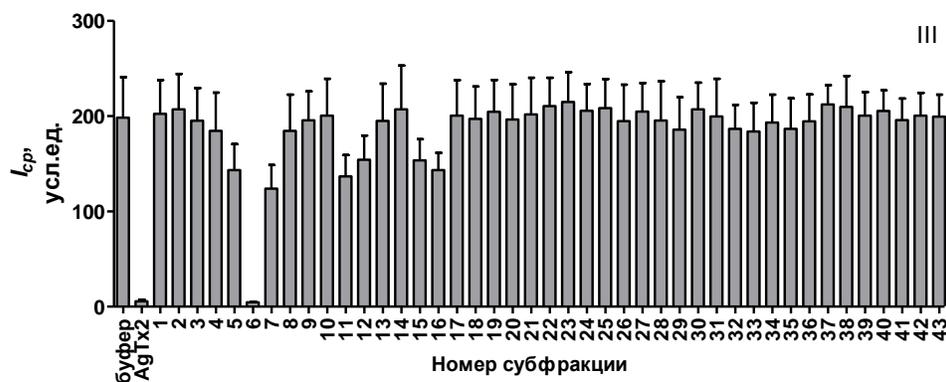
восстановленным SH-группам пептида составили 4205,2 и 4842,0 кДа, что говорит о присутствии 6 цистеиновых остатков. Этот активный пептид был описан ранее и имеет название OSK1 [207].



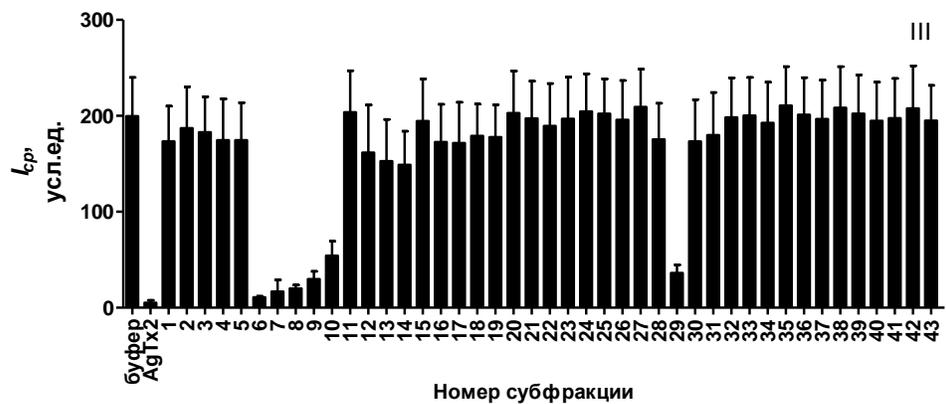
(a)



(б)



(B)



(Г)

Рис. 36. Анализ яда *O. scrobiculosus*. Значение параметра  $I_{cp}$  при связывании R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.1 (б, г) или KcsA-Kv1.3 (а, в) в присутствии субфракций фракции III (в, г), субфракций фракции IV (а,б), AgTx2 (9,8 нМ) или буфера.

Таким образом, мы применили разработанные в данной работе системы поиска лигандов каналов Kv1.x (x=1,3) для исследования яда скорпиона *O. scrobiculosus*. Проведение тестирования после каждого этапа хроматографического разделения яда позволило избежать фракционирования заведомо неактивных фракций, что в конечном итоге значительно сократило объемы работы. Единственный обнаруженный специфический поровый лиганд каналов Kv1.x (x=1,3) в яде *O. scrobiculosus* – это уже описанный ранее пептид OSK1.

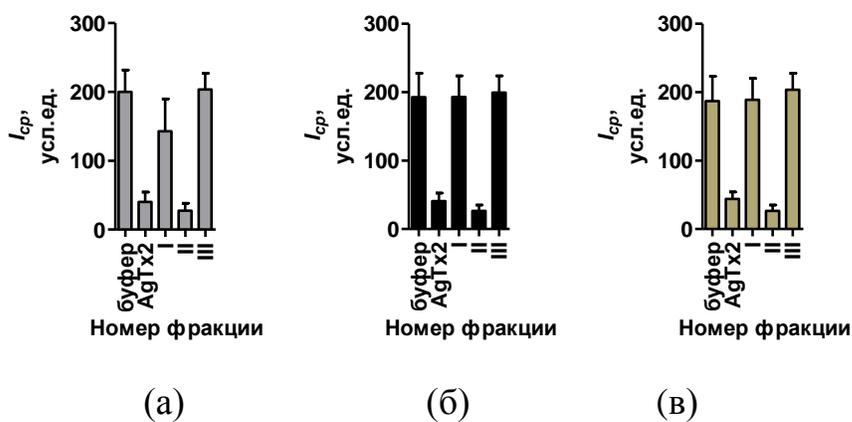
### 3.5.5. Анализ яда скорпиона *M. eureus* и его компонентов

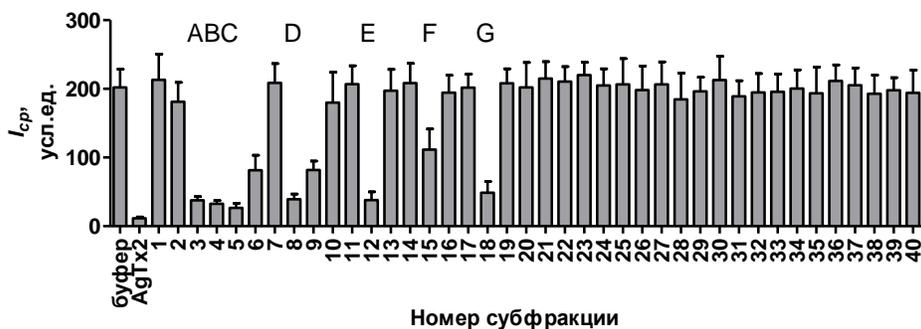
Яд скорпиона *M. eureus* показал способность вытеснять R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), поэтому мы провели дальнейший анализ его компонентов. На первом этапе фракционирования яд *M. eureus* был разделен нашими коллегами на фракции I-III при помощи гель-фильтрации. Все три фракции были изучены мною по их способности связываться с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). Целевая активность обнаружена во фракции II. Отсутствие активности в двух других фракциях I и III означало, что в них не содержится высокоаффинных поровых блокаторов каналов Kv1.x (x=1,3,6), либо их массовая доля минимальна.

Для выявления соединений, ответственных за активность фракции II, данная фракция была разделена при помощи ОФ-ВЭЖХ на 40 субфракций. Среди 40 субфракций способность вытеснять R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.x (x=1,3) показали субфракции: 3-6, 8-9, 12, 15. Для канала Kv1.3 показана

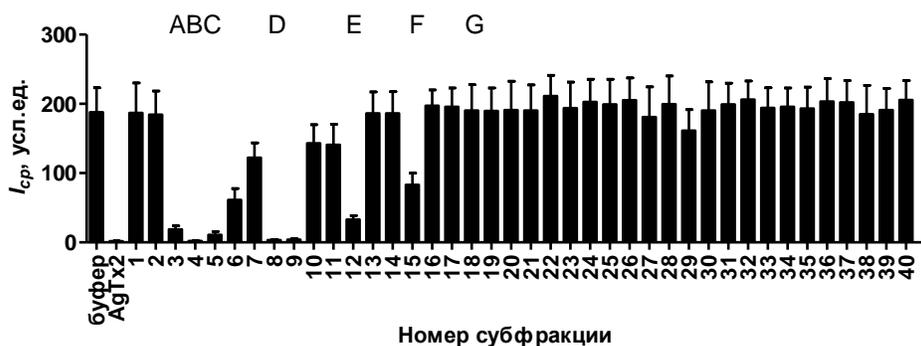
также активность фракции 18. (рис. 37). Способность вытеснять R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.6 показали только субфракции: 3-6, 8. Активность некоторых из перечисленных субфракций объяснялась присутствием минорных количеств активных соединений из соседних субфракций. Для удобства восприятия субфракции, содержащие активные и неповторяющиеся компоненты, были обозначены буквами А-Г (рис. 37).

Так, субфракции А и D-G содержали по одному активному компоненту, а субфракции В и С содержали по два активных компонента, которые были разделены на индивидуальные соединения во втором раунде ОФ-ВЭЖХ. Второй раунд ОФ-ВЭЖХ позволил выделить активные компоненты субфракций в форме индивидуальных соединений. Гомогенность активных компонентов была подтверждена при помощи масс-спектрометрии MALDI и аналитической хроматографии Кузьменковым А.И. Индивидуальные соединения были повторно проанализированы при помощи разработанных клеточных систем KcsA-Kv1.x (x=1,3). В результате, из яда *M. eureus* было выделено 9 активных компонентов блокаторов каналов Kv1 (табл. 8).

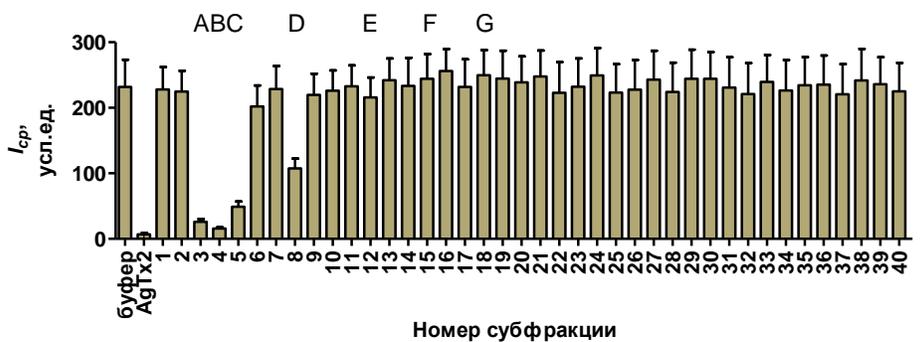




(Г)



(Д)



(е)

Рис. 37. Анализ яда *M. eureus*. Значение параметра  $I_{cp}$  при связывании R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.1 (б, д), KcsA-Kv1.3 (а, г), KcsA-Kv1.6 (в, е) в присутствии фракций и субфракций яда, AgTx2 (9,8 нМ) или буфера. Цельный яд *M. eureus* был разделен на фракции I-III с использованием гель-фильтрации (а, б); фракция II, показавшая целевую активность, была дополнительно

подвергнута разделению на 40 субфракций с использованием ОФ ВЭЖХ и тестированию на присутствие лигандов Kv1-каналов (в, г).

Согласно опубликованным данным в яде *M. eureus* до настоящего момента было известно три токсина группы  $\alpha$ -КТХ, способных связываться с каналами Kv1: MeuКТх-1 [148], MeuКТх-3 [208] и MeuТх3В [209]. Благодаря комбинации разработанных в данной работе клеточных систем поиска лигандов Kv1-каналов, а также методов ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии, нам удалось найти все три известных лиганда, а также идентифицировать 6 новых токсинов.

Три известных токсина (MeuКТх-1, MeuКТх-3 и MeuТх3В) были найдены во фракциях В, С и F, соответственно. Помимо известных токсинов MeuКТх-1 и MeuКТх-3 в субфракциях В и С дополнительно присутствуют два новых активных компонента. Как показали результаты исследований, проведенных А. Кузьменковым, первый обнаруженный пептид является близким гомологом MeuКТх-1 с заменой аминокислот Е8Р и D20Е. Аминокислотная последовательность второго обнаруженного пептида отличается от MeuКТх-3 на одну аминокислоту в положении 28 и полностью совпадает с последовательностью токсина VmКТХ, выделенного из яда скорпиона родственного вида *Mesobuthus martensi Karsch*. Кроме того, разница в 1 Да между молекулярной массой токсина, рассчитанной по аминокислотной последовательности, и измеренной при помощи масс-спектрометрии свидетельствует об амидировании пептида с С-конца.

Остальные поровые блокаторы каналов Kv1.x (x=1,3), обнаруженные нами в яде *M. eureus*, не имеют аналогов в литературе и были выявлены в данной работе впервые (табл. 8).

Табл. 8. Идентификация обнаруженных в яде *M. eureus* поровых блокаторов каналов Kv1.x (x=1,3). Токсины обнаружены впервые в данной работе (○) или

их обнаружение сообщалась ранее и было подтверждено в данной работе (●). Результаты получены А.И. Кузьменковым в Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН.

		Аминокислотная последовательность	Mw, Да	Название
A	1○	REIPVKCKGSKQCLQSCKEAGMTYGKCMNGKCNCTPK-NH <sub>2</sub>	4047	MeKTx13-2
B	2●	VSCEDCP <del>E</del> HCATKDKQRAKCDNDKCVCEPK	3250	MeuKTx-1
	3	VSCEDCP <del>P</del> HCATKDKQRAKCE <del>N</del> DKCVCEPK	3232	MeKTx1-2
C	4●	VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGKCMNGKCDCTPK-NH <sub>2</sub>	3980	MeuKTx-3
	5○	VGINVKCKHSGQCLKPCKDAGMRFGK <del>C</del> INGKCDCTPK-NH <sub>2</sub>	3962	= BmKTX
D	6○	ZFTDVKCTVTKQCWPVCKKMFGRPNGKCMNGKCRCS	4255	MeKTx11-3
E	8○	ZFTDVKCTGTKQCWPVCKKMFGRPNGKCMNGKCRCSYP	4222	MeKTx11-1
F	9●	FGLIDVKCSASRECWVACKKVTGSGQGKQNNQCRCY	4066	MeuTx3B
G	10○	Последовательность устанавливается	4234	

Для пептида MeuKTX-1, выделенного в достаточных количествах из яда *M. eurus*, мы исследовали аффинность к поровой части каналов Kv1.1 и Kv1.3. Было исследовано конкурентное связывание R-AgTx2 и MeuKTX-1 с KcsA-Kv1.x (x=1,3) (рис. 38) и определены константы  $K_{ap}$ . Полученные значения констант  $K_{ap}$  (MeuKTX-1) для KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.3 составили соответственно  $180 \pm 30$  нМ и  $22 \pm 3$  нМ. Наномолярная аффинность MeuKTX-1 к каналу Kv1.3 и многократное снижение аффинности к каналу Kv1.1 согласуются с данными, полученными ранее методом patch-clamp ( $IC_{50}$  для Kv1.3 = 2,36 нМ) [210].

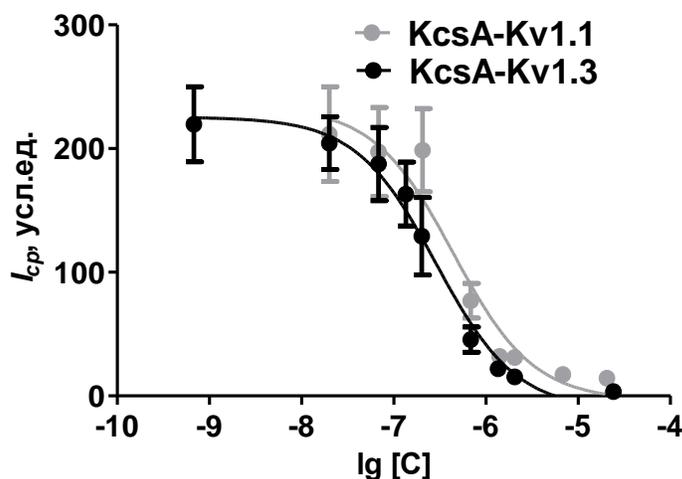


Рис. 38. Конкурирование R-AgTx2 и токсина MeuKTX-1 из яда *M. eurus* за связывание с гибридными белками KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.3. [C] – концентрация MeuKTX-1, М. Концентрация R-AgTx2 для KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.3 соответственно 7,3 нМ и 5,5 нМ.

### Заключение

В результате проведенной работы были созданы новые клеточные системы для поиска и исследования взаимодействий блокаторов с калиевыми потенциал-чувствительными каналами семейства Kv1. В основу клеточных систем положена экспрессия во внутренней мембране *E. coli* гибридных белков, содержащих лиганд-связывающие сайты каналов Kv1.x (x=1,3,6) человека. Связывание лигандов осуществляется на поверхности бактериальных клеток, лишенных клеточной стенки – сферопластов. Преимуществом клеточных систем, основанных на сферопластах, является простота культивирования бактериальных клеток, а также скорость и эффективность наработки целевого белка в мембране. Отсутствие необходимости выделения гибридных белков из мембраны позволяет сохранить нативную конформацию каналов при анализе.

Создание клеточных систем было поддержано разработкой специализированных биофизических методик анализа. Детекцию связывания блокаторов осуществляли при помощи флуоресцентной конфокальной микроскопии с использованием оригинальных алгоритмов количественного статистически достоверного анализа. Флуоресцентный метод значительно безопаснее и проще более традиционного радиолигандного анализа. Флуоресцентный принцип детекции универсален и в перспективе может быть легко адаптирован для другого аналитического оборудования, например проточного цитометра или планшетного флуориметра.

В работе продемонстрировано, что гибридные белки KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе мембраны сферопластов связывают лиганды каналов Kv1.x человека с характерными константами взаимодействия. Бактериальные клеточные системы, таким образом, успешно имитируют клеточные линии эукариот с экспрессией каналов Kv1.x в мембране. Благодаря разработанным клеточным системам была более подробно изучена способность  $\alpha$ -КТх3-пептидов связываться с поровой частью канала Kv1.6. В данной работе впервые было показано, что токсины скорпионов OSK1 и КТХ имеют аффинность к поровому участку канала Kv1.6, определены количественные характеристики связывания.

Для объяснения избирательного взаимодействия близкородственных пептидных лигандов с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) была выдвинута гипотеза, основанная на анализе литературных данных. Гипотеза выделяет несколько структурных детерминант, которые играют ключевую роль в связывании пептидных лигандов с пересаженным участком Р-петли гибридных белков KcsA-Kv1.x.

Одно из назначений клеточных систем – поиск новых блокаторов каналов Kv1 в составе многокомпонентных смесей и выяснения связи структура-активность в системе пептидный токсин-калиевый канал. Сотрудничество с лабораториями ИБХ РАН позволило применить разработанные клеточные

системы для поиска блокаторов в цельных ядах животных. В результате были проанализированы десятки ядов пауков, скорпионов, змей. На примере ядов скорпионов, продемонстрировано, что клеточные системы обеспечивают быстрое и прицельное обнаружение новых высокоаффинных пептидных лигандов Kv1-каналов в ядах животных.

Исследования показали, что гибридные белки KcsA-Kv1.x в составе бактериальных клеточных систем связывают лиганды каналов Kv1.x человека с характерными для них константами взаимодействия и, таким образом, являются новым инструментом для изучения структурных основ высокоаффинного взаимодействия поровых блокаторов с ионными каналами Kv1.x и их термодинамических аспектов. Возможность сравнительного анализа комплексообразования различных по структуре лигандов с близкородственными каналами Kv1.x (x=1,3,6) расширяет применимость клеточных систем для исследования структурных детерминант, обеспечивающих избирательность лиганд-рецепторных взаимодействий калиевых каналов.

## Выводы

1) На основе биофизических представлений о связи пространственной структуры и функции белков и белковых комплексов с использованием биоинженерных подходов разработаны бактериальные клеточные системы, обеспечивающие поиск и изучение высокоаффинных лигандов к потенциал-чувствительным калиевым каналам Kv1.x (x=1,3,6).

2) С использованием разработанных клеточных систем обнаружены 7 новых высокоаффинных пептидных лигандов каналов Kv1.x (x=1,3) в ядах скорпионов.

3) Показано, что близкородственные пептидные лиганды каналов Kv1.x (x=1,3,6) с точечными различиями в области  $\beta$ 1-листа и  $\alpha$ -спирального домена связываются с разработанными клеточными системами с характерными для них константами диссоциации в наномолярном диапазоне концентраций.

4) Определены ключевые структурные детерминанты, модулирующие аффинность и избирательность связывания пептидных лигандов с гибридными биоинженерными конструкциями KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), которые соответствуют природным каналам.

### **Благодарности**

Выражаю благодарность своему научному руководителю Феофанову Алексею Валерьевичу за неоценимую помощь на протяжении всего срока обучения в аспирантуре, а также Некасовой Оксане Васильевне, в тесном контакте с которой, была осуществлена большая часть работы. Константина Вольдемаровича Шайтана, заведующего кафедрой биоинженерии Биологического факультета МГУ, хочется поблагодарить за помощь в подготовке диссертационной работы к защите.

Также хочется выразить огромную благодарность зав. лаборатории нейрорецепции и нерорегуляции ИБХ РАН Гришину Евгению Васильевичу и сотрудникам лаборатории Василевскому А.А., Кузьменкову А.Л., Корольковой Ю.В., которые активно помогали при исследованиях цельных ядов животных и без которых данная работы была бы невозможна.

## Список процитированной литературы

1. Szabò I., Zoratti M., Gulbins E. Contribution of voltage-gated potassium channels to the regulation of apoptosis. // FEBS Lett. Federation of European Biochemical Societies, 2010. Vol. 584, № 10. P. 2049–2056.
2. Wulff H., Castle N.A., Pardos L.A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic drug targets. // Nat Rev Drug Discov. 2008. Vol. 8, № 12. P. 982–1001.
3. Robbins C., Tempel B. Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. // Epilepsia. 2012. Vol. 53 Suppl 1. P. 134–141.
4. Wang J. et al. Chronic hypoxia inhibits K<sup>v</sup> channel gene expression in rat distal pulmonary artery. // Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol. 2005. Vol. 288. P. 1049–1058.
5. Beeton C. et al. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. Vol. 103, № 46. P. 17414–17419.
6. Beeton C. et al. A novel fluorescent toxin to detect and investigate Kv1.3 channel up-regulation in chronically activated T lymphocytes. // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, № 11. P. 9928–9937.
7. Freudenthaler G. et al. Ultrasensitive pharmacological characterisation of the voltage-gated potassium channel K(V)1.3 studied by single-molecule fluorescence microscopy. // Histochem. Cell Biol. 2002. Vol. 117, № 3. P. 197–202.
8. Terstappen G.C. et al. Screening technologies for ion channel drug discovery. // Future Med. Chem. 2010. Vol. 2, № 5. P. 715–730.
9. Кодиров С.А. et al. Суперсемейство потенциалзависимых K<sup>+</sup>-каналов: структура, функция и патология. // Цитология. 2010. Vol. 52, № 9. P. 697–714.
10. Gajewski C. et al. Biogenesis of the pore architecture of a voltage-gated potassium channel. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2011. Vol. 108, № 8. P. 3240–3245.

11. Shealy R.T. et al. Sequence-function analysis of the K<sup>+</sup>-selective family of ion channels using a comprehensive alignment and the KcsA channel structure. // *Biophys. J.* Elsevier, 2003. Vol. 84, № 5. P. 2929–2942.
12. Mannuzzu L.M., Moronne M.M., Isacoff E.Y. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. // *Science* (80- ). 1996. Vol. 271, № 5246. P. 213–216.
13. Bezanilla F. Voltage Sensor Movements. // *J. Gen. Physiol.* 2002. Vol. 120, № 4. P. 465–473.
14. Gutman G.A. et al. International Union of Pharmacology . LIII . Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. // *Pharmacol. Rev.* 2005. Vol. 57, № 4. P. 473–508.
15. Zhou Y. et al. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K<sup>+</sup> channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. // *Nature.* 2001. Vol. 414. P. 43–48.
16. Armstrong C.M. Voltage-gated K channels. // *Sci. STKE.* 2003. Vol. 2003, № 188. P. re10.
17. Wang W. et al. Association of the Kv1 family of K<sup>+</sup> channels and their functional blueprint in the properties of auditory neurons as revealed by genetic and functional analyses. // *J. Neurophysiol.* 2013. Vol. 110, № 8. P. 1751–1764.
18. Hopkins W.F. Toxin and subunit specificity of blocking affinity of three peptide toxins for heteromultimeric, voltage-gated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1998. Vol. 285, № 3. P. 1051–1060.
19. Dodson P.D., Barker M.C., Forsythe I.D. Two heteromeric Kv1 potassium channels differentially regulate action potential firing. // *J. Neurosci.* 2002. Vol. 22, № 16. P. 6953–6961.
20. Garcia M.L., Hanner M., Kaczorowski G.J. Scorpion toxins: tools for studying K<sup>+</sup> channels. // *Toxicon.* 1998. Vol. 36, № 11. P. 1641–1650.
21. Shi G. et al. Beta subunits promote K<sup>+</sup> channel surface expression through effects early in biosynthesis. // *Neuron.* 1996. Vol. 16, № 4. P. 843–852.
22. Manganas L. et al. Identification of a trafficking determinant localized to the Kv1 potassium channel pore. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98, № 24. P. 14055–14059.

23. Vacher H. et al. Regulation of Kv1 channel trafficking by the mamba snake neurotoxin dendrotoxin K. // *FASEB J.* 2007. Vol. 21, № 3. P. 906–914.
24. Ионные каналы [Online] // Википедия. URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Ионные\\_каналы](https://ru.wikipedia.org/wiki/Ионные_каналы).
25. Panyi G., Deutsch C. Cross talk between activation and slow inactivation gates of Shaker potassium channels. // *J. Gen. Physiol.* 2006. Vol. 128, № 5. P. 547–559.
26. Rasmusson R.L. et al. Inactivation of voltage-gated cardiac K<sup>+</sup> channels. // *Circ. Res.* 1998. Vol. 82, № 7. P. 739–750.
27. Panyi G., Deutsch C. Probing the cavity of the slow inactivated conformation of shaker potassium channels. // *J. Gen. Physiol.* 2007. Vol. 129, № 5. P. 403–418.
28. Kurata H.T., Wang Z., Fedida D. NH<sub>2</sub>-terminal inactivation peptide binding to C-type-inactivated Kv channels. // *J. Gen. Physiol.* 2004. Vol. 123, № 5. P. 505–520.
29. MacKinnon R. Potassium channels. // *FEBS Lett.* 2003. Vol. 555, № 1. P. 62–65.
30. Lee T.E., Philipson L.H., Nelson D.J. Membrane biology N-type inactivation in the mammalian Shaker K<sup>+</sup> channel Kv1.4. // *J. Membr. Biol.* 151, 1996. Vol. 151. P. 225–235.
31. Lu Q. et al. Disruption of Kv1.1 N-type inactivation by novel small molecule inhibitors (disinactivators). // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. Vol. 16, № 6. P. 3067–3075.
32. Sewing S., Roeper J., Pongs O. Kv beta 1 subunit binding specific for shaker-related potassium channel alpha subunits. // *Neuron.* 1996. Vol. 16, № 2. P. 455–463.
33. Roeper J. et al. NIP domain prevents N-type inactivation in voltage-gated potassium channels. // *Nature.* 1998. Vol. 391, № 22. P. 390–393.
34. Del Camino D., Kanevsky M., Yellen G. Status of the intracellular gate in the activated-not-open state of shaker K<sup>+</sup> channels. // *J. Gen. Physiol.* 2005. Vol. 126, № 5. P. 419–428.

35. Valiyaveetil F.I., Leonetti, M., Muir, T.W., Mackinnon R. Ion selectivity in a semisynthetic K<sup>+</sup> channel locked in the conductive conformation. // *Science*. 2006. Vol. 314, № 5801. P. 1004–1007.
36. Cuello L. et al. Structural mechanism of C-type inactivation in K(+) channels. // *Nature*. Nature Publishing Group, 2010. Vol. 466, № 7303. P. 203–208.
37. Baukrowitz T., Yellen G. Use-dependent blockers and exit rate of the last ion from the multi-ion pore of a K<sup>+</sup> channel. // *Science*. 1996. Vol. 271, № 5249. P. 653–656.
38. Grissmer S., Cahalan M. TEA prevents inactivation while blocking open K<sup>+</sup> channels in human T lymphocytes. // *Biophys. J.* 1989. Vol. 55, № 1. P. 203–206.
39. Somodi S. et al. pH-dependent modulation of Kv1.3 inactivation: role of His399. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004. Vol. 287, № 4. P. 1067–1076.
40. Cordero-Morales J.F., Cuello L.G., Perozo E. Voltage-dependent gating at the KcsA selectivity filter. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. Vol. 13, № 4. P. 319–322.
41. Butler A. et al. A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. // *Science*. 1989. Vol. 243, № 4893. P. 943–947.
42. Browne D. et al. Episodic ataxia/myokymia syndrome is associated with point mutations in the human potassium channel gene, KCNA1. // *Nat. Genet.* 1994. Vol. 8, № 2. P. 136–140.
43. Nishiyama A. et al. Altered K(+) channel gene expression in diabetic rat ventricle: isoform switching between Kv4.2 and Kv1.4. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001. Vol. 281, № 4. P. H1800–7.
44. R K. et al. Relationship between K<sup>+</sup> channel down-regulation and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in rat ventricular myocytes following myocardial infarction. // *J. Physiol.* 1999. Vol. 517, № 1. P. 229–245.
45. Rasband M.N. et al. Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98, № 23. P. 13373–13378.
46. Van Wagoner D. et al. Outward K<sup>+</sup> current densities and Kv1.5 expression are reduced in chronic human atrial fibrillation. // *Circ. Res.* 1997. Vol. 80, № 6. P. 772–781.

47. Nielsen N.H. et al. Mutations in the Kv1.5 channel gene KCNA5 in cardiac arrest patients. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007. Vol. 354, № 3. P. 776–782.
48. Ye H. et al. Effect of chronic cigarette smoking on large-conductance calcium-activated potassium channel and Kv1.5 expression in bronchial smooth muscle cells of rats. // *Acta Physiol. Sin.* 2004. Vol. 56, № 5. P. 573–578.
49. Brevnova E.E. et al. Overexpression of human KCNA5 increases IK V and enhances apoptosis. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004. Vol. 287, № 3. P. 715–722.
50. Zhang T. et al. TRH regulates Kv1 . 5 gene expression through a G a q-mediated PLC-independent pathway. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2000. Vol. 165. P. 33–39.
51. Allen M.L., Koh D.S., Tempel B.L. Cyclic AMP regulates potassium channel expression in C6 glioma by destabilizing Kv1.1 mRNA. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. Vol. 95, № 13. P. 7693–7698.
52. Nesti E., Everill B., Morielli A.D. Endocytosis as a mechanism for tyrosine kinase-dependent suppression of a voltage-gated potassium channel. // *Mol . Biol . Cell.* 2004. Vol. 15, № 9. P. 4073–4088.
53. Connors E.C., Ballif B. a, Morielli A.D. Homeostatic regulation of Kv1.2 potassium channel trafficking by cyclic AMP. // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283, № 6. P. 3445–3453.
54. Mason H.S. et al. Modulation of Kv1.5 currents by protein kinase A, tyrosine kinase, and protein tyrosine phosphatase requires an intact cytoskeleton. // *Mol. Pharmacol.* 2002. Vol. 61, № 2. P. 285–293.
55. Kuras Z. et al. Modulation of Kv1.3 channels by protein kinase A I in T lymphocytes is mediated by the disc large 1-tyrosine kinase Lck complex. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2012. Vol. 302, № 10. P. C1504–12.
56. Winklhofer M. et al. Analysis of phosphorylation-dependent modulation of Kv1.1 potassium channels. // *Neuropharmacology.* 2003. Vol. 44, № 6. P. 829–842.
57. Chung I., Schlichter L.C. Native Kv1.3 channels are upregulated by protein kinase C. // *J. Membr. Biol.* 1997. Vol. 156. P. 73–85.

58. Lang F., Vallon V. Serum- and glucocorticoid-inducible kinase 1 in the regulation of renal and extrarenal potassium transport. // *Clin. Exp. Nephrol.* 2012. Vol. 16, № 1. P. 73–80.
59. Huang X.-Y., Morielli A.D., Peralta E.G. Tyrosine kinase-dependent suppression of a potassium channel by the G protein-coupled m1 muscarinic acetylcholine receptor. // *Cell.* 1993. Vol. 75, № 6. P. 1145–1156.
60. Fadool D.A. et al. Brain insulin receptor causes activity-dependent current suppression in the olfactory bulb through multiple phosphorylation of Kv1.3. // *J Neurophysiol.* 2000. Vol. 83, № 2. P. 2332–2348.
61. Imbrici P. et al. Role of receptor protein tyrosine phosphatase  $\alpha$  (RPTP $\alpha$ ) and tyrosine phosphorylation in the serotonergic inhibition of voltage-dependent potassium channels. // *Pflugers Arch.* 2000. Vol. 441, № 2-3. P. 257–262.
62. Holmes T.C. et al. Association of Src tyrosine kinase with a human potassium channel mediated by SH3 domain. // *Science.* 1996. Vol. 274. P. 2089–2091.
63. Bielanska J. et al. Voltage-dependent potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human cancer. // *Curr. Cancer Drug Targets.* 2009. Vol. 9, № 8. P. 904–914.
64. Vicente R. et al. Differential voltage-dependent K<sup>+</sup> channel responses during proliferation and activation in macrophages. // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 47. P. 46307–46320.
65. Kotecha S.A., Schlichter L.C. A Kv1.5 to Kv1.3 switch in endogenous hippocampal microglia and a role in proliferation. // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19, № 24. P. 10680–10693.
66. Villalonga N. et al. Cell cycle-dependent expression of Kv1.5 is involved in myoblast proliferation. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. Vol. 1783, № 5. P. 728–736.
67. Preußat K. et al. Expression of voltage-gated potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human gliomas. // *Neurosci. Lett.* 2003. Vol. 346, № 1-2. P. 33–36.
68. Rouzair-Dubois B., Dubois J.M. K<sup>+</sup> channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. // *J. Physiol.* 1998. Vol. 510, № 1. P. 93–102.

69. Conforti L. et al. Hypoxia regulates expression and activity of Kv1.3 channels in T lymphocytes: a possible role in T cell proliferation. // *J. Immunol.* 2003. Vol. 170, № 2. P. 695–702.
70. Wonderlin W.F., Strobl J.S. Potassium channels, proliferation and G1 progression. // *J. Membr. Biol.* 1996. Vol. 154. P. 91–107.
71. Chittajallu R. et al. Regulation of Kv1 subunit expression in oligodendrocyte progenitor cells and their role in G1/S phase progression of the cell cycle. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Vol. 99, № 4. P. 2350–2355.
72. Ghiani C.A. et al. Voltage-activated K<sup>+</sup> channels and membrane depolarization regulate accumulation of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1) and p21(CIP1) in glial progenitor cells. // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19, № 13. P. 5380–5392.
73. Cahalan M.D., Chandy K.G. Ion channels in the immune system as targets for immunosuppression. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 1997. Vol. 8, № 6. P. 749–756.
74. Pardo L.A. Voltage-gated potassium channels in cell proliferation // *Physiology (Bethesda)*. 2004. Vol. 19. P. 285–292.
75. Abdul M., Santo A., Hoosein N. Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. // *Anticancer Res.* 2003. Vol. 23, № 4. P. 3347–3351.
76. Brevet M. et al. Expression of K<sup>+</sup> channels in normal and cancerous human breast. // *Histol. Histopathol.* 2008. Vol. 23, № 8. P. 965–972.
77. Jang S.H. et al. Kv1.3 voltage-gated K(+) channel subunit as a potential diagnostic marker and therapeutic target for breast cancer. // *BMB Rep.* 2009. Vol. 42, № 8. P. 535–539.
78. Gulbins E. et al. Role of Kv1.3 mitochondrial potassium channel in apoptotic signalling in lymphocytes. // *Biochim. Biophys. Acta. Elsevier B.V.*, 2010. Vol. 1797, № 6-7. P. 1251–1259.
79. Ouadid-Ahidouch H. et al. KV1.1 K(+) channels identification in human breast carcinoma cells: involvement in cell proliferation. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 278, № 2. P. 272–277.
80. Artym V. V. Molecular proximity of Kv1.3 voltage-gated potassium channels and beta1-integrins on the plasma membrane of melanoma cells: effects of cell

- adherence and channel blockers. // *J. Gen. Physiol.* 2002. Vol. 120, № 1. P. 29–38.
81. Leanza L. et al. Inhibitors of mitochondrial Kv1.3 channels induce Bax/Bak-independent death of cancer cells. // *EMBO Mol. Med.* 2012. Vol. 4, № 7. P. 577–593.
  82. Brevet M. et al. DNA methylation of K(v)1.3 potassium channel gene promoter is associated with poorly differentiated breast adenocarcinoma. // *Cell Physiol. Biochem.* 2009. Vol. 24, № 1-2. P. 25–32.
  83. Jang S.H. et al. Anti-proliferative effect of Kv1.3 blockers in A549 human lung adenocarcinoma in vitro and in vivo. // *Eur. J. Pharmacol.* Elsevier B.V., 2011. Vol. 651, № 1-3. P. 26–32.
  84. Abdul M., Hoosein N. Reduced Kv1.3 potassium channel expression in human prostate cancer. // *J. Membr. Biol.* 2006. Vol. 214, № 2. P. 99–102.
  85. Abdul M., Hoosein N. Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. // *Oncol. Rep.* 2002. Vol. 9. P. 961–964.
  86. Fiske J.L. et al. Voltage-sensitive ion channels and cancer. // *Cancer Metastasis Rev.* 2006. Vol. 25, № 3. P. 493–500.
  87. Brevet M. et al. Expression of K<sup>+</sup> channels in normal and cancerous human breast. // *Histol. Histopathol.* 2008. Vol. 23, № 8. P. 965–972.
  88. Bielanska J. et al. Increased voltage-dependent K(+) channel Kv1.3 and Kv1.5 expression correlates with leiomyosarcoma aggressiveness. // *Oncol. Lett.* 2012. Vol. 4, № 2. P. 227–230.
  89. Arvind S. et al. Differential expression of a novel voltage gated potassium channel – Kv 1.5 in astrocytomas and its impact on prognosis in glioblastoma. // *Br. J. Neurosurg.* 2012. Vol. 26. P. 16–20.
  90. Bortner C.D., Sifre M.I., Cidlowski J.A. New Approaches for Determining Apoptotic Volume Decrease in Cells. // *Methods Enzymol.* 2007. Vol. 428. P. 161–181.
  91. Yu S.P. Regulation and critical role of potassium homeostasis in apoptosis. // *Prog. Neurobiol.* 2003. Vol. 70, № 4. P. 363–386.

92. Lauritzen I., De Weille J.R., Lazdunski M. The potassium channel opener (-)-cromakalim prevents glutamate-induced cell death in hippocampal neurons. // *J. Neurochem.* 1997. Vol. 69, № 4. P. 1570–1579.
93. Szabò I. et al. Tyrosine Phosphorylation-dependent Suppression of a Voltage-gated K<sup>+</sup> Channel in T Lymphocytes upon Fas Stimulation. // *J Biol Chem.* 1996. Vol. 271, № 34. P. 20465–20469.
94. Bortner C.D., Hughes F.M., Cidlowski J.A. A Primary Role for K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> Efflux in the Activation of Apoptosis. // *J Biol Chem.* 1997. Vol. 272, № 51. P. 32436–32442.
95. Storey N.M. et al. Stimulation of Kv1.3 potassium channels by death receptors during apoptosis in Jurkat T lymphocytes. // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 35. P. 33319–33326.
96. Valencia-cruz G. et al. K<sup>+</sup> bg and Kv1 . 3 channels mediate potassium efflux in the early phase of apoptosis in Jurkat T lymphocytes. // *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009. Vol. 297. P. 1544–1553.
97. Bock J. et al. Actinomycin D-induced apoptosis involves the potassium channel Kv1.3. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. Vol. 295, № 2. P. 526–531.
98. Szabo I. et al. Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. // *PNAS.* 2008. Vol. 105, № 39. P. 14861–14866.
99. Koeberle P.D., Schlichter L.C. Targeting K(V) channels rescues retinal ganglion cells in vivo directly and by reducing inflammation. // *Channels (Austin).* Nature Publishing Group, 2009. Vol. 4, № 5. P. 337–346.
100. Shen Q.-J. et al. Contribution of Kv channel subunits to glutamate-induced apoptosis in cultured rat hippocampal neurons. // *J. Neurosci. Res.* 2009. Vol. 87, № 14. P. 3153–3160.
101. Yuan X.J. et al. Attenuated K<sup>+</sup> channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. // *Lancet.* 1998. Vol. 351, № 9104. P. 726–727.
102. Caouette D. et al. Hydrogen peroxide modulates the Kv1.5 channel expressed in a mammalian cell line. // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 2003. Vol. 368, № 6. P. 479–486.

103. Michelakis E.D. O<sub>2</sub> sensing in the human ductus arteriosus: regulation of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in smooth muscle cells by a mitochondrial redox sensor. // *Circ. Res.* 2002. Vol. 91, № 6. P. 478–486.
104. Duprat F. et al. Susceptibility of cloned K<sup>+</sup> channels to reactive oxygen species. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1995. Vol. 92, № 25. P. 11796–11800.
105. Szabò I. et al. A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 13. P. 12790–12798.
106. Bednarczyk P. Potassium channels in brain mitochondria. // *Acta Biochim. Pol.* 2009. Vol. 56, № 3. P. 385–392.
107. Cheng Y., Debska-Vielhaber G., Siemen D. Interaction of mitochondrial potassium channels with the permeability transition pore. // *FEBS Lett.* Federation of European Biochemical Societies, 2010. Vol. 584, № 10. P. 2005–2012.
108. Szabò I. et al. Physiology of potassium channels in the inner membrane of mitochondria. // *Pflugers Arch.* 2012. Vol. 463, № 2. P. 231–246.
109. Ionov Y. et al. Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Vol. 97, № 20. P. 10872–10877.
110. Balss J. et al. Transmembrane domain length of viral K<sup>+</sup> channels is a signal for mitochondria targeting. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 34. P. 12313–12318.
111. Wulff H. et al. K<sup>+</sup> channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. // *J. Immunol.* 2004. Vol. 173, № 2. P. 776–786.
112. Wulff H. et al. The voltage-gated Kv1.3 K<sup>+</sup> channel in effector memory T cells as new target for MS. // *J. Clin. Invest.* 2003. Vol. 111, № 11. P. 1703–1713.
113. Rus H. et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005. Vol. 102, № 31. P. 11094–11099.
114. Chandy K.G. et al. K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2004. Vol. 25, № 5. P. 280–289.

115. Chandy K.G. et al. Voltage-Gated potassium channels are required for human T lymphocytes activation. // *J. Exp. Med.* 1984. Vol. 160. P. 369–385.
116. Koo G.C. et al. Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. // *J. Immunol.* 1997. Vol. 158. P. 5120–5128.
117. Lin C.S. et al. Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. // *J Exp Med.* 1993. Vol. 177, № 3. P. 637–45.
118. Matheu M.P. et al. Imaging of effector memory T cells during a delayed-type hypersensitivity reaction and suppression by Kv1.3 channel blockers // *Immunity.* 2009. Vol. 29, № 4. P. 602–614.
119. Beeton C. et al. Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2001. Vol. 98, № 24. P. 13942–13947.
120. Pennington M.W. et al. Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel in T lymphocytes. // *Mol Pharmacol.* 2009. Vol. 75, № 4. P. 762–773.
121. Hao B. et al. Identification of phase-I metabolites of the Kv1.3 blocker PAP-1 (5-(4-phenoxybutoxy)psoralen) in the rat. // *Xenobiotica.* 2011. Vol. 41, № 3. P. 198–211.
122. Mouhat S. et al. K<sup>+</sup> channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. // *Biochem. J.* 2005. Vol. 385, № Pt 1. P. 95–104.
123. Leonard R.J. et al. Selective blockers of voltage-gated K<sup>+</sup> channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992. Vol. 89, № 21. P. 10094–10098.
124. Shah K. et al. Immunosuppressive effects of a Kv1.3 inhibitor. // *Cell. Immunol.* 2003. Vol. 221, № 2. P. 100–106.
125. Beeton C. et al. Selective blocking of voltage-gated K<sup>+</sup> channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. // *J. Immunol.* 2001. Vol. 166, № 2. P. 936–944.

126. Sullivan J. et al. Fusion proteins of toxin peptides with linkers and IgG and their use as therapeutic agents.: letter WO-2006116156 USA. 2006.
127. Bagetta G., Nisticó G., Dolly J.O. Production of seizures and brain damage in rats by  $\alpha$ -dendrotoxin, a selective K<sup>+</sup> channel blocker. // *Neurosci. Lett.* 1992. Vol. 139, № 1. P. 34–40.
128. Smart S.L. et al. Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. // *Neuron.* 1998. Vol. 20, № 4. P. 809–819.
129. Brew H.M. et al. Seizures and reduced life span in mice lacking the potassium channel subunit Kv1.2, but hypoexcitability and enlarged Kv1 currents in auditory neurons. // *J. Neurophysiol.* 2007. Vol. 98. P. 1501–1525.
130. Wang Z., Fermini B., Nattel S. Sustained depolarization-induced outward current in human atrial myocytes. Evidence for a novel delayed rectifier K<sup>+</sup> current similar to Kv1.5 cloned channel currents. // *Circ. Res.* 1993. Vol. 73, № 6. P. 1061–1076.
131. Wettwer E. et al. Role of IK<sub>ur</sub> in controlling action potential shape and contractility in the human atrium: influence of chronic atrial fibrillation. // *Circulation.* 2004. Vol. 110, № 16. P. 2299–2306.
132. Naccarelli G. V et al. Vernakalant--a promising therapy for conversion of recent-onset atrial fibrillation. // *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2008. Vol. 17. P. 805–810.
133. Bradding P., Wulff H. The K<sup>+</sup> channels K(Ca)<sub>3.1</sub> and K(v)<sub>1.3</sub> as novel targets for asthma therapy. // *Br. J. Pharmacol.* 2009. Vol. 157, № 8. P. 1330–1339.
134. Valverde P., Kawai T., Taubman M. a. Potassium channel-blockers as therapeutic agents to interfere with bone resorption of periodontal disease. // *J. Dent. Res.* 2005. Vol. 84, № 6. P. 488–499.
135. Xu J. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates energy homeostasis and body weight. // *Hum. Mol. Genet.* 2003. Vol. 12, № 5. P. 551–559.
136. Xu J. et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates peripheral insulin sensitivity. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. Vol. 101, № 9. P. 3112–3117.

137. Li Y. et al. Voltage-gated potassium channel Kv1.3 regulates GLUT4 trafficking to the plasma membrane via a Ca<sup>2+</sup>-dependent mechanism. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006. Vol. 290, № 2. P. C345–51.
138. Mouhat S. et al. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. // *Curr. Pharm. Des.* 2008. Vol. 14, № 24. P. 2503–2518.
139. Dauplais M. et al. On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures. // *J Biol Chem.* 1997. Vol. 272, № 7. P. 4302–4309.
140. Mouhat S. et al. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. // *Biochem. J.* 2004. Vol. 378, № Pt 3. P. 717–726.
141. Verdier L. et al. Identification of a novel pharmacophore for peptide toxins interacting with K<sup>+</sup> channels. // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 22. P. 21246–21255.
142. Kaufenstein S. et al. A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels. // *Toxicon.* 2003. Vol. 42, № 1. P. 43–52.
143. Marx U.C., Daly N.L., Craik D.J. NMR of conotoxins: structural features and an analysis of chemical shifts of post-translationally modified amino acids. // *Magn. Reson. Chem.* 2006. Vol. 44 Spec No. P. S41–S50.
144. Wang F. et al. Structural and functional analysis of natrin, a venom protein that targets various ion channels. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. Vol. 351, № 2. P. 443–448.
145. Vassilevski A.A., Kozlov S.A., Grishin E. V. Molecular diversity of spider venom. // *Biochem. Biokhimiia.* 2009. Vol. 74, № 13. P. 1505–1534.
146. Castañeda O. et al. Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean sea anemone *Stichodactyla helianthus*. // *Toxicon.* 1995. Vol. 33. P. 603–613.
147. Cotton J. et al. A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for Kv1 channels. // *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol. 244. P. 192–202.
148. Zhu S. et al. Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2011. Vol. 10, № 2. P. M110.002832.

149. Mouhat S. et al. Pharmacological profiling of orthochirus scrobiculosus toxin 1 analogs with a trimmed N-terminal domain. // *Mol. Pharmacol.* 2006. Vol. 69, № 1. P. 354–362.
150. Corzo G. et al. A selective blocker of Kv1.2 and Kv1.3 potassium channels from the venom of the scorpion *Centruroides suffusus suffusus*. // *Biochem. Pharmacol.* 2008. Vol. 76, № 9. P. 1142–1154.
151. French R.J., Shoukimas J.J. Blockage of squid axon potassium conductance by internal tetra-N-alkylammonium ions of various sizes. // *Biophys. J.* 1981. Vol. 34, № 2. P. 271–291.
152. Choi K.L. et al. The internal quaternary ammonium receptor site of Shaker potassium channels. // *Neuron.* 1993. Vol. 10. P. 533–541.
153. Lenaeus M.J. et al. Structural basis of TEA blockade in a model potassium channel. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. Vol. 12, № 5. P. 454–459.
154. Crouzy S., Bernèche S., Roux B. Extracellular blockade of K(+) channels by TEA: results from molecular dynamics simulations of the KcsA channel. // *J. Gen. Physiol.* 2001. Vol. 118, № 2. P. 207–218.
155. Goetz M.A. et al. Potent Nor-triterpenoid blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 from *Spachea correae*. // *Tetrahedron Lett.* 1998. Vol. 39. P. 2895–2898.
156. Felix J.P. et al. Identification and biochemical characterization of a novel nortriterpene inhibitor of the human lymphocyte voltage-gated potassium channel, Kv1.3. // *Biochemistry.* 1999. Vol. 38, № 16. P. 4922–4930.
157. Bruhova I., Zhorov B.S. Monte Carlo-energy minimization of correolide in the Kv1.3 channel: possible role of potassium ion in ligand-receptor interactions. // *BMC Struct. Biol.* 2007. Vol. 7. P. 5.
158. Bohuslavizki K.H. et al. Blocking of Potassium Channels in Ranvier Nodes and its Possible Significance on Demyelinating Diseases. // *Gen. Physiol. Biophys.* 1993. Vol. 12. P. 491–496.
159. Vennekamp J. et al. Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxypsoralens: a new class of immunomodulators. // *Mol. Pharmacol.* 2004. Vol. 65, № 6. P. 1364–1374.

160. Schmitz A. et al. Design of PAP-1 , a Selective Small Molecule Kv1 . 3 Blocker , for the Suppression of Effector Memory T Cells in Autoimmune Diseases. // Mol Pharmacol. 2005. Vol. 68. P. 1254–1270.
161. Azam P. et al. Targeting Effector Memory T Cells with the Small Molecule Kv1.3 Blocker PAP-1 Suppresses Allergic Contact Dermatitis. // J Invest Dermatol. 2007. Vol. 127, № 6. P. 1419–1429.
162. Harvey A.J. et al. A new class of blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 via modification of the 4- or 7-position of khellinone. // J. Med. Chem. 2006. Vol. 49, № 4. P. 1433–1441.
163. Schmalhofer W. a et al. Di-substituted cyclohexyl derivatives bind to two identical sites with positive cooperativity on the voltage-gated potassium channel, K(v)1.3. // Biochemistry. 2003. Vol. 42, № 16. P. 4733–4743.
164. Gradl S.N. et al. Protein Surface Recognition by Rational Design: Nanomolar Ligands for Potassium Channels. // J Am Chem Soc. 2006. Vol. 125, № 42. P. 12668–12669.
165. Ren Y.R. et al. Clofazimine inhibits human Kv1.3 potassium channel by perturbing calcium oscillation in T lymphocytes. // PLoS One. 2008. Vol. 3, № 12. P. e4009.
166. Chen P. et al. Development of planar patch clamp technology and its application in the analysis of cellular electrophysiology. // Prog. Nat. Sci. National Natural Science Foundation of China and Chinese Academy of Sciences, 2004. Vol. 19, № 2. P. 153–160.
167. Метод локальной фиксации потенциала. [Online] // Википедия. URL: [https://ru.wikipedia.org/wiki/Метод\\_локальной\\_фиксации\\_потенциала](https://ru.wikipedia.org/wiki/Метод_локальной_фиксации_потенциала).
168. Mathes C. et al. QPatch: the missing link between HTS and ion channel drug discovery. // Comb. Chem. High Throughput Screen. 2009. Vol. 12, № 1. P. 78–95.
169. Farre C. et al. Port-a-Patch and Patchliner : high fidelity electrophysiology for secondary screening and safety pharmacology. // Comb. Chem. High Throughput Screen. 2009. Vol. 12. P. 24–37.
170. Jow F. et al. Validation of a medium-throughput electrophysiological assay for KCNQ2/3 channel enhancers using IonWorks HT. // J. Biomol. Screen. 2007. Vol. 12, № 8. P. 1059–1067.

171. Jenkins D.P. et al. Development of a QPatch automated electrophysiology assay for identifying KCa3.1 inhibitors and activators. // *Assay Drug Dev. Technol.* 2013. Vol. 11, № 9-10. P. 551–560.
172. Knaus H.G. et al. [125I]margatoxin, an extraordinarily high affinity ligand for voltage-gated potassium channels in mammalian brain. // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34. P. 13627–13634.
173. Grunnet M. The voltage-gated potassium channel subunit, Kv1.3, is expressed in epithelia. // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2003. Vol. 1616, № 1. P. 85–94.
174. Valdivia H.H. et al. Noxiustoxin and leiurutoxin III, two homologous peptide toxins with binding properties to synaptosomal membrane K<sup>+</sup> channels. // *Biochem. Int.* 1992. Vol. 27. P. 953–962.
175. Bergeron Z.L., Bingham J.-P. Scorpion toxins specific for potassium (K<sup>+</sup>) channels: a historical overview of peptide bioengineering. // *Toxins (Basel).* 2012. Vol. 4, № 11. P. 1082–1119.
176. Pragl B. et al. Synthesis, characterization, and application of cy-dye- and alexa-dye-labeled hongotoxin(1) analogues. The first high affinity fluorescence probes for voltage-gated K<sup>+</sup> channels. // *Bioconjug. Chem.* 2002. Vol. 13, № 3. P. 416–425.
177. Slack M. et al. Identification of novel Kv1.3 blockers using a fluorescent cell-based ion channel assay. // *J. Biomol. Screen.* 2006. Vol. 11, № 1. P. 57–64.
178. Terstappen G.C. Efflux assay technology for screening of ion channels. 2011.
179. Weaver C.D. et al. A thallium-sensitive, fluorescence-based assay for detecting and characterizing potassium channel modulators in mammalian cells. // *J. Biomol. Screen.* 2004. Vol. 9, № 8. P. 671–677.
180. Southan A., Clark G. Recent advances in electrophysiology-based screening technology and the impact upon ion channel discovery research. // *Methods Mol. Biol.* 2009. Vol. 565. P. 187–208.
181. Lü Q., An W. Impact of novel screening technologies on ion channel drug discovery. // *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2008. Vol. 11. P. 185–194.

182. Nekrasova O. V et al. Recombinant Kv channels at the membrane of *Escherichia coli* bind specifically agitoxin2. // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2009. Vol. 4, № 1. P. 83–91.
183. Kudryashova K.S. et al. Fluorescent system based on bacterial expression of hybrid KcsA channels designed for Kv1.3 ligand screening and study. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. Vol. 405, № 7. P. 2379–2389.
184. Hoang A.N. et al. Hetlaxin, a new toxin from the *Heterometrus laoticus* scorpion venom, interacts with voltage-gated potassium channel Kv1.3. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2013. Vol. 449, № 5. P. 109–111.
185. Legros C. et al. Generating a high affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels. // *J Biol Chem.* 2000. Vol. 275, № 22. P. 16918–16924.
186. Legros C. et al. Engineering-specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channels into KcsA. // *Biochemistry.* 2002. Vol. 41, № 51. P. 15369–15375.
187. Renner L.D., Weibel D.B. Cardiolipin microdomains localize to negatively curved regions of *Escherichia coli* membranes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011. Vol. 108, № 15. P. 6264–6269.
188. Takacs Z. et al. A designer ligand specific for Kv1.3 channels from a scorpion neurotoxin-based library. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106, № 52. P. 22211–22216.
189. Grissmer S. et al. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. // *Mol. Pharmacol.* 1994. Vol. 45. P. 1227–1234.
190. Chandy K.G. et al. Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. // *Toxicon.* 2001. Vol. 39, № 9. P. 1269–1276.
191. Mourre C. et al. Distribution in rat brain of binding sites of Kaliotoxin, a blocker of Kv1.1 and Kv1.3 alpha-subunits. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999. Vol. 291. P. 943–952.
192. Gómez-Hernandez J.M. et al. Molecular basis for different pore properties of potassium channels from the rat brain Kv1 gene family. // *Pflugers Arch.* 1997. Vol. 434. P. 661–668.

193. Garcia M.L. et al. Purification and Characterization of Three Inhibitors of Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* Venom. // *Biochemistry*. 1994. Vol. 33. P. 6834–6839.
194. Andalib P. et al. The external TEA binding site and C-type inactivation in voltage-gated potassium channels. // *Biophys. J.* 2004. Vol. 87, № 5. P. 3148–3161.
195. Lange A. et al. Toxin-induced conformational changes in a potassium channel revealed by solid-state NMR. // *Nature*. 2006. Vol. 440, № 7086. P. 959–962.
196. Krezel A.M. et al. Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. // *Protein Sci.* 1995. Vol. 4, № 8. P. 1478–1489.
197. Yu K. et al. Computational simulations of interactions of scorpion toxins with the voltage-gated potassium ion channel. // *Biophys. J.* 2004. Vol. 86, № 6. P. 3542–3555.
198. Takeuchi K. et al. Structural Basis of the KcsA K<sup>+</sup> Channel and Agitoxin2 Pore-Blocking Toxin Interaction by Using the Transferred Cross-Saturation Method. 2003. Vol. 11. P. 1381–1392.
199. Han S. et al. Structural Basis of a Potent Peptide Inhibitor Designed for Kv1.3 Channel, a Therapeutic Target of Autoimmune Disease \*. 2008.
200. Aiyar J. et al. Topology of the pore-region of a K<sup>+</sup> channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. // *Neuron*. 1995. Vol. 15, № 5. P. 1169–1181.
201. Mourão C.B.F., Schwartz E.F. Protease inhibitors from marine venomous animals and their counterparts in terrestrial venomous animals. // *Mar. Drugs*. 2013. Vol. 11, № 6. P. 2069–2112.
202. Rehm H. Molecular aspects of neuronal voltage-dependent K<sup>+</sup> channels. // *Eur. J. Biochem.* 1991. Vol. 202, № 3. P. 701–713.
203. Fathi H., Rowan E., Harvey A. The facilitatory actions of snake venom phospholipase A(2) neurotoxins at the neuromuscular junction are not mediated through voltage-gated K(+) channels. // *Toxicon*. 2001. Vol. 39, № 12. P. 1871–1882.

204. Uawonggul N. et al. Purification and characterization of Heteroscorpine-1 (HS-1) toxin from *Heterometrus laoticus* scorpion venom. // *Toxicon*. 2007. Vol. 49, № 1. P. 19–29.
205. Vandendriessche T. et al. Purification, molecular cloning and functional characterization of HelaTx1 (*Heterometrus laoticus*): the first member of a new  $\kappa$ -KTX subfamily. // *Biochem. Pharmacol.* 2013. Vol. 83, № 9. P. 1307–1317.
206. Hoang A.N. et al. Vietnamese *Heterometrus laoticus* scorpion venom: evidence for analgesic and anti-inflammatory activity and isolation of new polypeptide toxin acting on Kv1.3 potassium channel. // *Toxicon*. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 77. P. 40–48.
207. Jaravine V.A. et al. Three-dimensional structure of toxin OSK1 from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. // *Biochemistry*. 1997. Vol. 36. P. 1223–1232.
208. Gao B. et al. A potent potassium channel blocker from *Mesobuthus eupeus* scorpion venom. // *Biochimie*. Elsevier Masson SAS, 2010. Vol. 92, № 12. P. 1847–1853.
209. Gao B. et al. Molecular divergence of two orthologous scorpion toxins affecting potassium channels. // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* Elsevier Inc., 2011. Vol. 159, № 3. P. 313–321.
210. Zhu S. et al. Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2011. Vol. 10, № 2. P. M110.002832.