

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Волынцева Алена Дмитриевна

**Молекулярное моделирование структурной динамики потенциал-
управляемых калиевых каналов Kv1 и их комплексов с пептидными
блокаторами**

Специальность 03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

кандидат физико-математических наук

Новоселецкий Валерий Николаевич

доктор физико-математических наук, профессор

Шайтан Константин Вольдемарович

Москва – 2019

Оглавление

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ	5
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.....	6
Введение.....	6
Цели и задачи исследования	9
Научная новизна и практическая значимость работы	10
Личный вклад автора	12
Положения, выносимые на защиту	13
Апробация работы.....	13
Публикации.....	14
Структура и объем диссертации.....	14
Глава 1. Обзор литературы	15
1.1. Строение, классификация и функционирование потенциал- управляемых калиевых каналов.	15
1.1.1. Классификация и экспрессия потенциал-управляемых K^+ каналов... ..	16
1.1.2. Структура эукариотических потенциал-управляемых K^+ каналов и гомологичных прокариотических каналов.	19
1.1.3. Механизм функционирования K_v каналов.	24
1.2. Строение, классификация и функционирование блокаторов потенциал-управляемых калиевых каналов.	30
Пептидные блокаторы потенциал-управляемых калиевых каналов.	32
1.3. Комплексы калиевых каналов с блокаторами.	52
1.4. Применение методов молекулярного моделирования калиевых каналов и их комплексов.	58
1.4.1. Броуновская динамика.....	60

1.4.2. Молекулярный докинг.....	61
1.4.3. Молекулярная динамика.....	67
1.4.4. Моделирование методом Монте-Карло.....	71
1.4.5. Расчет энергии комплекса канал-токсин.	75
1.4.6. Применение методов молекулярного моделирования для расчета взаимодействий между каналами и блокаторами.	76
Глава 2. Материалы и методы	81
2.1. Анализ известных данных об активности блокаторов.....	81
2.2. Получение и уравнивание структур токсинов.	82
2.3. Конструирование уравновешенных структур каналов.	83
2.4. Получение и уравнивание структур комплексов каналов с токсинами.....	84
Подбор оптимальной стартовой ориентации токсина в сайте связывания	85
2.5. Анализ данных.	85
2.6. Расчет энергии связывания токсинов с K _V 1 каналами методом потенциала средней силы.....	87
Глава 3. Результаты и обсуждение	88
3.1. Моделирование структур нативных каналов K _V 1 и гибридных каналов KcsA- K _V 1.....	88
3.2. Моделирование структур пептидных блокаторов.....	92
3.3. Моделирование структур комплексов калиевых потенциал- управляемых калиевых каналов с пептидными блокаторами.....	93
3.3.1. Особенности интерфейса взаимодействия K _V 1.X каналов с аджитоксином 2.....	95

3.3.1.1. Характеристика интерфейса связывания аджитоксина 2 с каналом KcsA-K _V 1.3	96
3.3.1.2. Детальный анализ структур комплексов каналов K _V 1.6 и KcsA-K _V 1.6 с пептидными блокаторами	98
3.3.1.3. Детальное описание связывания нативной и мутантных форм аджитоксина 2 с каналом KcsA-K _V 1.1.....	116
3.3.2. Общие черты связывания аджитоксина с каналами семейства KcsA-K _V 1.X.....	131
3.3.3. Расчет энергии связывания аджитоксина 2 (дикого типа и мутантных форм) с каналом K _V 1.1.....	133
Заключение.....	136
Выводы.....	138
Благодарности.....	139
Список публикаций по теме диссертации.....	140
Список литературы	144

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

Eag – семейство потенциал-управляемые калиевых каналов Ether-a-go-go,

K_{ir} – калиевый канал - внутренний выпрямитель,

K_v – потенциал-управляемый калиевый канал,

LQTS или LQT – синдром удлиненного интервала QT (long QT syndrome),

а.о. – аминокислотный остаток,

БД – броуновская динамика,

Крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия,

МД – молекулярная динамика,

ПД – потенциал действия,

ПСС – потенциал средней силы,

ПЧД – потенциал-чувствительный домен,

РСА – рентгеноструктурный анализ,

СКО – среднеквадратичное отклонение.

СФ – селективный фильтр,

ТМ – трансмембранный сегмент,

ЯМР – ядерный магнитный резонанс.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Введение

Одной из актуальных задач современной биофизики является изучение структурных и функциональных особенностей ионных каналов, а также их комплексов с модуляторами.

Диссертация посвящена изучению потенциал-управляемых калиевых каналов семейства K_v1 – распространенной группы трансмембранных белков, контролирующих перенос ионов K^+ через клеточную мембрану в ответ на изменение мембранного потенциала. K_v1 каналы широко распространены в организме человека и задействованы в выполнении разнообразных физиологических функций: поддержании потенциала покоя и частоты следования потенциала действия в возбудимых клетках [1], реполяризации нейронального и сердечного потенциалов действия, регуляции кальциевой сигнализации и клеточного объема, стимуляции клеточной пролиферации и миграции [2].

Калиевые каналы представлены во всех живых организмах и играют ключевую роль в возбудимых и невозбудимых клетках при определении формы и длительности потенциала действия, контроле мембранного потенциала, модулировании секреции гормонов, эпителиальных функций и снижении сигналов возбуждения. Показано, что нарушения функционирования ионных каналов за счет возникновения мутаций и изменения уровня экспрессии может сопровождаться развитием неврологических [3, 4], аутоиммунных [5–7], онкологических [8–12] заболеваний.

Знание структур калиевых каналов, а также их комплексов с различными лигандами является важным условием понимания механизмов их функционирования, а также установления механизмов патогенеза с участием калиевых каналов. Получение структурной информации о полной архитектуре

мембранных белков, в частности, K_v -каналов, долгое время оставалось значительной проблемой, особенно в отношении их цитоплазматических доменов. Для более 3000 последовательностей ионных каналов в базе данных белковых структур PDB доступно только около 600 пространственных структур. Однако за последние несколько лет криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ) нашла широкое применение для создания структур ионных каналов, включая несколько K_v -каналов [13–19]. Одновременное использование традиционных методов определения структуры (таких как рентгеновская кристаллография и ЯМР-спектроскопия) и крио-ЭМ, а также интеграция с биохимическими, электрофизиологическими и спектроскопическими данными открывает широкие возможности изучения калиевых каналов [20].

Связывание лигандов с мембранными белками изменяет их функциональные свойства. Согласно данным базы данных UniProt (<https://www.uniprot.org/>) около 280 пептидных блокаторов калиевых каналов выделены из яда скорпионов (КТх). Исследования структуры и функционирования калиевых каналов, а также их комплексов с пептидными блокаторами позволят расширить знания об особенностях калиевых каналов, а также разработать высокоселективные блокаторы на основе природных соединений для использования в качестве лекарственных препаратов [21–23]. Определение молекулярных основ селективности связывания блокаторов с калиевыми каналами является важной задачей структурной биологии.

Недостаток экспериментальных данных о структурных особенностях комплексов калиевых каналов с лигандами может быть восполнен данными разработанных подходов молекулярного моделирования. Вычислительные эксперименты позволяют глубже изучить механизмы взаимодействия и образования межмолекулярных контактов в комплексах, дополняя и, в некоторых случаях, заменяя дорогостоящие экспериментальные методики.

Методы молекулярного моделирования успешно применялись для моделирования функционирования [24] и строения K_v -каналов и их комплексов с пептидными блокаторами поры, анализа межмолекулярных взаимодействий, описания структурных особенностей комплексов [25]. Несмотря на значительный прогресс в этой области исследований, остаются нерешенными вопросы выявления ключевых межмолекулярных взаимодействий, определяющих аффинность и селективность связывания, разработки быстрых вычислительных алгоритмов оценки энергии связывания в макромолекулярных комплексах, а также создания методики подбора точечных мутаций, изменяющих параметры связывания блокаторов с калиевыми каналами.

Цели и задачи исследования

Цель настоящего исследования – изучение структурной организации порового домена потенциал-управляемых калиевых каналов K_v1 , а также их комплексов с пептидными блокаторами семейства α -КТх для выявления молекулярных механизмов взаимодействий.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Построение структурных моделей калиевых каналов семейства K_v1 , гибридных каналов $KcsA$ - K_v1 и их комплексов с пептидными блокаторами;
2. Анализ структурных особенностей, определяющих параметры связывания пептидных блокаторов с изучаемыми каналами;
3. Дизайн пептидных блокаторов с измененной активностью в отношении исследуемых каналов.

Научная новизна и практическая значимость работы

Настоящая диссертация посвящена исследованию структурной организации потенциал-управляемых калиевых каналов семейства K_v1 , а также их комплексов с поровыми блокаторами, выделенными из яда скорпионов.

На данный момент нами не обнаружены опубликованные структуры калиевых каналов $K_v1.1$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$ и их комплексов с пептидными блокаторами, а также компьютерные модели, позволяющие детально изучить полный репертуар образующихся при взаимодействии с блокаторами контактов.

В рамках работы были впервые смоделированы структуры комплексов калиевых каналов $K_v1.1$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$ с пептидными блокаторами семейства α -КТх методом моделирования по гомологии по шаблону кристаллографической структуры комплекса эукариотического гибридного канала $K_v1.2-2.1$ с харибдотоксином. Было продемонстрировано, что такой подход в сочетании с разработанным протоколом расчета молекулярной динамики позволяет получать достоверные комплексы, отражающие реальные детали подстройки структур молекул в процессе связывания и позволяющие предсказывать аффинность связывания мутантных форм блокаторов.

В результате работы был детально описан интерфейс связывания калиевых каналов $K_v1.1$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$ с пептидными высокоаффинными блокаторами, выделенными из яда скорпионов. Полный репертуар образующихся контактов был классифицирован согласно типам взаимодействия и относительным оценкам их стабильности в процессе молекулярной динамики, определены ключевые для формирования комплексов аминокислотные остатки каналов и токсинов. Анализ интерфейсов взаимодействий позволил выявить консервативные и переменные контакты в ряду комплексов пептидов с каналами $K_v1.1$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$, отвечающие за различия в аффинности связывания родственных

блокаторов. Проведенные исследования доказали воспроизводимость образующихся контактов в комплексах токсинов семейства α -КТх с нативными $K_v1.X$ и гибридными каналами KcsA- $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$), что позволяет в дальнейшем использовать модельные системы гибридных каналов для анализа связывания с блокаторами.

Разработанный алгоритм расчета энергии связывания за счет оценки силы образующихся контактов позволил расчетным путем проанализировать различия в связывании пептидных блокаторов с калиевыми каналами $K_v1.1$, $K_v1.3$ и $K_v1.6$, согласующиеся с экспериментальными данными *in vitro*. Применение оригинальной методики расчета интерфейса связывания позволило оценить влияние предложенных мутаций в аминокислотные последовательности токсинов на аффинность и селективность связывания. Помимо этого, применение разработанного подхода позволяет значительно минимизировать временные и вычислительные затраты, что позволяет расценивать его как экспресс-метод перед проведением классических экспериментов *in silico* и *in vitro*.

В качестве подтверждающей оценки энергии взаимодействия дикой и мутантных форм аджитоксина с гибридным каналом KcsA- $K_v1.1$ были произведены расчеты методом потенциала средней силы. Результаты проведенных расчетов согласуются с экспериментально полученными *in vitro* константами связывания и результатами оценки аффинности связывания за счет предложенного алгоритма описания всех образующихся взаимодействий.

Результаты работы представляют значимость для дальнейших фундаментальных научных исследований основ функционирования калиевых каналов и процессов связывания высокомолекулярных соединений и, в частности, изучения структурных основ аффинности и селективности пептидных блокаторов при взаимодействии с каналами.

Конструирование селективных блокаторов на основе проведенного детального анализа интерфейсов связывания с потенциал-управляемыми

каналами важно для белкового инжиниринга и рационального дизайна лекарственных средств на основе мутантных форм пептидных блокаторов. Полученные результаты также интересны для разработки молекулярных детектирующих систем *in vivo*, позволяющих определять места экспрессии конкретных калиевых каналов, что важно как с точки зрения вклада в развитие науки физиологии и биофизики, так и с прикладной стороны для направленной терапии заболеваний, связанных с гиперэкспрессией отдельных потенциал-управляемых калиевых каналов.

Разработанный вычислительный алгоритм является универсальным и может быть распространен на моделирование комплексов других калиевых каналов с пептидными лигандами. Выявленные особенности строения высокомолекулярных комплексов могут быть использованы для включения в программу учебных курсов по биофизике и физиологии человека и животных.

Личный вклад автора

Автором выполнены детальный анализ опубликованных экспериментальных данных о константах связывания потенциал-управляемых калиевых каналов и пептидных блокаторов, создание молекулярных моделей потенциал-управляемых калиевых каналов, пептидных блокаторов и их комплексов методами молекулярного докинга и моделирования по гомологии, проведение расчетов молекулярной динамики, получение энергетических оценок связывания каналов с блокаторами, обработка полученных данных и подготовка результатов к печати. Планирование исследований, разработка алгоритма анализа контактов, образующихся в комплексах потенциал-управляемых калиевых каналов с пептидными блокаторами, обсуждение полученных результатов, формулирование выводов и публикация статей осуществлялись совместно с руководителями, к.ф.-м.н., Новоселецким В.Н., д.ф.-м.н., профессором Шайтаном К.В., а также с д.б.н., профессором Феофановым А.В.

Положения, выносимые на защиту

1. Структура комплексов потенциал-управляемых калиевых каналов с исследуемыми пептидными блокаторами является консервативной в пределах семейства K_v1 каналов.
2. Взаимодействия пептидных блокаторов с потенциал-управляемыми калиевыми каналами семейства K_v1 носят многоточечный характер. Влияние введения отдельных локальных мутаций в аминокислотную последовательность пептидов может компенсироваться за счет структурных перестроек боковых цепей соседних аминокислотных остатков.
3. Аминокислотные остатки D411, Y425, G426 и D427 каналов $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) являются основными для связывания токсинов семейства α -КТх, включая AgTx2, КТх, OSK1.
4. Высокий уровень воспроизводимости образуемых контактов доказывает возможность использования модели гибридного канала KcsA- $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) для исследования процесса связывания блокаторов с соответствующим нативным каналом $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$).

Апробация работы

Результаты проведенных исследований были представлены в виде стендовых докладов на российских и международных конференциях, конгрессах и симпозиумах: Международной конференции "BIOMEMBRANES 2018" (Долгопрудный, Россия, 2018) и "BIOMEMBRANES 2016" (Долгопрудный, Россия, 2016), Международной научной конференции "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" (Москва, Россия, 2017), Российской международной конференции по криоэлектронной микроскопии RICSEM2017 (Москва, Россия, 2017), Первом Российском кристаллографическом конгрессе (Москва, Россия, 2016), 41 конгрессе FEBS (Кушадасы, Турция, 2016), Международном симпозиуме "Molecular

Neurobiology Today and Tomorrow" (Москва, Россия, 2017), Международном конгрессе "Биотехнологии: состояние и перспективы развития" (Москва, Россия, 2017), Седьмой международной конференции по Биоинформатике (работа награждена дипломом за лучший доклад) (Рим, Италия, 2016), Десятой международной конференции "Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/BGRS-2016" (Москва, Россия, 2016), Международной конференции "Channelopathy-2016" (Париж, Франция, 2016), Седьмом российском симпозиуме "БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ" (Новосибирск, Россия, 2015), Международной школе для студентов и молодых ученых по структуре и функциям ионных каналов (ISonIC-2016) (Москва, Россия, 2016), а также в виде устного доклада на XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015" (Москва, Россия, 2015) и пленарного доклада на Пятой Международной научной конференции молодых ученых (Баку, Азербайджан, 2017).

Публикации

По материалам работы опубликовано 7 статей в журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, и 17 тезисов в сборниках научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список публикаций по теме диссертации и список литературы, состоящий из 344 наименований. Работа содержит 40 рисунков и 10 таблиц.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Строение, классификация и функционирование потенциал-управляемых калиевых каналов. Калиевые (K^+) каналы являются мембранными белками, регулирующими протекание различных биологических процессов за счет переноса ионов калия K^+ через мембрану.

Геном человека включает более 90 генов, кодирующих основные субъединицы калиевых каналов [26]. Согласно структурной организации, числу трансмембранных сегментов (ТМ) и принципам активации и функционирования 78 представителей калиевых каналов могут быть разделены на 4 группы [27] (Рисунок 1): 2 ТМ калиевые каналы внутреннего выпрямления K_{ir} , фоновые двупоровые 4 ТМ каналы (K_{2P}), Ca^{2+} -активируемые 6 или 7 ТМ каналы (K_{Ca}), а также потенциал-управляемые 6 ТМ (K_V) калиевые каналы [2]. Потенциал-управляемые калиевые каналы формируют наибольшее семейство, кодируемое примерно 40 генами [28].

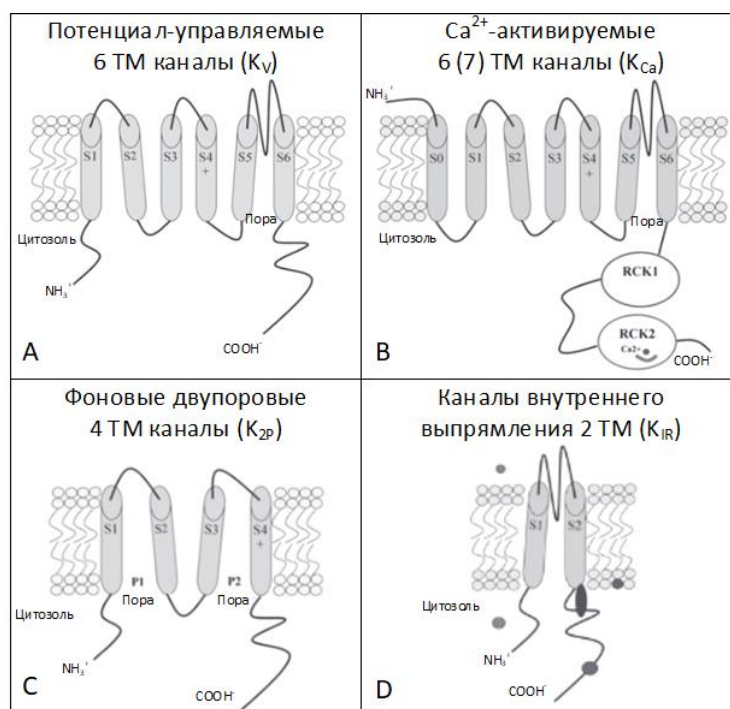


Рисунок 1. Схематическое представление трансмембранных доменов (ТМ) α -субъединиц калиевых каналов: А – потенциал-управляемые 6 ТМ (K_V) калиевые каналы, В – Ca^{2+} -активируемые 6 или 7 ТМ каналы (K_{Ca}), С – фоновые двупоровые 4 ТМ каналы (K_{2P}), D – 2 ТМ калиевые каналы внутреннего выпрямления K_{ir} (модифицировано [26]).

Потенциал-управляемые калиевые каналы осуществляют регуляторную роль в физиологических процессах: функционировании возбудимых клеток [29], регуляции апоптоза [30], процессах клеточного роста и дифференцировки [31], выделении гормонов [32,33], нейротрансмиттеров [34] и др.

1.1.1. Классификация и экспрессия потенциал-управляемых K^+ каналов.

Согласно гомологии аминокислотных последовательностей, K_V -каналы подразделяются на 12 подсемейств, отличающихся структурной организацией (K_V1 - K_V12) [28] (Рисунок 2).

Гены, кодирующие каналы семейств K_V1 - K_V4 , тесно связаны с подтипами клонированных каналов дрозофилы *Drosophila melanogaster*. K_V каналы включают четыре семейства: K_V1 (KCNA), K_V2 (KCNB), K_V3 (KCNC) и K_V4 (KCND) (Shaker, Shab, Shaw и Shal у *Drosophila*). Они обладают сходным строением и являются гомотетрамерами с осью симметрии 4-го порядка.

Тип Shaker связан с семейством K_V1 каналов, кодируемых 8 генами, от $K_V1.1$ до $K_V1.8$. Потенциал-управляемые калиевые каналы типа Shaker (K_V1), являющиеся самой крупной группой, были клонированы более 30 лет назад [35] и с этого времени стали наиболее изученными каналами в плане описания механизмов функционирования и структуры. Было обнаружено, что эти каналы селективно блокируются пептидными лигандами, выделенными из яда животных. Все эти каналы в той или иной степени специфично и широко распространены и могут быть обнаружены в мозге ($K_V1.1$ - $K_V1.4$, $K_V1.6$ и $K_V1.8$), нервной системе ($K_V1.1$ и $K_V1.2$), сердце ($K_V1.1$, $K_V1.2$, и $K_V1.4$ - $K_V1.8$), скелетных мышцах ($K_V1.1$, $K_V1.4$, $K_V1.7$ и $K_V1.8$), гладкой мускулатуре ($K_V1.2$ и $K_V1.5$), поджелудочной железе ($K_V1.1$ - $K_V1.3$), легких ($K_V1.3$ - $K_V1.7$), плаценте ($K_V1.7$), почках ($K_V1.5$ и $K_V1.8$), сетчатке ($K_V1.1$ и $K_V1.2$), толстой кишке ($K_V1.5$ и $K_V1.6$), а также в гемопоэтических клетках, лимфоцитах и остеокластах ($K_V1.3$) [36]. Митохондриальный канал $K_V1.3$ играет важную

роль в апоптозе раковых клеток, а его ингибирование снижает рост опухоли *in vivo* [37]. Дополнительно была выявлена роль канала Kv1.5 в апоптозе опухолевых клеток, таких как глиобластомы, рака молочной железы [38].

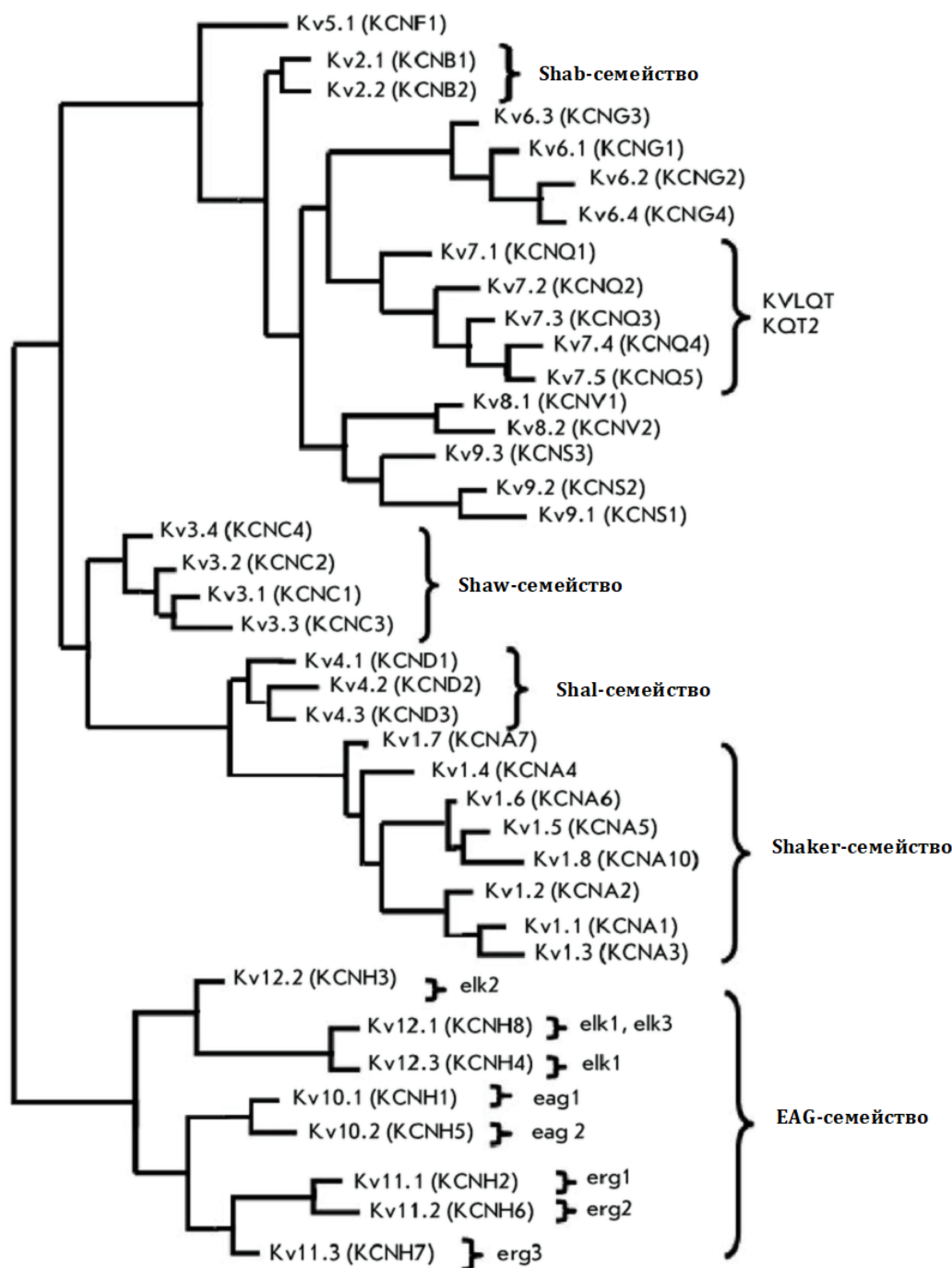


Рисунок 2. Филогенетическое древо Kv-каналов, основанное на выравнивании аминокислотных последовательностей. Скобки объединяют каналы, принадлежащие к одному семейству. Имена даны в соответствии с системой IUPAC (в скобках приведены альтернативные названия в соответствии с HGNC) (модифицировано [24]).

Калиевые каналы типа Shab включают в себя каналы $K_v2.1$ и $K_v2.2$. Канал $K_v2.1$ был обнаружен в мозге, сердце, почках, скелетных мышцах, легких, сетчатке и поджелудочной железе. Каналы $K_v2.2$ экспрессируются в мозге, сердце, нейронах и гладкой мускулатуре.

К типу Shaw принадлежат каналы семейства K_v3 , кодируемые четырьмя генами ($K_v3.1$ - $K_v3.4$). Изоформы этих каналов с различными С-концами (образованными за счет альтернативного сплайсинга) были обнаружены у млекопитающих в клетках мозга. Некоторые каналы также расположены в скелетных мышцах ($K_v3.1$ и $K_v3.4$), поджелудочной железе ($K_v3.2$ и $K_v3.4$), печени ($K_v3.3$), а также в селезенке и лимфоцитах ($K_v3.1$). Среди этих каналов только у $K_v3.2$ и $K_v3.4$ каналов была обнаружена чувствительность к некоторым токсинам морских анемонов.

Тип Shal, представленный каналами $K_v4.1$ - $K_v4.3$, обнаружен в мозге, сердце, гладких мышцах и нейронах. Изменения экспрессии каналов $K_v4.2$ наблюдаются в моделях эпилепсии у животных, каналы K_v4 задействованы в возникновение болезни Альцгеймера, патологий сердца [39].

Тип KQT включает в себя 5 каналов: $K_v7.1$ - $K_v7.5$. Каналы $K_v7.1$ распределены в тканях сердца, поджелудочной железы, внутреннего уха, почек, легких, толстой кишки и плаценты, $K_v7.2$ – в ганглиях симпатического нерва и мозге, $K_v7.3$ – в мозге, семенниках, сетчатке, толстой кишке. Другие $K_v7.X$ каналы в основном экспрессируются в волосковых клетках внутреннего уха, спиральных ганглиозных клетках, скелетных мышцах и ганглиях симпатического нерва. Доказано, что три четверти случаев врожденного синдрома удлинения интервала QT связаны с нарушениями в работе каналов $K_v7.1$ (35% [40]), $K_v11.1$, $Na_v1.5$. Также есть информация о возможной связи между нарушениями сердечного ритма и нервной проводимости, в частности эпилепсии [41]. Для калиевых каналов $K_v7.2$ - $K_v7.3$ описано около 50 мутаций, вызывающих эпилепсию [42].

Тип Eag включает в себя три семейства: K_v10 (Ether-a-gogo, EAG: K_v10.1 и K_v10.2), K_v11 (Eag-связанный ген, ERG: K_v11.1-K_v11.3), K_v12 (Eag-подобный, ELK: K_v12.1-K_v12.3). Каналы типа Eag в большей степени расположены в нервной системе. Мутации канала Eag вызывают нарушение синаптической пластичности и памяти [43,44], развитию эпилепсии [45]. Присутствие каналов K_v11.1 в периферических симпатических нервах и сердце является более выраженным при патологических состояниях, таких как аномальная пролиферация клеток и злокачественная трансформация [8, 43, 44, 46–49]. Ингибирование канала K_v11.1 приводит к уменьшению пролиферации линий раковых клеток и активации апоптоза, проводящего к клеточной гибели [50, 51]. Так же эктопическая экспрессия канала K_v10.1, обычно расположенного в центральной нервной системе, ассоциирована с некоторыми патологическими процессами [36]. Хотя механизм, связывающий активность канала K_v10.1 с клеточной пролиферацией, остается неизвестным [52], очевидно, что канал K_v10.1 играет фундаментальную роль в развитии опухолей. Этот вывод основан на результатах исследований, демонстрирующих, что ингибирование этого канала уменьшает пролиферацию раковых клеток *in vitro* и *in vivo* [53–56], а гиперэкспрессия способна увеличить клеточную пролиферацию и перевести здоровые клетки в опухолевые [56].

Каналы K_v5, K_v6, K_v8 и K_v9 обладают схожей структурой, но не образуют функциональных ионпроводящих каналов за счет наличия «молчащей» K_vS субъединицы. Однако при гетеротетрамеризации с α -субъединицами K_v2 и K_v3 каналов они модулируют их активность и ингибируют экспрессию [28, 57–59].

1.1.2. Структура эукариотических потенциал-управляемых K⁺ каналов и гомологичных прокариотических каналов. Потенциал-управляемые K⁺ каналы образованы четырьмя α -субъединицами, формирующими пору канала, которые могут быть связаны со вспомогательными

цитоплазматическими β -субъединицами, модулирующими воротные свойства [60] (Рисунок 3). Каждая α -субъединица состоит из шести гидрофобных сегментов S1-S6, области, формирующей пору – H5 или P между S5 и S6, и положительно заряженного сегмента S4 – сенсора потенциала [61].

Ядро α -субъединицы канала состоит из 2 трансмембранных α -спиралей, обычно обозначаемых как TM1 и TM2, примыкающих к короткой поровой спирали (P) и последовательности K^+ селективного фильтра (СФ). Простейшая структура TM1-P-TM2 (2TM) – поровый домен – является минимально необходимой для функционирования канала [62].

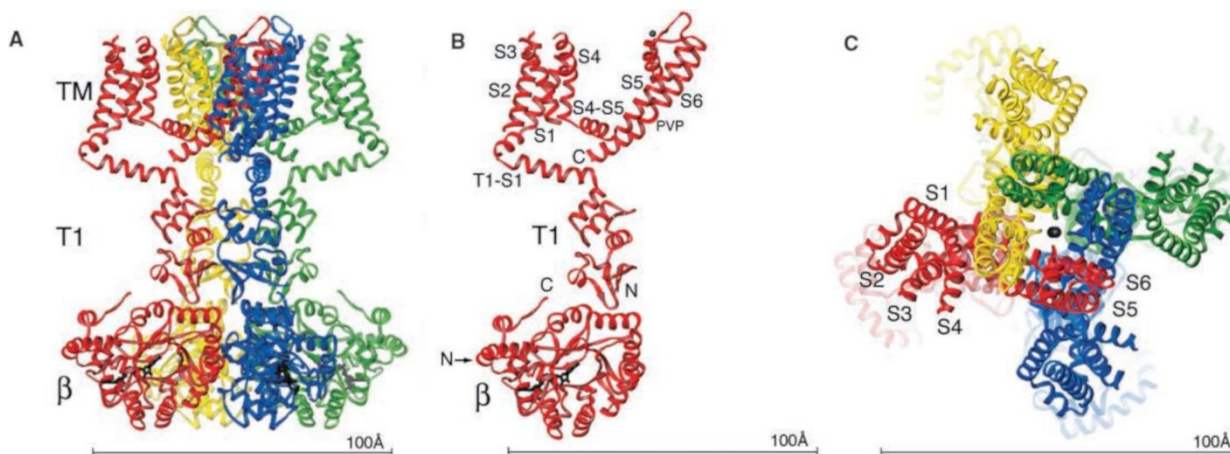


Рисунок 3. Структура комплекса $K_v1.2$ канала с β_2 субъединицей. (А) Внешний вид комплекса в ленточном изображении, внеклеточная сторона подразумевается выше канала, внутриклеточная – ниже. Четыре субъединицы канала (включая домен T1, сенсор напряжения и поры) окрашены одним цветом. Каждая субъединица тетрамера β -субъединицы окрашена в соответствии с цветом субъединицы канала, с которой она контактирует. Кофактор $NADP^+$, связанный с каждой β -субъединицей, изображен черным в стержневом представлении. TM обозначает интегральную мембранную составляющую комплекса. (В) Внешний вид одной субъединицы канала и β -субъединицы, вид сбоку. Отмечены трансмембранные спирали (S1-S6); последовательности P-V-P в S6 (PVP); и N- (N) и C- (C) концы $K_v1.2$ канала и β -субъединицы. Положение N-конца β -субъединицы, расположенного на стороне, наиболее удаленной от зрителя, обозначено стрелкой. (С) Внешний вид комплекса в ленточном представлении с внеклеточной стороны поры. Четыре субъединицы окрашены одинаково [63].

Первым калиевым каналом, структура которого была определена методом рентгеноструктурного анализа, был KcsA канал бактерии *Streptomyces lividans* (PDB-код 1BL8, [64], Рисунок 4). Несмотря на то, что канал KcsA не является потенциал-управляемым калиевым каналом, он демонстрирует высокое структурное сходство с поровым доменом эукариотических K_v каналов. Бактериальный канал KcsA так же является поровым белком, состоящим из 4 идентичных субъединиц, каждая из которых включает в себя 3 сегмента: две трансмембранные α -спирали M1 и M2 и поровую область P, которая, в свою очередь, содержит три фрагмента: P-петлю, P-спираль и СФ. В центре порового домена располагается селективный фильтр, 12 Å в длину и 2,8 Å в диаметре. Поверхность фильтра выстлана карбонильными группами шести аминокислотных остатков, TTVGYG, эта последовательность является высоко консервативной среди K^+ каналов. В селективном фильтре находится 5 сайтов связывания K^+ ионов, обозначаемых как S0-S4. В кристаллической структуре ионами калия заняты сайты S1, S3 и S4. Ниже селективного фильтра располагается заполненная водой полость, радиусом примерно 5 Å, ориентированная в сторону внутриклеточного пространства.

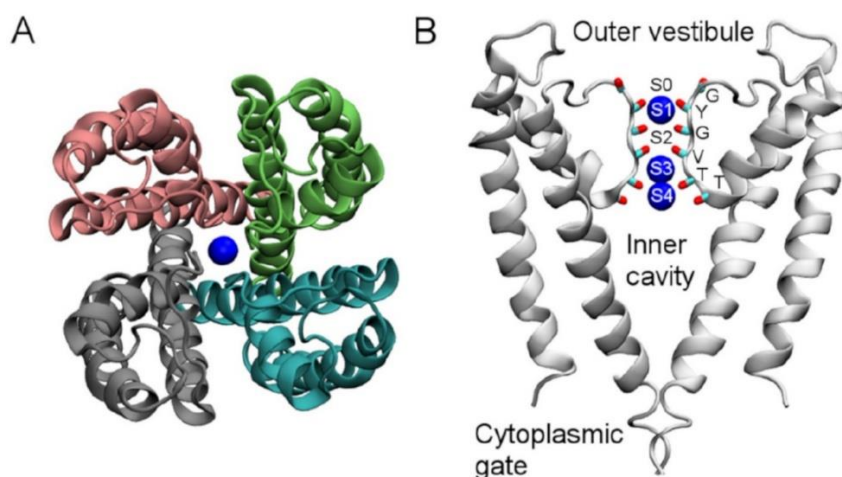


Рисунок 4. Структура бактериального канала KcsA (PDB-код 1BL8 [64]): вид сверху, параллельно оси канала с периплазматической стороны (A) и вид сбоку, перпендикулярно оси канала (B). Ионы калия представлены в виде голубых сфер. В (B) для ясности показаны только две субъединицы канала [60].

На данный момент известно около 70 различных структур канала KcsA, отличающихся друг от друга конформацией (открытая или закрытая), введенными мутациями и гибридными вставками, призванными имитировать поровые домены эукариотических калиевых каналов, а также в комплексе с низкомолекулярными лигандами, ионами в селективном фильтре (K^+ , Cs^+ , Rb^+ , Tl^+). Структура Р-петель и интерфейса потенциального взаимодействия с блокаторами поры являются стабильными.

Отличием другого прокариотического калиевого канала, для которого удалось получить кристаллографическую структуру – архейного потенциал-управляемого канала K_VAP (Таблица 1), – является более сложная структура α -субъединиц, которые имеют в своем составе 6 спиралей (S1-S6). Спирали S5 и S6 четырех субъединиц собраны в конусообразную структуру и образуют пору канала, а спирали S1-S4 формируют потенциал-чувствительный домен (ПЧД; voltage sensing domain).

Первой определенной структурой эукариотического калиевого канала является структура канала K_V1.2 [63, 65]. Как и в случае канала K_VAP, α -субъединицы K_V1.2 имеют в своем составе 6 спиралей (S1—S6), образующих пору канала (спирали S5—S6), и ПЧД (S1—S4). В более поздней структуре K_V1.2 канала [65] дополнительно различимы петли S1-S2, S2-S3 и S3-S4, соединяющие спирали ПЧД канала, а также боковые цепи ряда остатков спиралей S2, S4 и петли S5-P. Анализ структуры K_V1.2 выявил значительное сходство этого канала с прокариотическими каналами K_VAP и KcsA в строении порового домена. Особенно высоко консервативной является структура СФ и примыкающих к нему остатков (среднеквадратичное отклонение положения C α -атомов остатков 65-85 KcsA от положения соответствующих им остатков K_V1.2 составляет менее 0,8 Å) при сходстве последовательностей 65%. В то же время поровые домены K_V1.2 и KcsA немного отличаются по длине и конформации Р-петель (Рисунок 3, 4), а также

по конформации трансмембранных спиралей ближе к цитоплазматической стороне мембраны.

Таблица 1. Структуры потенциал-управляемых калиевых каналов и их комплексов с пептидом харибдотоксином, используемые для моделирования по гомологии

Описание	pdb-код (разрешение, Å) (ссылка)	Примеры использования
Канал KcsA	1BL8 (3,2 Å) [64]	[66]
Канал KvAP	1ORQ (3,2 Å) [67]	[68]
Канал Kv1.2	2A79 (2,9 Å) [63]	[69,70]
	3LUT (2,9 Å) [65]	[71–73]
Химерный канал Kv1.2-2.1	2R9R (2,4 Å) [74]	[75–80]
	6EBK (3,3 Å), 6EBL (3,0 Å) [81]	нет данных
Химерный канал Kv1.2-2.1 с мутацией F233W	3LNM (2,9 Å) [82]	нет данных
Химерный канал Kv1.2-2.1 с мутацией V406W в неактивированном состоянии	5WIE (3,3 Å) [83]	нет данных
Канал KcsA с мутациями в комплексе с ChTx	2A9H [#] [84]	[85,86]
Канал Kv1.2-2.1 в комплексе с ChTx	4JTA (2,5 Å) [87]	[88]
Канал Kv1.2-2.1 в комплексе с ChTx с мутацией K27M	4JTD (2,54 Å) [87]	нет данных

[#]структура получена методом ЯМР в отличие от остальных структур, установленных методом РСА.

Сравнительный анализ кристаллографических структур канала Kv1.2 показал, что конформация Р-петель достоверно неизвестна: наиболее часто реализуется конформация, характерная для структур с pdb-кодами 2A79 и 3LNM, а конформация, наблюдаемая в структуре с pdb-кодом 3LUT, - уникальна.

При высоком сходстве поровых доменов $K_v1.2$ и K_vAP структура их ПЧД отличается значительно. Предполагается, что причиной этих отличий является искажение структуры, возникшее при выделении и кристаллизации канала K_vAP [63].

Структуры других K_v1 -каналов пока не определены, но на основании высокой гомологии структура их поровых доменов предполагается сходной с каналом $K_v1.2$.

1.1.3. Механизм функционирования K_v каналов. В настоящее время принята и доказана концепция конформационных изменений потенциал-управляемых каналов, подразумевающая механизм открытия и закрытия каналов за счет перестройки их структуры в ответ на изменение мембранного потенциала [89]. При потенциале покоя каналы закрыты и не проводят ионов. Увеличение мембранного потенциала (деполяризация) влияет на заряженные аминокислотные остатки сенсора напряжения и может привести к открытию канала [91, 92]. Перенос ионов потенциал-управляемыми каналами включает как минимум 3 молекулярных процесса: детектирование изменений трансмембранного напряжения ПЧД и его последующая конформационная перестройка – активация ПЧД; распространение движений ПЧД в область порового домена, которое обеспечивает проникновение ионов – связь ПЧД-порового домена; открытие ворот порового домена, приводящее к открытию поры и ионной проводимости [92] (Рисунок 5).

Согласно механистической модели активации/деактивации K_v -каналов [93] в процессе гиперполяризации запускается внутреннее движение спирали S4 и ослабляется связь между ПЧД и доменами поры (Рисунок 5.1). В результате этого процесса происходит ослабление ионного транспорта в полости поры (Рисунок 5.2) и последующее закрытие поры под действием «гидрофобного коллапса» при выходе из поры растворителя и ионов K^+ . Закрытие верхних (I402 в $K_v1.2$) и нижних ворот [L331 (спираль S5) – P405 (спираль S6)] останавливает ионный ток (Рисунок 5.3). Спираль S4

продолжает двигаться внутрь; как только движение спирали S4 прекращается, линкер S4-S5 полностью опускается и ПЧД отходят из поры; канал переходит в закрытое состояние (Рисунок 5.4). При деполяризации происходит движение спирали S4 в наружном направлении. Нижние ворота дестабилизируются, когда все четыре сегмента линкера S4 и S4-S5 поднимаются (Рисунок 5.5), и все ПЧД снова приближаются к поре; переход 4-5 является лимитирующим шагом активации канала. Движение нижних ворот вызывает открытие поры и ее частичную регидратацию. Это позволяет ионам калия проникать в поры и запускать проводимость канала (Рисунок 5.6); переход 5-6 является независимым от потенциала. Затем происходит регидратация пор, что приводит к полному открытию верхних и нижних ворот и возвращению канала в открытое состояние (Рисунок 5.1).

Трансмембранный сегмент S4 реагирует на изменения мембранного потенциала, что приводит к конформационным изменениям в ПЧД, которые, в свою очередь, запускают изменения в поровом домене [94]. Благодаря чрезвычайно высокой чувствительности сенсора напряжения канал может реагировать даже на незначительные изменения мембранного потенциала [95]. Пора открывается только в том случае, когда активированы все четыре сенсора [96]. Открытый канал проводит ионы, пока не перейдет в инактивированное состояние. Более подробно механизмы активации K_v каналов рассмотрены в обзоре [24].

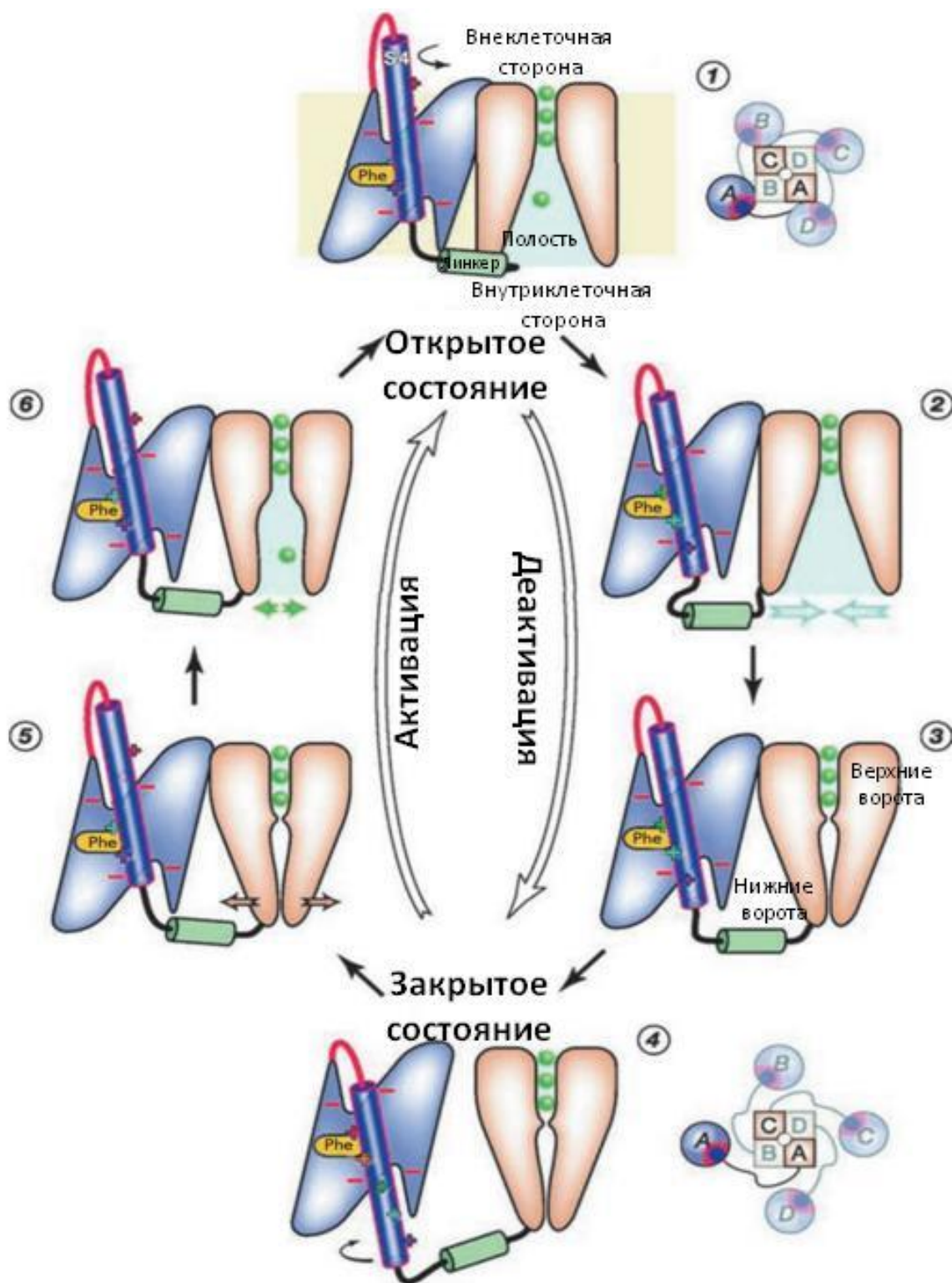


Рисунок 5. Механистическая модель функционирования потенциал-управляемых калиевых каналов K_v . Схематически показано расположение ПЧД (круги) относительно порового домена (квадратов) (вид с внеклеточной стороны) (модифицировано из [24, 93]).

Структурные исследования калиевых каналов выявили локализацию аминокислотных остатков, обеспечивающих эффективный и селективный транспорт ионов калия. Исследования, проведенные коллективом под руководством Р. Маккиннона, значительно углубили понимание деталей строения калиевых каналов [104].

Длина поры канала составляет 45 Å, диаметр поры варьируется в зависимости от функциональной нагрузки определенного участка поры. Пора канала начинается с внутриклеточной стороны широкой полостью (~ 10 Å в диаметре) и примерно с середины мембранного бислоя переходит в узкий тоннель длиной 18 Å. Ион K^+ (радиус 1,33 Å) может проходить сквозь внутреннюю пору в полость, оставаясь в большей степени гидратированным. В противоположность этому, селективный фильтр канала настолько узок, что для прохождения сквозь него иону приходится избавляться от гидратной «шубы». Другой особенностью селективного фильтра является преобладание полярных остатков, составляющих консервативную среди K_v каналов последовательность TVGYG, в то время как стенки внутренней поры и полости выстланы гидрофобными аминокислотными остатками, что сводит к минимуму взаимодействие ее стенок с гидратированными ионами [64].

Калиевые каналы демонстрируют следующую последовательность в селективности проводимости ионов: $K^+ \approx Rb^+ > Cs^+$, в то время как проницаемость для ионов с меньшим радиусом Na^+ и Li^+ мала. Ионы K^+ обладают примерно в 10 000 раз большей проницаемостью, чем ионы Na^+ ; эта особенность имеет важное значение для функционирования каналов [64] (Рисунок 7).

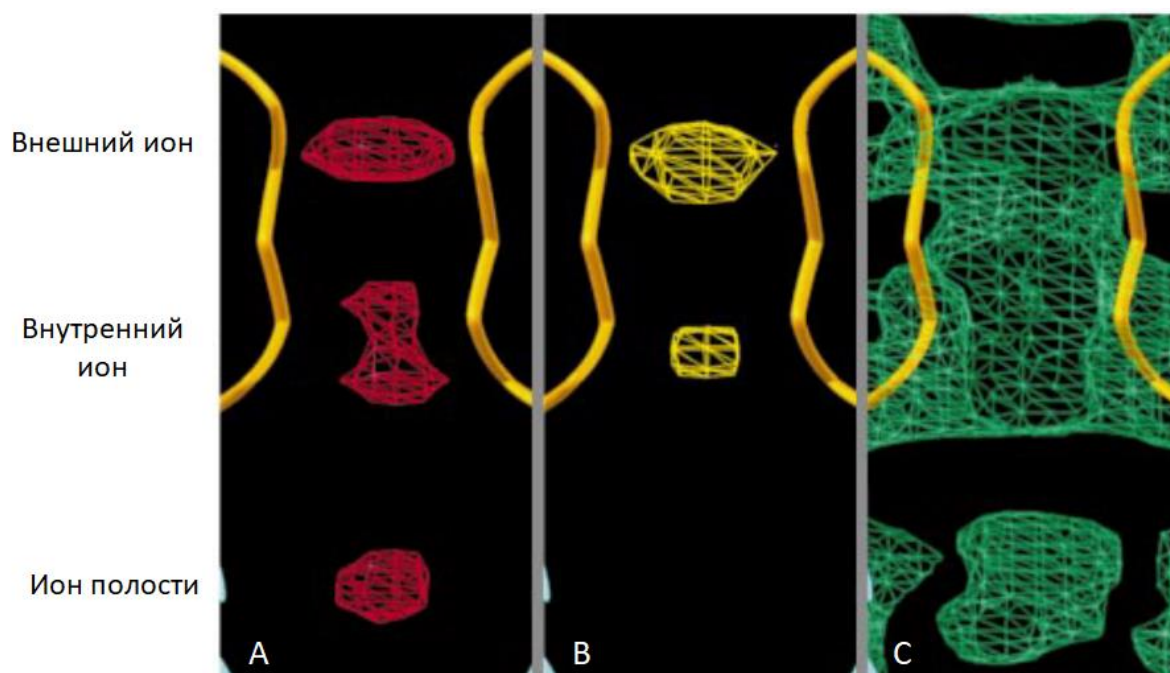


Рисунок 7. Определение положения проникающего иона в поре. А – разностная Фурье-карта Rb^+ идентифицирует два сильных пика, соответствующих ионам в СФ (внутренние и внешние ионы), и более слабый пик, соответствующий ионам в полости. Внутренняя плотность ионов имеет два близко расположенных пика. В – разностная Фурье-карта Cs^+ показывает внутренний и внешний пики ионов в СФ. С - карта электронной плотности, показывающая диффузную плотность в положении иона K^+ [64].

Механизм прохождения иона сквозь пору представляется многоступенчатым: поступление иона в канал, сопровождающееся замещением воды гидратной оболочки на полярные группы полости канала, перескок иона с положения, соответствующего одной потенциальной яме, в другое под действием тепловых флуктуаций, восстановление гидратной оболочки и выход из поры. Наиболее простым и достаточно общим случаем транспорта иона оказывается случай, когда в мембране присутствует три энергетических барьера. Боковые барьеры соответствуют входным участкам канала, в которых происходит дегидратация иона, центральный – селективному фильтру. Электростатические расчеты показали, что в процессе прохождения иона сквозь канал лимитирующим является центральный энергетический барьер, располагающийся на уровне примерно середины мембраны [105].

Абсолютные скорости прохождения ионов от 10^7 до 10^8 ионов в секунду являются действительно впечатляющими. Анализ кристаллографических структур позволяет предположить, что калиевые каналы высокой проводимости, такие как KcsA, могут работать со скоростью прохождения ионов, близкой к максимально возможной. Обнаружено, что селективный фильтр обычно содержит два иона калия, разделенных одной молекулой воды. Два иона движутся согласованным образом между двумя конфигурациями: K^+ -вода- K^+ -вода (конфигурация 1,3) и вода- K^+ -вода- K^+ (2,4), пока не вступит третий вытесняющий ион. Все четыре возможных положения иона калия в селективном фильтре имеют заселенность, близкую к 0,5, что означает равновероятность и энергетическую эквивалентность этих положений. Для выяснения причины такого состояния было проведено моделирование диффузии ионов, которое показало, что максимальный поток достигается, когда разность энергий между конфигурациями 1,3 и 2,4 близко к нулю [104]. Энергетический баланс между конфигурациями может отражать оптимизацию скорости проводимости путем естественного отбора [106].

1.2. Строение, классификация и функционирование блокаторов потенциал-управляемых калиевых каналов. Несмотря на то, что основная функция калиевых каналов заключается в проведении потоков ионов калия и соответствующем генерации и проведении ПД, на данный момент известны доказательства роли каналов в апоптозе нейронов. С другой стороны, отсутствие экспрессии или снижение активности некоторых K_v каналов приводят к нейрональному гипервозбуждению, что является причиной болезней нервной системы, таких как эпилепсия, мигрени, невропатические боли, поведенческие психозы (шизофрения) или инсульт; нарушениями сердечных ритмов, когнитивных функций [107–109] (Рисунок 8). В этом случае вещества, способные предотвратить гиперактивность каналов, являются нейропротекторами [110].

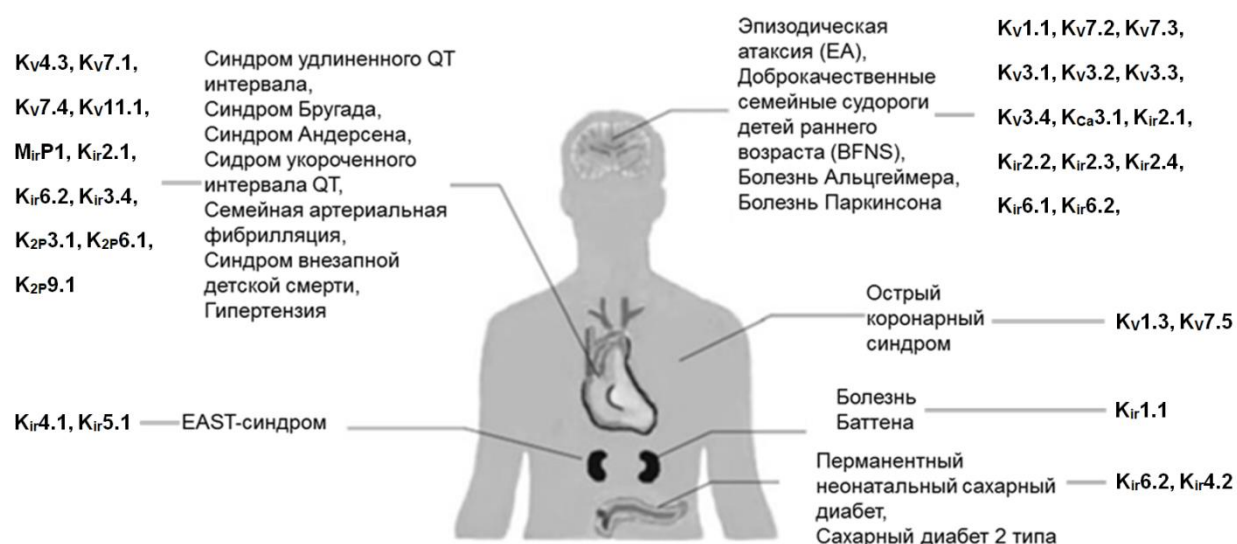


Рисунок 8. Болезни, связанные с нарушением функционирования калиевых каналов, изображенные на контуре человека (модифицировано из [26]).

Терапевтическим потенциалом обладают вещества, способные селективно связываться с различными типами каналов. Известно, что в проявление аутоиммунных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, рассеянный склероз, сахарный диабет 1 типа, вовлечена избыточная экспрессия каналов Kv1.3 [111–114]. Доказана роль в нейроиммунотомодуляции селективного блокатора Kv1.3 канала, токсина морского анемона ShK [115], для которого были проведены клинические исследования для лечения аутоиммунных заболеваний, таких как рассеянный склероз и ревматоидный артрит [116].

Лиганды, связывающиеся с K⁺ каналами, чаще всего делят на три группы: ионы металлов [117], низкомолекулярные органические молекулы [118] и полипептидные токсины [119], являющиеся объектом данного исследования. В дополнение к основным группам лигандов можно назвать специфичные антитела, блокирующие поток ионов через соответствующие каналы [120].

В зависимости от механизма функционирования все лиганды можно разделить на два типа: поровые блокаторы и модуляторы функционирования каналов. Блокаторы предотвращают поток ионов через канал за счет

связывания с поровой областью и замыкания ее [121], в то время как модуляторы влияют на свойства каналов, взаимодействия с другими областями (потенциал-чувствительными или вспомогательными доменами) [122, 123].

Пептидные блокаторы потенциал-управляемых калиевых каналов.

Группе поровых блокаторов принадлежит большая часть пептидных токсинов, выделенных из яда животных: змей, морских анемонов, скорпионов, пауков [124]. Пептидные блокаторы нашли широкое применение в фундаментальных исследованиях в качестве фармакологических проб для определения и характеристики структуры каналов, а также в прикладных разработках терапевтических агентов благодаря небольшому размеру, компактной структуре, высокой эффективности и селективности токсинов.

1.2.1.1. Структура пептидных блокаторов. Пептидные блокаторы содержат от 18 до 60 аминокислотных остатков, формирующих компактную глобулу белка, стабилизированную за счет образования от двух до четырех дисульфидных связей. Пептидные токсины могут иметь различные варианты укладки: α -спирали (токсины актиний), β -листы (токсины морских улиток-конусов) или их комбинацию (токсины змей и скорпионов). Для многих блокаторов известна их структура, полученная методом ЯМР или реже с помощью РСА (Таблица 2Error! Reference source not found.), что создает основу для моделирования их комплексов с калиевыми каналами.

Определение молекулярных детерминант токсинов, отвечающих за селективность связывания с различными типами ионных каналов (Na^+ , K^+ , Cl^- и Ca^{2+} каналами) и их подтипами (например, каналами K_v1), является сложной задачей. Так, токсины с почти идентичными пространственными структурами могут быть селективными к разным мишеням (например, мауротоксин и токсин HsTx1), тогда как, наоборот, токсины с негомологичными пространственными структурами могут связываться с одинаковыми каналами (например, токсины ShK и OSK1). Нет объективных фактов, доказывающих,

что тип укладки является определяющим критерием параметров связывания пептидных блокаторов. Структурное разнообразие токсинов, выделенных из яда животных, открывает путь к белковой инженерии, позволяющей разрабатывать потенциальные приложения и преимущества в области терапии болезней человека [36].

Спирали. Структуры небольшого числа токсинов, связывающиеся с K_v каналами, включают в себя только спирали. В настоящее время принято выделять три структурных мотива (Рисунок 9):

1. «Спиральная шпилька»: $\alpha\alpha$ мотив, в котором две α -спирали расположены антипараллельно, например, токсин скорпиона κ -хефутоксин 1,
2. «Спиральный крест»: $\alpha\alpha$ мотив, в котором две α -спирали расположены перпендикулярно друг другу, например, токсин морского анемона BgK,
3. «Спиральная головка»: $3_{10}\alpha\alpha$ мотив, в котором одна α -спираль охватывает две другие спиральные структуры, например, токсин морского анемона ShK.

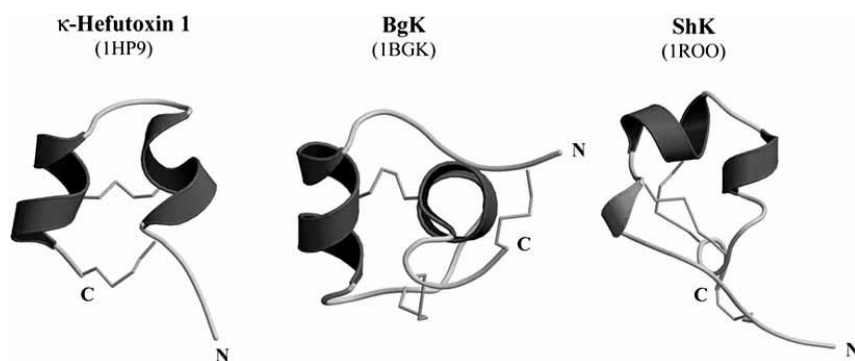


Рисунок 9. Трёхмерные структуры токсинов, связывающихся с каналами и имеющими в своей структуре спирали. Спирали, дисульфидные мостики и α скелет в ленточном представлении, тонких и толстых линиях соответственно. Отмечены N- и C-концы. Коды PDB указаны в скобках [124].

β -листы. Некоторые токсины животных, воздействующие на K_v каналы, включают только β -структуры. Мотив $\beta\beta\beta$ (трех-цепочечный антипараллельный β -лист) широко распространен среди токсинов животных,

найден в токсине морского конуса κ -PVIIA, морского анемона BDS-I и APETx1. Среди структур токсинов, основанных на β -листах, можно выделить несколько архитектурных мотивов:

1. «Цистиновый узел» (от англ. inhibitor Cystine knot, ICK), характеризующийся наличием узла, сформированного двумя цистеиновыми мостиками C1-C4 и C2-C5, которые пронизывает третий дисульфидный мостик C3-C6, например, у токсина κ -PVIIA. Гидрофобное ядро образует особенно компактную глобулярную структуру токсинов (Рисунок 10).
2. «Дисульфид-направленная β -шпилька» (от англ. disulfide directed β -hairpin, DDH) состоит из антипараллельного β -листа, который стабилизируется двумя дисульфидными мостиками, но не содержит цистинового узла, например, у κ -конотоксинов.
3. « β -дефензин подобный» архитектурный мотив состоит из сильно скрученного β -листа, в котором третий β -тяж соединен за счет дисульфидного мостика (например, у токсинов BDS-I и APETx1). Мотив стабилизирован тремя дисульфидными мостиками: C1-C5, C2-C4 и C3-C6.

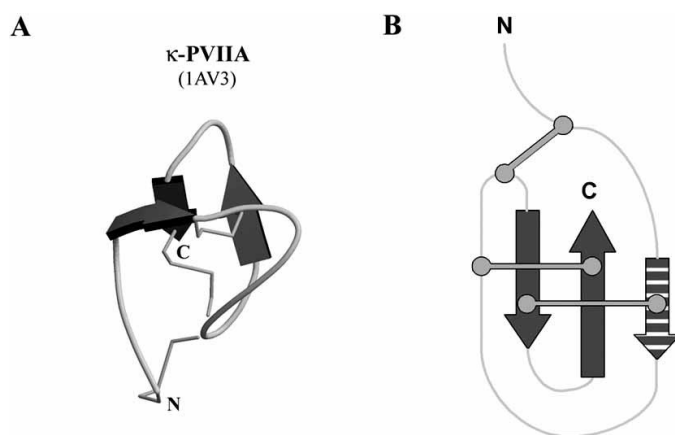


Рисунок 10. (A) 3D-структура блокатора K_v канала κ -PVIIA, сложенного тройным β -листом; (B) Схема мотива ингибиторного цистинового узла (ICK). Выделяют две или три нити β -листа (равные или простые/пунктирные серые стрелки соответственно), дисульфидные связи (тонкая линия) и пептидный Ca скелет (толстая линия). N- и C-концы отмечены. Код PDB указан в скобках [124].

Комбинированные вторичные структуры. Структуры токсинов животного происхождения могут включать в себя комбинацию спиралей и β -структур (Рисунок 11).

1. $3_{10}\beta\beta$ (3_{10} спираль и двухцепочечный антипараллельный β -лист), например, у токсина паука ханатоксина 1;
2. $3_{10}\beta\beta\alpha$ (3_{10} спираль, двухцепочечный антипараллельный β -лист и α -спираль), например, у токсина змеи дендротоксина 1,
3. $\alpha\beta\beta$ (α -спираль, соединенная с двухцепочечным антипараллельным β -листом), например, у токсина скорпиона мауротоксина,
4. $\beta\alpha\beta\beta$ (α -спираль и трехцепочечный β -лист), например, у токсина скорпиона харибдотоксина.

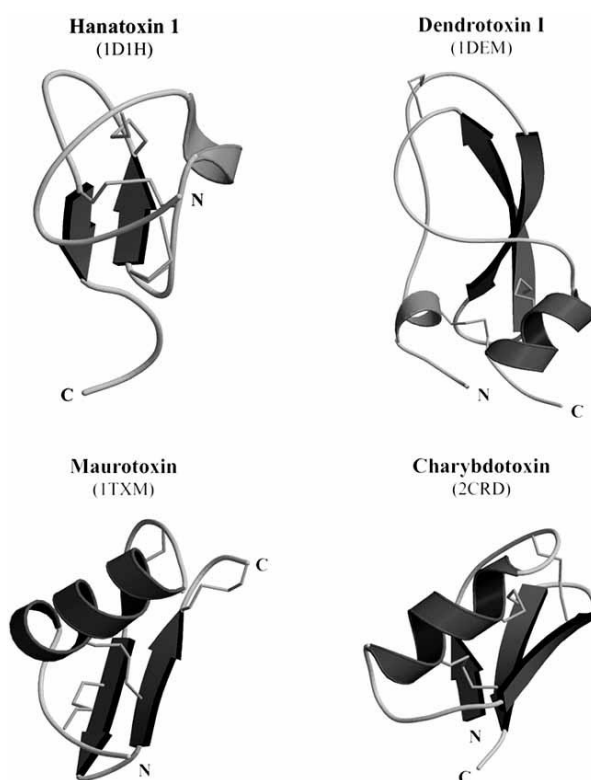


Рисунок 11. Трехмерные структуры токсинов, связывающихся с K_V каналами и имеющими в структуре комплекс спиралей и β -листов. Спирали, β -листы, дисульфидные мостики и Ca скелеты показаны в ленточном представлении, стрелками, тонкими и толстыми линиями соответственно. Обозначены N- и C-концы. Коды PDB указаны в круглых скобках [124].

Таблица 2. Активно исследуемые пептидные блокаторы K_v1 каналов, выделенные из яда скорпионов, с известной структурой

Название	Источник	Обозначение	Подсемейство	Последовательность	Код pdb (ссылка)	Блокируемые каналы
Харибдо-токсин	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	ChTx	α -KTx 1.1	-EFTNVSCCTTSKECWSVCQRLHN-TSRGKCMNKKCRC--	2CRD [125]	Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.6 KCa1.1, 3.1
	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	Lq2	α -KTx 1.2	-EFTQESCT--NQCSICKRLHN-TNRGKCMNKKCRC--	1LIR [126]	Kv, KCa, KIR
Ноксиу-токсин	<i>Centruroides noxius</i>	NTX	α -KTx 2.1	-TIINVKCTSPKQCSKPKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNNX	1SXM [127]	Kv1.2, 1.3
Маргатоксин	<i>Centruroides mRaritatus</i>	MgTx	α -KTx 2.2	-TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH-	1MTX [128]	Kv1.1, 1.2, 1.3
Хонготоксин	<i>Centruroides limbatus</i>	HgTx	α -KTx 2.5	-TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMNGKCKCYPH-	1HLY [129]	Kv1.2, 1.3
Калиотоксин	<i>Androctonus mauretanicus mauretanicus</i>	KTx	α -KTx 3.1	GVEINVKCSGSPQCLPKCKDAG--MRFGKCMNRKCHCTPK-	1XSW [130]	Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.6 KCa3.1
Аджитоксин	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	AgTx2	α -KTx 3.2	GVPINVSCGTSPQCIKPKCKDAG--MRFGKCMNRKCHCTPK-	1AGT [131]	Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.6
	<i>Mesobuthus martensii</i>	BmKTx	α -KTx 3.6	-VGINVKCKHSGQCLPKCKDAG--MRFGKCINGKCDCTPKX	1BKT [126]	Kv1.3
	<i>Orthochirus scrobiculosus</i>	OSK1	α -KTx 3.7	GVIINVKCKISRQCLEPCKKAG--MRFGKCMNGKCHCTPK-	1SCO [132]	Kv1.1, 1.2, 1.3, KCa3.1
	<i>Pandinus imperator</i>	Pi1	α -KTx 6.1	----LVKCRGTSDCGRPCQQQTG-APNSKINRMCKCYGA-	1WZ5 [133]	Kv1.2
Мауротоксин	<i>Scorpio maurus palmatus</i>	MTX	α -KTx 6.2	-----VSGTGSKDCYAPCRKQTG-CPNAKCINKSCKCYGCX	1TXM [134]	Kv1.1, 1.2, 1.3, KCa3.1
	<i>HeteroMrus spinifer</i>	HsTx1	α -KTx 6.3	-----ASCRTPKDCADPCRKETG-CPYGKCMNRKCKCNRCX	1QUZ [135]	Kv1.1, 1.3, KCa3.1
	<i>Pandinus imperator</i>	Pi4	α -KTx 6.4	--IEAIRC GGSRDCYRPCQKRTG-CPNAKCINKTCKCYGCS	1N8M [136]	Kv1.2
	<i>Mesobuthus martensii</i>	BmP01	α -KTx 7.2	-----ATCEDCPEHCATQN---ARAKCDNDKCVCEPK-	1WM7 [137]	Kv1.3
Кобатоксин	<i>Centruroides noxius</i>	CoTx1	α -KTx 10.1	-----AVCVYRTCDKDCRRG--YRSGKINNACKCYPY-	1PJV [138]	Kv1.2
	<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>	Vm24	α -KTx 23.1	--AAAI SCVGSPECPPKCRAQG--CKNGKCMNRKCKCYYC-	2K9O [139]	Kv1.3

1.2.1.2. Модели взаимодействий пептидных блокаторов с K_v каналами. В настоящее время описано несколько типов взаимодействий лигандов, связывающихся с калиевыми каналами.

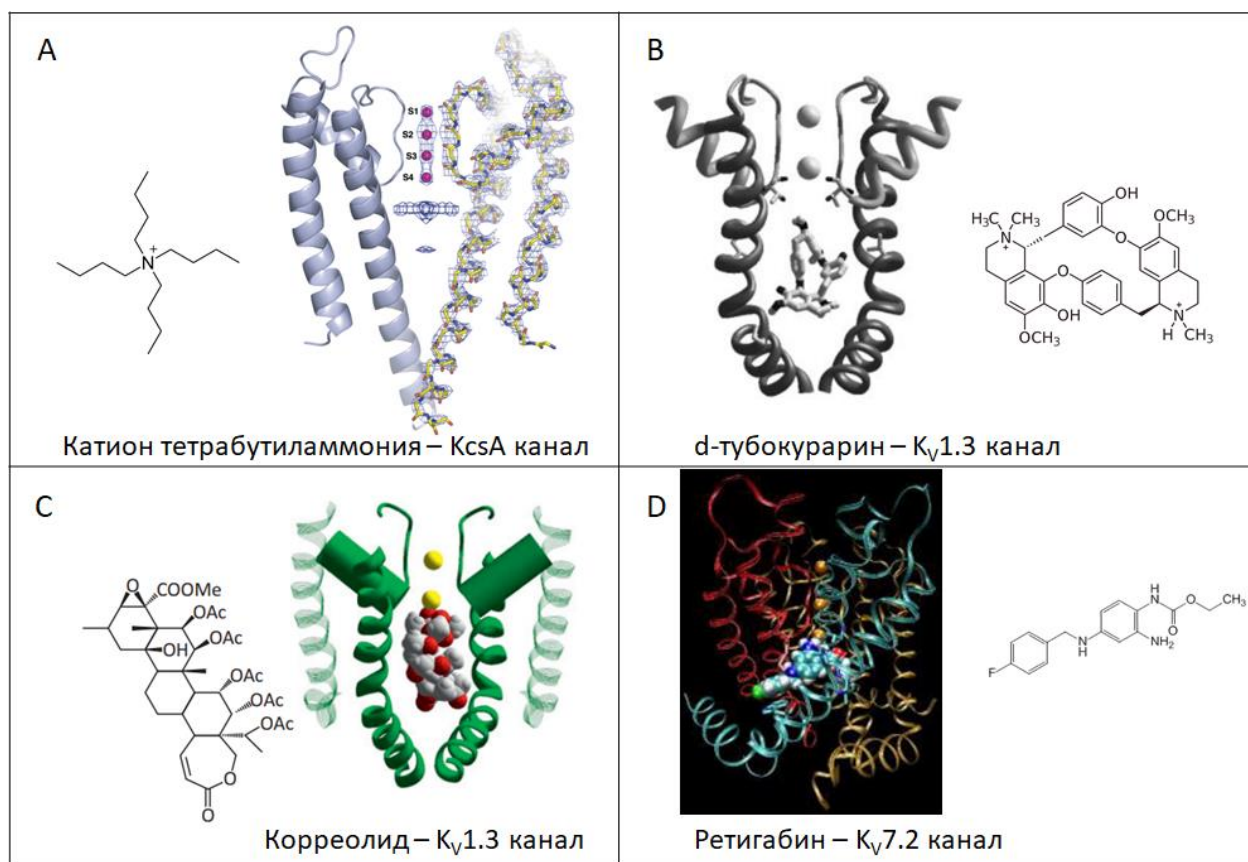


Рисунок 52. Структурные формулы и схемы связывания малых непептидных молекул с калиевыми каналами (вид сбоку). А – структурная модель комплекса прокариотического калиевого канала KcsA с ионами калия и катионом тетрабутиламмония с отображенными электронными плотностями [140]. В – комплекс d-тубокурарина с потенциал-управляемым каналом $K_v1.3$, ионы калия показаны как сферы в положениях S1, S3. Аминокислотные остатки канала, обеспечивающие сильный вклад во взаимодействие с d-тубокурарином, показаны в стержневом представлении: W49, P23 и V15 [141]. С – модель потенциал-управляемого канала $K_v1.3$ в комплексе с корреолидом. Катионофильный лиганд связывает ион калия (желтые сферы) на цитоплазматическом конце СФ [142]. D – пространственная модель связывания ретигабина с каналом $K_v7.2$, отображены ключевые взаимодействующие аминокислотные остатки канала: W265, L314, L338 [143].

Малые непептидные молекулы (например, гидрофобные катионы тетрабутиламмония [140], d-тубокурарин [141], верапамил [144]) связываются с воротами канала со стороны цитоплазмы после проникновения сквозь

клеточную мембрану (Рисунок 12). С внутриклеточной стороны связываются нуклеофильные молекулы, например, корреолид, стыкующийся с гидрофобной поверхностью спирали S6 своей липофильной частью и хелатирующий ион калия полярными ацетильными группами [145]. Лекарственные молекулы, например, хлорохин, могут располагаться во внутренней полости канала, взаимодействуя с двумя ароматическими аминокислотными остатками [146]. Помимо внутренней поры, небольшие молекулы (например, ретигабин) могут дополнительно связываться с гидрофобным карманом, образованным при открытии канала между цитоплазматической частью спиралей S5 и S6 [147].

С другой стороны, типичные сайты связывания пептидных лигандов расположены с внеклеточной стороны каналов – потенциал-чувствительный домен или внешний вестибюль каналов. Так, токсины животного происхождения могут связываться с ионными каналами в области петли между S3 и S4 спиралями потенциал-чувствительного домена (Рисунок 13). Эти токсины предотвращают конформационные изменения, необходимые для открытия каналов. Такие «модулирующие пропускание» токсины обнаружены в яде пауков, действие которых направлено на K_v2 и K_v4 каналы. Они могут частично проникать сквозь мембранный липидный бислой для стабилизации состояния сенсора потенциала за счет наличия неполярного интерфейса вокруг полярного ядра. Так, например, взаимодействуют ханатоксин 1 (HaTx) и токсин SGTx1 с каналами $K_v2.1$ [148]. К этой же группе относятся токсины, связывающиеся с различными мишенями: протоксин 1, аффинный к $K_v2.1$, $Na_v1.5$, $Ca_v3.1$ [149]; GrTx-SIA – $K_v1.2$, $Ca_v2.1$ [150]; токсины морского анемона BDS-I, APETx1.

Токсины могут взаимодействовать за счет своих спиралей с областью «башенок» (turret) калиевых каналов, которые располагаются на уровне внеклеточных петель между сегментом S5 и селективным фильтром (Рисунок 13). Такой тип взаимодействий с калиевыми каналами наблюдается

в группах токсинов скорпионов и морских анемонов [151]. Токсины, связывающиеся с каналом $K_V11.1$ [152], обладают двумя доменами связывания: гидрофобный взаимодействует с областью башенки, образованной амфифильной спиралью, в то время как гидрофильный домен образует контакты с нижней частью наружного вестибюля канала. Токсины, принадлежащие к этой категории, например, BeKm-1, CnERG1, hBD2, называют блокаторами башенки.

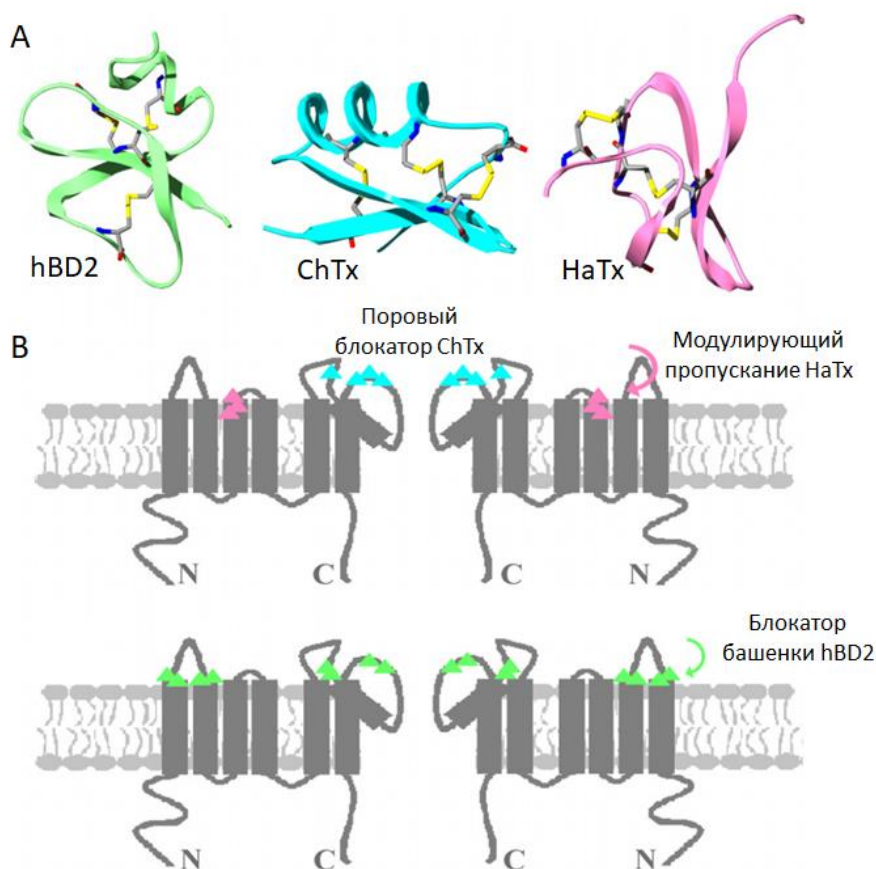


Рисунок 63. Взаимодействия пептидных блокаторов с потенциал-управляемым каналом $K_V1.3$. А – типичные структуры модуляторов K_V -каналов: hBD2 (β -дефензин 2 из эндогенной ткани человека, код PDB 1FD4, ярко-зеленый), ChTX (харибдотоксин из яда скорпиона, код PDB 2CRD, голубой), NaTX (ханатоксин из яда паука, код PDB 1D1H, розовый). В – модель трансмембранной топологии K_V -канала, выделены остатки, критические для связывания модуляторов. Блокатор поры ChTX, взаимодействующий с областью поры канала; модулирующий пропускание токсин NaTX, связывающийся с линкером S3-S4 спиралей; токсин hBD2 связывается с областью поры канала, а также с линкером S1-S2 спиралей для влияния на активацию канала и подавление токов канала [153].

Третьим, самым распространенным среди лигандов калиевых каналов, типом взаимодействий является блокада поры канала токсином за счет взаимодействия β -листа (в случае токсинов скорпиона, например, AgTx2, ChTx, KTx) с порой канала [153] (Рисунок 13). Токсины этой категории, такие как токсины скорпионов, взаимодействующие с $K_v1.X$ каналами, называют поровыми блокаторами.

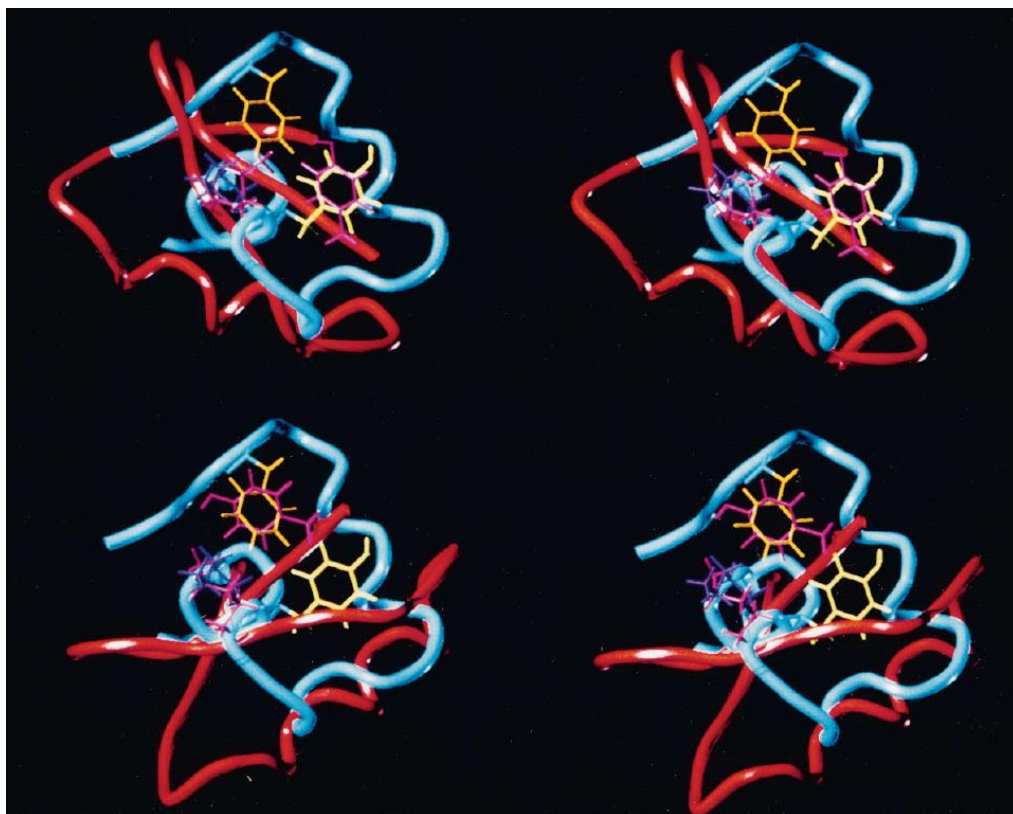


Рисунок 74. Наложение «функциональных диад» K27/Y36 (выделены розовым) токсина скорпиона ChTx, цепь которого изображена красным, с K25 (фиолетовый)/Y26 (желтый) (верхний ряд) или с K25 (фиолетовый)/F6 (оранжевый) (нижний ряд) токсина BgK, цепь отображена голубым [154]. Гипотеза исследователей состоит в том, что Y36 и F25 занимают один и тот же сайт связывания в канале, но в разных мономерах. Таким образом, общая способность токсинов морских анемонов и скорпионов распознавать K_v1 -каналы связана с сохранением «функциональной диады», состоящей из остатка К и ароматических остатков, чья точная природа (Y или F) и местоположение может отличаться от одного токсина к другому.

Гипотеза о существовании «функциональных диад» (пар аминокислотных остатков блокатора, которые предположительно обуславливают его селективность), являлась наиболее распространенной

теорией, описывающей связывание пептидных блокаторов с потенциал-управляемыми калиевыми каналами [154] (Рисунок 14). Согласно этой гипотезе при связывании блокатора его положительно заряженный аминокислотный остаток, как правило, лизин, связывается с карбоксильными группами остатков канала, выстилающих пору, тем самым замыкая ее, а гидрофобный остаток (ароматический или алифатический) взаимодействует с окружающим пору кластером ароматических аминокислот.

Результаты последних исследований, проводимых в области анализа связывания пептидных блокаторов с калиевыми каналами, показали, что в связывании блокаторов с каналами и создании высокоаффинного контакта задействовано более двух взаимодействий [124]. Так, токсины распознают подтипы каналов $K_v1.X$ за счет различных наборов остатков (например, кольца основных остатков в случае токсина скорпиона $Pi1$ (Рисунок 15)), отличающихся от «функциональной диады». Считается, что эти взаимодействия происходят со специфическими остатками башенки ионного канала. Набор таких молекулярных контактов определяет селективность токсина по отношению к подтипам каналов $K_v1.X$, и, по-видимому, является достаточным для эффективного блокирования потоков калия, хотя и с пониженным сродством пептидов. «Функциональная диада» токсинов, хотя и не является обязательной детерминантой связывания, способствует увеличению сродства токсинов к каналам без изменения профилей селективности. Кроме того, расположение остатков диады (боковая цепь K) представляет собой физический барьер для проникновения ионов калия сквозь пору канала.

В свою очередь, в данной работе обосновывается утверждение о многоточечном характере взаимодействий между калиевыми каналами и пептидными блокаторами, подразумевающее, что за различия в аффинности и селективности связывания отвечает весь пул образуемых контактов.

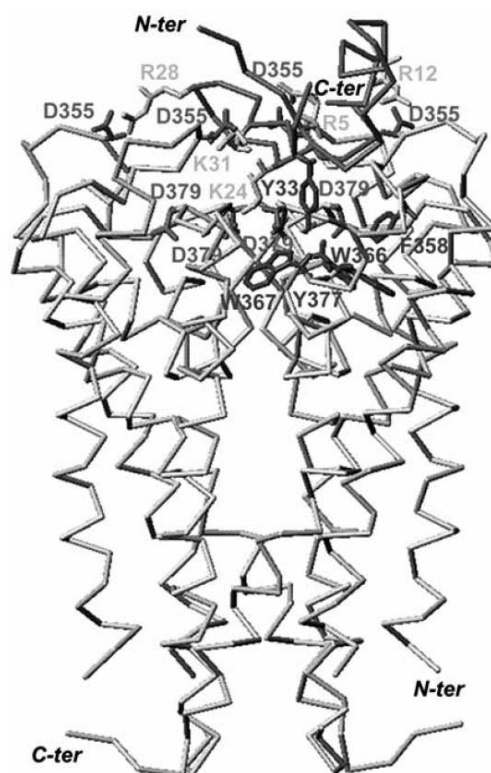


Рисунок 85. Связывание порового блокатора – токсина скорпиона Pi1 – с каналом $K_v1.2$. Показаны α -цепи только 2 из 4 субъединиц канала (светло-серый) и α -цепь токсина Pi1 (темно-серый), а также аминокислотные остатки, участвующие во взаимодействии [124].

1.2.1.3. Медицинское применение пептидных блокаторов калиевых каналов.

Блокаторы K_v каналов и онкологические заболевания. Проведенные ранее исследования демонстрируют физиологическую роль потоков ионов K^+ в пролиферации клеток, увеличении внеклеточной концентрации ионов Ca^{2+} , регуляции клеточного объема, модификации содержания электролитов во внутри- и внеклеточной среде. Этим фактом объясняется, почему потенциал-управляемые и Ca^{2+} -активируемые калиевые каналы задействованы при различных онкологических заболеваниях. Так, гиперэкспрессия K_v каналов сопутствует развитию онкозаболеваний: гепатокарциномы [155], груди ($K_v1.1$ [156], $K_v1.3$ [157] и EAG [9]), простаты ($K_v1.3$ [158]), меланомы ($K_v1.3$ [159], EAG [9]), рака матки (K_v2 [160], ERG[10], EAG [9]), эпидермальной карциномы рта ($K_v3.4$ [161]), нейробластомы (EAG [9,162]), аденокарциномы (EAG [9]), рака легких (EAG [9]), рака поджелудочной

железы (β клеток) (EAG [9]), моноцитарной лейкемии (EAG [163]); рака эндометрия (ERG [164]), гемопоэтического (ERG [165]) и колоректального рака (ERG [11, 156]), острого миелоидного лейкоза (ERG [166]) и глиомы ($K_v1.3$, $K_v1.5$ [167], ERG [44]).

Исследования ингибирования пролиферации клеток за счет воздействия на калиевые каналы типа EAG или ERG [8,9] показали, что эти ионные каналы экспрессируются на поверхности опухолевых клеток и отсутствуют или не детектируются на мембранах здоровых клеток. По этой причине экспрессия калиевых каналов может служить ранним маркером опухолей [10, 11], а блокирование потоков ионов калия может иметь потенциальную терапевтическую ценность [12].

Блокаторы K_v каналов и иммуномодуляция.

В последние годы несколько исследовательских групп [168–172] сфокусированы на изучении терапевтического потенциала токсинов животных, селективных к $K_v1.3$ каналам. Важным направлением исследований является разработка лекарственных средств против аутоиммунных заболеваний. Т-клеточные лимфоциты обладают на своей поверхности $K_v1.3$ каналами (и Ca^{2+} -активируемыми K^+ каналами промежуточной проводимости: $K_{Ca3.1}$ или IK_{Ca1}), необходимыми для активации, индуцированной антигеном [5, 6]. Также сообщалось об аналогичной ключевой роли калиевых каналов для активации В-клеточных лимфоцитов [7], которые продуцируют аутореактивные антитела. Следовательно, блокаторы $K_v1.3$ каналов могут обладать терапевтическим потенциалом при лечении таких заболеваний человека, как рассеянный склероз, диабет 1-го типа, ревматоидный полиартрит, эритематозная волчанка, псориаз, витилиго, склеродермия, пемфигус, увеит, воспалительная миопатия, болезнь Крона и Хашимото и хроническое отторжение трансплантата. Стоит отметить, что некоторые токсины животных, действующие как мощные блокаторы каналов $K_v1.3$ (например, токсины скорпионов OSK1,

харибдотоксин, маргатоксин и калиотоксин; морских анемонов ShK) продемонстрировали свою эффективность на моделях *in vitro* и/или *in vivo* [71, 168, 173–178].

Блокаторы K_v каналов и нейропатии.

Распространение нервного импульса обеспечивает непрерывную передачу сигналов. В ряде нейропатий (например, синдром Гийена-Барре, рассеянный склероз и т.д.) изменяется нервная проводимость (замедление или неспособность к распространению), вызванная локальной демиелинизацией или изменением мембранных свойств на уровне перехватов Ранвье [179]. Изменения функций аксонов могут быть связаны с гиперэкспрессией некоторых типов K_v каналов в воспалительных или демиелинизированных поражениях. Предполагается, что $K_v1.1$ и $K_v1.2$ каналы выступают ключевыми мишенями для симптоматического лечения таких невропатий [3, 4], что, в свою очередь, обуславливает терапевтический потенциал связывающихся с ними пептидных токсинов.

Блокаторы K_v каналов и ожирение.

Ожирение – эпидемия XXI века, требующая инновационных и надежных фармакологических стратегий. Перспективным направлением терапии является блокирование калиевых $K_v1.3$ каналов пептидными блокаторами [180].

Высокоаффинный селективный блокатор Vm24, выделенный из яда скорпиона *Vaejovis mexicanus smithi* [181], показал эффективность в снижении инсулина в сыворотке крови и мобилизации глюкозных транспортеров ET4 в скелетных мышцах у крыс, страдающих ожирением, однако не привел к снижению прироста массы тела и висцерального ожирения [182].

Результаты исследования [183] демонстрируют, что токсин ShK-186, селективный и аффинный блокатор $K_v1.3$ канала, снижает скорость развития ожирения печени; снижает уровень холестерина в крови, сахара, HbA1c, инсулина и лептина, а также повышенную чувствительность к

периферическому инсулину. Токсин ShK-186 активирует бурую жировую ткань, о чем свидетельствует удвоение поглощения глюкозы и повышенное β -окисление жирных кислот, гликолиз и синтез жирных кислот. Активация бурой жировой ткани проявляется в увеличении потребления кислорода и энергии организмом без изменения калорийности потребляемой пищи, двигательной активности или уровня гормонов щитовидной железы. Согласно результатам исследования, блокаторы $K_v1.3$ могут применяться для лечения ожирения и инсулинорезистентности.

1.2.1.4. Токсины скорпионов. Яд скорпионов имеет сложный многокомпонентный состав, включающий неорганические соли, свободные аминокислоты, гетероциклические компоненты, пептиды и белки, в основном ферменты (фосфолипаза A2, кислая фосфатаза, рибонуклеаза и др.), которые используются скорпионами для защиты и захвата жертв [184]. Яд скорпионов является богатым источником токсинов, связывающимися с калиевыми каналами (Таблица 2) [185].

Селективные к калиевым каналам токсины скорпионов являются структурно консервативными короткоцепочечными (23-43 аминокислотных остатка) пептидами, соединенными 3-4 дисульфидными мостиками и устойчивыми к действию протеаз. Среди всего разнообразия способов укладки полипептидной цепи, перечисленных выше, в поровых блокаторах калиевых каналов, выделенных из яда скорпионов, можно выделить пять групп: цистеин-стабилизированный α/β мотив ($CS\alpha/\beta$) [186], ингибиторный цистиновый узел (ICK) [187], укладка бычьего панкреатического ингибитора трипсина Кунитца [188], α -шпилька с двумя дисульфидными мостиками ($CS\alpha/\alpha$ 2(S-S)) [189], α -шпилька с тремя дисульфидными мостиками ($CS\alpha/\alpha$ 3(S-S)) [190].

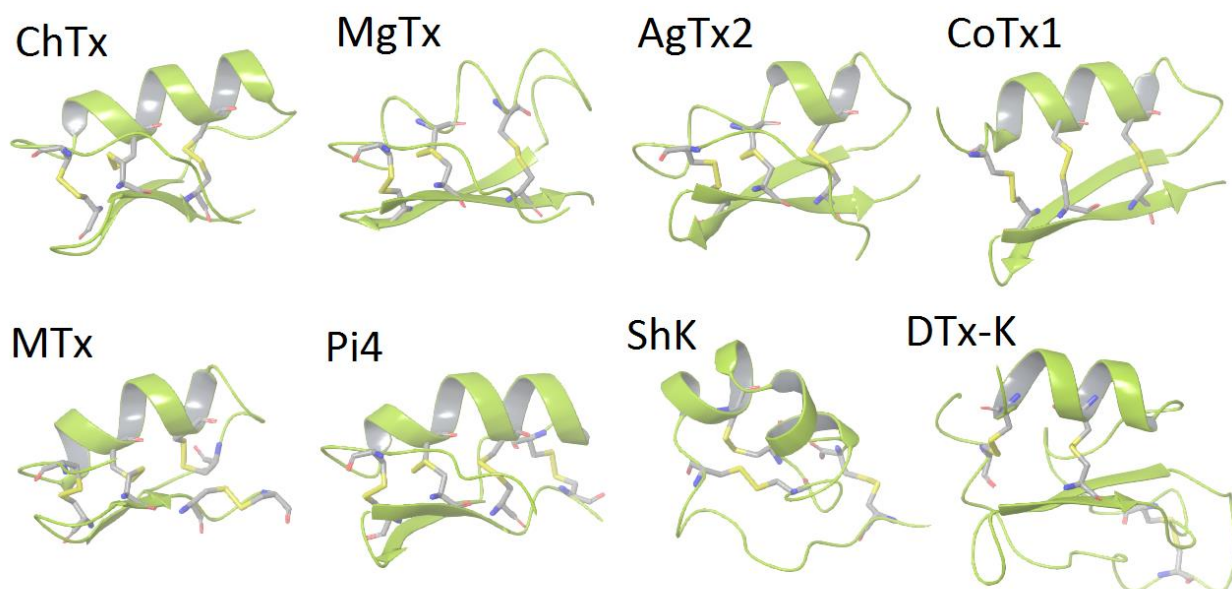


Рисунок 96. Структуры харибдотоксина (ChTx), маргатоксина (MgTx), аджитоксина-2 (AgTx2), кобатокина-1 (CoTx1), мауротоксина (MTx), токсина Pi4, токсина ShK и дендротоксина DTx-K в ленточном представлении. В стержневом представлении показаны остатки цистеина, образующие дисульфидные мостики [191].

Наиболее распространенным является класс CS α / β , представителей которых можно классифицировать на α -, β - и γ -токсины [192,193], среди которых наиболее изученными и широко распространенными являются представители семейства α -КТх. В зависимости от длины аминокислотной последовательности и количества остатков цистеина, эти токсины могут быть разделены на 12 типов, среди которых короткоцепочечные пептидные токсины длиной 29-39 остатков с тремя дисульфидными мостиками (α -КТх1, α -КТх3, α -КТх16, α -КТх19), короткоцепочечные пептиды с четырьмя дисульфидными мостиками (α -КТх12), длинноцепочечные пептиды, содержащие 60-70 остатков с четырьмя дисульфидными мостиками [194].

Структура α -КТх токсинов включает в себя консервативный «цистеин-стабилизированный α / β мотив» (CS α / β , α -спираль соединена дисульфидными мостиками с антипараллельным β -листом, что делает структуру пептида конформационно стабильной) [195, 196]. Система дисульфидных связей постоянна внутри каждого подсемейства за исключением подсемейства α -

КТх6. Для пептидов α -КТх6 предпочтительным является образование дисульфидных связей между 1 и 5, 2 и 6, 3 и 7, 4 и 8 остатками цистеина как, например, в токсине Рi4 (Рисунок 16, 17). Однако в мауротоксине и спинотоксине (α -КТх6.13) связи образуются между 1 и 5, 2 и 6, 3 и 4, 7 и 8 остатками цистеина. Предполагается, что в этих пептидах возможно переключение дисульфидных связей без заметного изменения структуры, так как атомы серы остатков 3, 4, 7 и 8 находятся близко друг к другу [41].

При $pH=7$ теоретический суммарный заряд токсинов α -КТх — положительный и варьирует от +2 до +8, а отрицательно заряженные остатки встречаются преимущественно на N-конце (Рисунок 17). Исключение — токсины подсемейства α -КТх8, в частности, токсин VmP01 [197] с суммарным зарядом -2 (Таблица 2), который активен в отношении канала $K_V1.3$ [198]. Считается, что более высокий положительный заряд C-концевой части токсина коррелирует с высокой селективностью по отношению к каналу $K_V1.3$ в сравнении с каналом $K_V1.2$ [69].

Большая часть токсинов взаимодействует с каналами типа Shaker, причем наибольшее разнообразие отмечено среди лигандов каналов $K_V1.1$ и $K_V1.3$ [36]. Токсины, выделенные из ядов скорпионов, проявляют высокую активность при связывании с каналом $K_V1.3$ и с разной эффективностью взаимодействуют с другими каналами семейства K_V1 . К примеру, AgTx2, OSK1, NTX и KTX связываются с $K_V1.3$ с пикомолярной аффинностью, а их аффинность к каналу $K_V1.1$ в 2,6-110 раз меньше [198]. Другие пептиды, такие как мокатоксин-1, HsTx1, ChTx, обладают более высокой селективностью в отношении канала $K_V1.3$ по сравнению с $K_V1.1$ каналом, но активны на других близкородственных каналах, в том числе $K_V1.2$ [124].

Токсин	Под- семейство	PDB код	Последовательность	Длина	Заряд
ChTx	1.1	2CRD	-EFTNVSCCTTSKECWVQCQLHN-TSRGKCMNKKCRCCYS--	37	+5
Lq2	1.2	1LIR	-EFTQESCTASNQCWSICKRLHN-TNRGKCMNKKCRCCYS--	37	+5
ChTx					
NTx	2.1	1SXM	-TIINVKCTSPKQCSKPCKELYGSSAGAKCMNGKCKCYNN-	40	+6
MgTx	2.2	1MTX	-TIINVKCTSPKQCLPPCKAQFGQSAGAKCMNGKCKCYPH-	39	+6
HgTx	2.5	1HLY	-TVIDVKCTSPKQCLPPCKAQFGIRAGAKCMNGKCKCYPH-	39	+6
Css20	2.13	-	-IFINVKCSPPQQLKPCKAAGFISAGGKCIINGKCKCYP-	38	+6
MgTx					
KTx	3.1	1KTX	GVINVKCSGSPQCLKPCKDAG--MRFGKCMNRKCHCTPK-	38	+6
AgTx2	3.2	1AGT	GVPINVSCGTGSPQCIKPCKDAG--MRFGKCMNRKCHCTPK-	38	+6
BmKTx	3.6	1BKT	-VGINVCKHSGQCLKPCKDAG--MRFGKCIINGKCKDCTPK-	37	+6
OSK1	3.7	1SCO	GVIINVCKISRQCLKPCKKAG--MRFGKCMNGKCHCTPK-	38	+8
OSK1					
Pi1	6.1	1WZ5	----LVKCRGTSDCGRPCQQQTG--CPNSKCIINRMCKCYGC-	35	+5
MTx	6.2	1TXM	----VSCGTGSKDCYAPCKRQTG--CPNAKCIINRCKCYGC-	35	+5
HsTx1	6.3	1QUZ	----ASCRTPKDCADPCRKETG--CPYGKCMNRKCKCNRK-	35	+6
Pi4	6.4	1N8M	--IAIRCGGSRDYRCPQKRTG--CPNAKCIINKTCKCYGCS	38	+6
Pi4					
Pi2	7.1	2PTA	----TISCNTNPKQCYPHCKKETG--YPNAKCMNRKCKCFGR-	35	+7
BmP01	8.2	1WM7	----ATC---EDCPHCATQ---NARAKCNDKCVCEPK-	29	-2
CoTx1	10.1	1PJV	----AVCV-YRTCKDKRRG--YRSGKCIINNAKCKCYPY-	32	+6
Vm24	23.1	2K90	--AAAIKCVGSPKCPPKCKRA-QG--CKNGKCMNRKCKCYCY-	36	+6
Vm24					
ShK		1ROO	--RSCIDTIPKSRCTAFQCKHSMKYRLSFCRKTCGTCC	35	+7
ShK					

Рисунок 107. Выравнивание ряда токсинов, взаимодействующих с K_v -каналами. Зелеными рамками отмечены а.о., которые по данным молекулярного моделирования образуют контакты с различными каналами (отмечены все контактирующие остатки, упоминаемые в различных работах). Желтым выделены остатки цистеина, синим - положительно заряженные остатки, красным - отрицательно. Показана вторичная структура некоторых токсинов. Желтые стрелки - β -тяжи, красные волнистые линии - α -спирали, розовые волнистые линии - 3/10-спирали, фиолетовые дуги - повороты, синие линии - изгибы, черные линии - неструктурированные участки [191].

Скорпион *Leiurus quinquestriatus hebraeus* принадлежит семейству *Buthidae* и является одним из самых опасных видов скорпионов (Рисунок 18). Его яд представляет собой смесь нейротоксинов с низкой летальной дозой [199]. Его укус является очень болезненным, однако для взрослых не является смертельно опасным. Риск подвержены маленькие дети, престарелые, аллергики и больные сердечно-сосудистыми заболеваниями; смерть от укуса обычно наступает в результате отека легких. Отдельные компоненты яда этого скорпиона обладают терапевтическим потенциалом в отношении онкозаболеваний [200], диабета [201].



Рисунок 118. Внешний вид скорпионов, яд которых содержит наиболее изученные токсины-блокаторы потенциал-управляемых калиевых каналов.

Наиболее изученными блокаторами K_v1 каналов являются выделенные из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus* аджитоксин и харибдотоксин. Структуры этих блокаторов были определены с помощью метода спектроскопии ЯМР и включают в себя три скрученных антипараллельных β -тяжа, образующих β -лист, и одну α -спираль [127,131]. Дисульфидные мостики соединяют боковые цепи β -листа и α -спирали, образуя стабильное ядро молекулы. Поверхность второго β -листа и α -спирали формируют интерфейс связывания с K_v каналами. Аджитоксин-2 демонстрирует высокую аффинность к $K_v1.1$, $K_v1.2$ и $K_v1.6$ каналам и

связывается с ними в пикомолярном диапазоне [202], в то время как харибдотоксин наиболее аффинно связывается с каналом $K_v1.3$ [203].

Другим смертельно ядовитым родом скорпионов, принадлежащих к семейству *Buthidae*, является *Centruroides* (Рисунок 18). К токсинам, выделенным из яда скорпионов этого рода и связывающимся с K_v1 каналами, относятся ноксиустоксин (*C. noxius*) [200, 202, 203], маргатоксин (*C. margaritatus*) [176], хонготоксин (*C. limbatus*) [206], кобатоксин (*C. noxius*) [206, 207].

Наиболее опасным родом скорпионов является *Androctonus* [209]. Выделенный из яда *Androctonus mauretanicus mauretanicus* калиотоксин является высокоаффинным блокатором $K_v1.1$, $K_v1.3$ каналов [203].

Токсин OSK1, демонстрирующей высокую аффинность к каналам $K_v1.1$, $K_v1.2$ и $K_v1.3$ [210], выделен из скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*.

Скорпион *Mesobuthus eupeus* (Рисунок 18) является одним из наиболее распространенных видов рода *Mesobuthus* [211, 212]. К настоящему времени в яде *M. eupeus* обнаружено 59 потенциальных блокаторов калиевых каналов, описанных и представленных в базе данных UniPt [213]. Большинство пептидов обладают консервативной CSa/β структурой. Из 12 α-КТх подсемейств, которым принадлежат обнаруженные в яде *M. Eupeus* токсины, только 4 (α-КТх 1, α-КТх 3, α-КТх 8, α-КТх 16) содержат потенциальные K_v1 блокаторы. Наиболее эффективным авторы признали блокатор MeКТх13-3, идентичный выделенному ранее пептиду VmКТХ [214]. Рассчитаны значения IC₅₀ при связывании с каналом r $K_v1.1$: $1,9 \pm 0.2$ нМ (MeКТх13-3), $8,5 \pm 1.2$ нМ (MeКТх1-2), 90 ± 2 нМ (MeКТх13-2), 135 ± 10 нМ (MeКТх11-3), 780 ± 60 нМ (MeКТх11-1) [213].

Впервые из яда *M. eupeus* был выделен и проанализирован токсин MeuКТХα1 [215]. Пептид MeuКТХα1, классифицированный как α-КТх3.13, блокирует каналы r $K_v1.1$, r $K_v1.2$ и h $K_v1.3$ с IC₅₀ $203,15 \pm 4,06$ пМ, $8,92 \pm 2,3$ нМ и $171 \pm 8,56$ пМ соответственно, но не связывается с r $K_v1.4$,

rK_V1.5, rK_V1.6, hK_V3.1, rK_V4.3, hERG, Shaker IR каналами при концентрации ниже 2 мкМ. Авторы выделили функциональный сайт, образованный шестью остатками, участвующих в узнавании K_V1.3 канала: S10, R23, F24, K26, N29, T35. Аминокислоты в позициях 9, 14, 28 и 30 ответственны за различия в связывании с каналами.

Другим токсино-подобным пептидом, заслуживающим внимания, является MeuTХKα3. Он демонстрирует наибольший уровень идентичности с пептидами pMeKTx9-1 and pMeKTx9-2 и только 28-35% с другими ранее определенными α-KTx [198]. Данный пептид содержит два остатка, задействованных во взаимодействии с калиевыми каналами (K27 и F36), однако в 30 положении имеет не классический для семейства α-KTx остаток N, а остаток Р. Обратная замена Р30N приводит к значительному усилению аффинности связывания с каналами rK_V1.2 и rK_V1.3, но не оказывает влияния на связывание с rK_V1.1. Авторы отмечают, что MeuTХKα3 является молекулой двойного действия: она не только является эффективным блокатором K⁺ каналов, но и демонстрирует антимикробное действие. Причем антибактериальные свойства так же усиливаются в случае мутантной формы Р30N. Несмотря на то, что механизм цитолитического эффекта пептидов подробно не изучен [216], исследования показали, что рекомбинантный пептид rMeuTХKβ1 эффективен против бактерий, ооцитов, мышинных эритроцитов и паразитов за счет в большей степени С-концевого фрагмента C(22–72)) [217].

Семейство *Scorpionidae* включает в себя 13 родов и 240 видов. Наиболее изученными токсинами, выделенными из яда скорпионов этого семейства, являются HsTx1 (*Heterometrus spinifer*) [218], Pi1 и Pi4 (*Pandinus imperator*) [217, 218], Vm24 (*Vaejovis mexicanus smithi*) (Рисунок 18). HsTx1 проявляет наибольшую активность по отношению к K_V1.1 и K_V1.3 каналам, Pi1 и Pi4 токсины – к K_V1.2 каналу, в то время как Vm24 токсин проявляет высокую аффинность к каналам K_V1.1-1.3.

1.3. Комплексы калиевых каналов с блокаторами. Впервые структура комплекса калиевого канала с пептидным блокатором была исследована методом спектроскопии ЯМР для модифицированного бактериального канала KcsA и харибдотоксина (Таблица 3) благодаря использованию уже известных индивидуальных структур канала и блокатора [84] (Рисунок 19).

В структуру природного KcsA, не связывающего известные пептидные блокаторы эукариотических калиевых каналов, были введены 3 мутации (Q58A, T61S, R64D), повысившие сродство KcsA к харибдотоксину и усилившие тем самым его сходство с эукариотическими каналами семейства K_v1, однако не снизившие высокий уровень его экспрессии. Еще три мутации (F103Y, T107F, L110V) были введены в центральную полость для придания сходства с каналом K_v11.1 человека.

Анализ спектров ЯМР показал, что связывание харибдотоксина приводит к структурным перестройкам участков канала, ответственных за взаимодействие с токсинами, а расположение спиралей M1 и M2 остается неизменным. Главная цепь токсина не претерпевает существенных изменений в процессе связывания. Было доказано связывание аминокислотного остатка K27 харибдотоксина с порой канала, а также описан интерфейс взаимодействия.

Таблица 3. Сравнение расчетных (ΔG_{calc}) и экспериментальных (ΔG_{exp}) значений свободной энергии взаимодействия некоторых K_V -каналов с пептидными блокаторами поры

Канал (pdb-код шаблона)	Токсин (pdb- код структуры или шаблона)	Силовое поле метода МД	ΔG_{calc} , ккал/моль	ΔG_{exp} , ккал/моль	Ссылка
$K_V1.1$ (2R9R)	HsTx1 (1QUZ)	NAMD, CHARMM36	-10.1±0.6	-11.1±0.1	[221]
	ShK (1ROO)	NAMD, CHARMM22	-14.3±1.1	-14.7±0.1	[75]
	ShK-K-amide (1ROO)	NAMD, CHARMM22	-11.8±1	-12.3±0.1	[76]
	ShK-K18A (1ROO)	NAMD, CHARMM27	-11.7±0.7	-11.3±0.1	[78]
$K_V1.2$ (2R9R)	HsTx1 (1QUZ)	NAMD, CHARMM36	-8.9±0.6	-9.5±0.1	[221]
	ShK (1ROO)	NAMD, CHARMM22	-10.1±1.1	-11±0.1	[75]
	MTx (1TXM)	NAMD, CHARMM36	-12.6	-12.6	[222]
$K_V1.3$ (3LUT)	ChTx (2A9H)	NAMD, CHARMM27	-10.4	-12.5	[71]
	MgTx (1MTX)	NAMD, CHARMM36	-11.5	-13.9	[73]
$K_V1.3$ (2A79)	ChTx (2CRD)	GROMACS, OPLS-AA	-26±1	-11.4±0.2	[70]
$K_V1.3$ (2R9R)	HsTx1 (1QUZ)	NAMD, CHARMM36	-14.0±0.6	-14.9±0.2	[221]

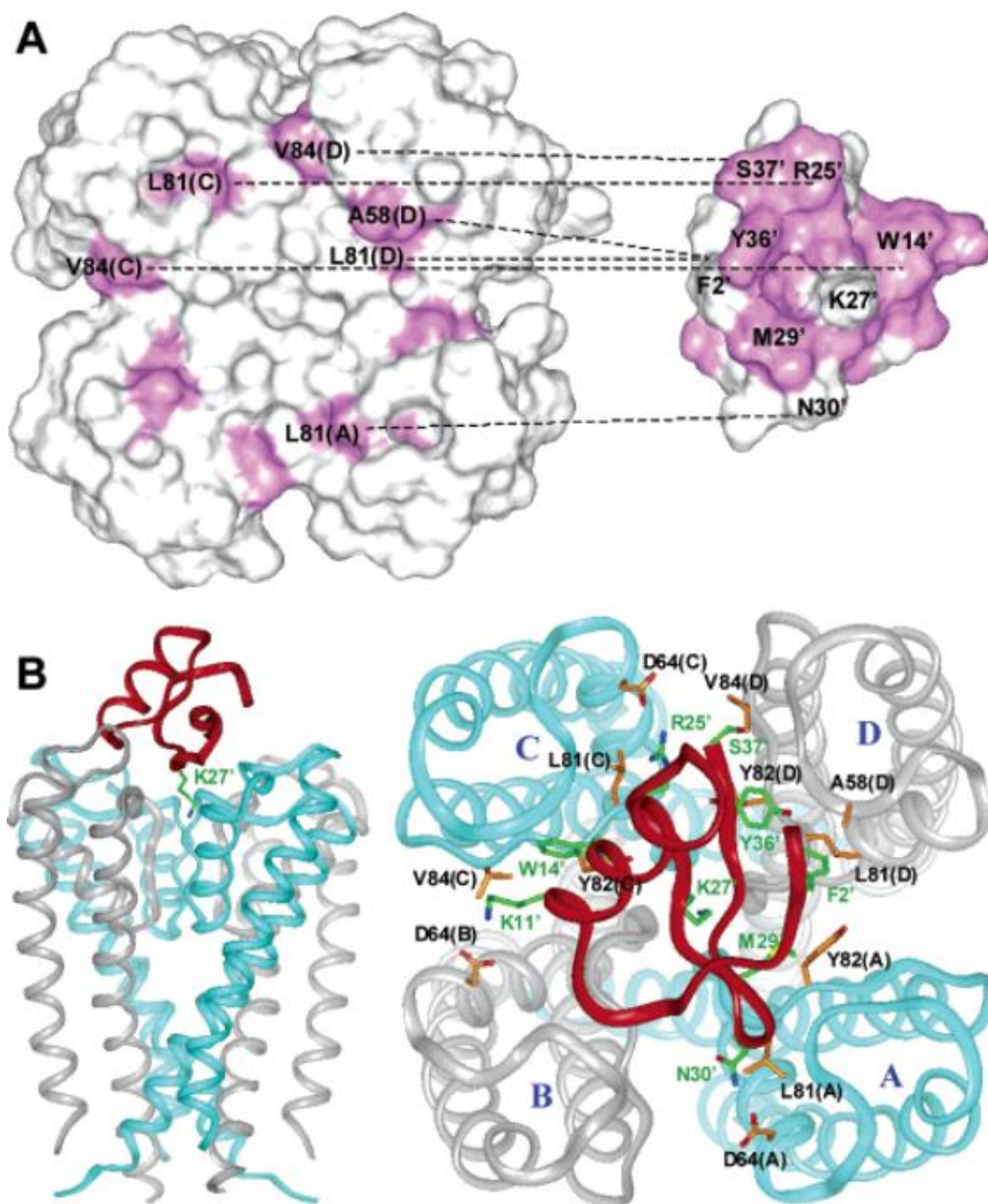


Рисунок 129. А – Интерфейс связывания калиевого канала KcsA с харибдотоксином, определяемые по ядерному эффекту Оверхаузера и химическим возмущениям сдвига. Прямые контакты обозначены пунктирными линиями. Остатки, демонстрирующие взвешенное химическое возмущение сдвига более 0,15 ppm, окрашены в розовый цвет. В – Средняя минимизированная структура комплекса бактериального канала KcsA (серый, голубой) с харибдотоксином (красный) в ленточном представлении, вид сбоку и сверху. Боковые цепи контактирующих аминокислотных цепей выделены зеленым с оранжевыми атомами углерода. Четыре субъединицы канала KcsA обозначены буквами А-В [84].

Методом PCA была получена структура комплекса гибридного канала K_v1.2-2.1 с харибдотоксином (Таблица 1, Рисунок 20). Гибридизация затронула ПЧД: в канале K_v1.2 «лопасть» сенсора потенциала (voltage-sensor paddle; участок S3b-S4 спирали) была заменена на аналогичную от канала K_v2.1, как это было опробовано авторами ранее [45]. Токсин ассиметрично связывается с тетрамерным каналом в четырех статически различных, но структурно и энергетически эквивалентных ориентациях, связанных четырехкратной осью симметрии. Таким образом, наблюдаемая карта электронной плотности является суперпозицией плотности электронов для четырех отдельных ориентаций токсина. Более того, из-за отсутствия внешних ограничений каждая ориентация заполнена на четверть, и плотность электронов для каждой ориентации является малой. Определенные вторичные структурные особенности были различимы на карте электронной плотности и позволили определить приблизительное размещение молекулы ChTX, структура которого была определена ранее с помощью ЯМР [223]. Анализ структуры комплекса гибридного канала K_v1.2-2.1 с харибдотоксином показал, что ни канал, ни токсин не претерпевают заметных изменений структуры при связывании [87]. Как было отмечено выше, токсин ассиметрично связывается с устьем порового домена канала так, что широкий конец токсина находится ближе к оси симметрии канала, чем конический конец токсина. Спиральная часть направлена в сторону от канала, поверхность токсина, образованного β-листом, обращена к каналу. Внутренняя архитектура токсина класса α-KTx такова, что три дисульфидные связи, удерживающие токсин, являются скрытыми компонентами в структуре и большинство боковых цепей аминокислотных остатков направлены наружу и могут участвовать во взаимодействиях с аминокислотными остатками канала. Наиболее важными взаимодействиями аминокислотных остатков канала и токсина считаются контакт ароматического кольца Y36 с D375 и V377 одной субъединицы канала и контакт M29 с D375 соседней. Ближе к периферии

боковая цепь R25 взаимодействует с Q353, а T8-T9 с Q353 другой субъединицы канала. Авторы предположили наличие электростатических взаимодействий R25, R34.

Интересным аспектом комплекса гибридного канала $K_v1.2-2.1$ с харибдотоксином является распределение ионов калия в селективном фильтре канала. СФ содержит 4 сайта связывания ионов, S1-S4, S1 – наиболее внеклеточный [74, 222, 223]. На основе анализа дифракционных данных высокого разрешения для канала KcsA было сделано заключение, что во время процесса транспорта ионов эти сайты поочередно заняты в конфигурациях 1,3 и 2,4 [106]. Заселенность каждого сайта была экспериментально определена равной 0,5 [226]. В это время в комплексе канал-токсин только сайты S2 и S4 имеют различимую электронную плотность, верхний сайт связывания иона пуст. Различие в распределении ионов калия в СФ канала связывают с ролью остатка K27 в образовании водородных связей с карбонильными группами Y в поре канала, которые в противном случае координировали ион калия в сайте S1 [224]. Таким образом, выделены две причины, по которым ион калия не располагается в сайте S1: во-первых, из-за электростатического отталкивания близко расположенной положительно заряженной аминокислотной группы, во-вторых, атомы кислорода карбонильной группы, которые могут участвовать в координации иона калия в сайте S1, не доступны из-за взаимодействия с боковой цепью остатка K27 [87].

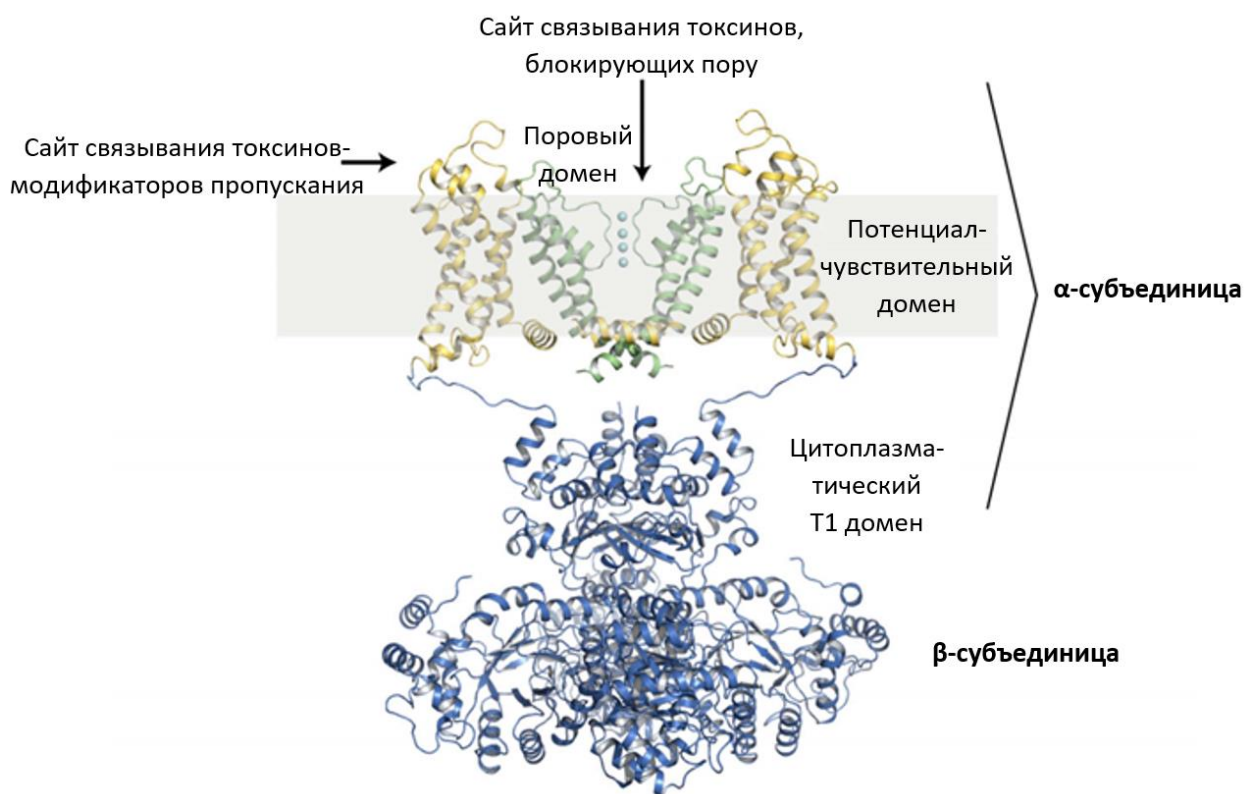


Рисунок 2013. Вид сбоку структуры гибридного канала $K_v1.2-2.1$, демонстрирующий две диагональные субъединицы гибридного канала в комплексе со вспомогательной β -субъединицей в ленточном представлении. Область поры канала окрашена в зеленый цвет, а область ПЧД и линкер между ПЧД и порой окрашены в желтый цвет. Цитоплазматический домен T1 и вспомогательная β -субъединица показаны синим цветом. Ионы K^+ в селективном фильтре показаны в виде голубых сфер. Область, соответствующая мембране, закрашена светло-серым цветом. Каждая α -субъединица канала образует комплекс с β -субъединицей, и четыре таких α -и β -гетеродимера образуют тетрамер. На рисунке стрелками указаны места для связывания токсинов, блокирующих пору, и токсинов-модификаторов пропускания (модифицировано из [87]).

Рассмотрение структур комплексов харибдотоксина с каналами (модифицированным KcsA и гибридным $K_v1.2-2.1$) показывает, что значительное число взаимодействий реализуется между аминокислотными остатками токсина и петлями каналов. Р-петли являются наиболее вариабельным фрагментом K_v -каналов и, возможно, что именно эта вариабельность является причиной отличий в силе взаимодействий блокатора с различными каналами.

1.4. Применение методов молекулярного моделирования калиевых каналов и их комплексов. Экспериментальное получение пространственных структур калиевых каналов и их комплексов с блокаторами остается сложной трудоемкой задачей. Методы молекулярного моделирования являются востребованным инструментом анализа структур K_V-каналов и их комплексов.

Основным подходом построения пространственных моделей каналов с неизвестной структурой является моделирование по гомологии [227] на основе данных о структуре гомологичного белка. Этот процесс включает в себя несколько этапов [228]:

1) поиск потенциальных шаблонов – белков с известной структурой, максимально гомологичных моделируемому белку, например, с помощью веб-сервисов BLAST [229] или FASTA [230];

2) выравнивание последовательностей шаблона и моделируемого белка, например, с помощью веб-сервиса CLUSTAL [231];

3) построение структурной модели неизвестного белка по шаблону путем сохранения одинаковых остатков, замены различающихся и достройки фрагментов, отсутствующих в шаблоне, например, с помощью программы Modeller [232].

Использование веб-сервиса Swiss-model [233] позволяет выполнить все эти три этапа автоматически. Ограничением использования веб-сервиса Swiss-model является размер моделируемых белков, что приводит к невозможности проведения моделирования высокомолекулярных соединений, таких как комплексы каналов с пептидными блокаторами.

Необходимым условием применимости моделирования по гомологии является значительное (не ниже 20–30%) сходство последовательностей моделируемого белка и шаблона [234]. Гомология поровых доменов K_V-каналов достигает 80% и более, отличия последовательности в большей степени локализованы в поровой петле.

Расшифровка структуры канала $K_v1.2-2.1$ в комплексе с харибдотоксином [87] подтвердила данные других экспериментальных методов о том, что ПЧД не участвует в связывании блокаторов поры. Поэтому при моделировании комплексов блокаторов с K_v -каналами ограничиваются рассмотрением только поровых доменов.

Сходство последовательностей поровых доменов K_v -каналов и бактериального канала KcsA достигает 30%, поэтому структура последнего также используется в качестве шаблона для моделирования поровых доменов K_v -каналов и их комплексов с блокаторами [66, 85, 86, 233] наряду с некоторыми другими структурами (Таблица 1). Обоснованием такого подхода к моделированию служат, в том числе, экспериментальные данные, показывающие, что гибридные каналы KcsA- $K_v1.X$ (каналы KcsA, в которых Р-петля заменена гомологичной петлей каналов $K_v1.x$, $x = 1, 2, 3, 6$), сохраняют специфический профиль высокоаффинного связывания блокаторов, характерный для каналов $K_v1.x$ [211, 234, 235].

Помимо этого, моделирование по гомологии позволяет получать структуры белков, в последовательность которых были внесены мутации. Для конструирования мутантных белков применяются различные программы:

- PyMol [238] (например, для изучения химерного канала KcsA- $K_v1.3$ [239]; оценки роли нитрирования остатка Y198 канала hERG1 [240]),
- WHATIF [241] (произведен анализ взаимодействий между гибридным каналом KcsA- $K_v1.3$ и калиотоксином [235]),
- дополнение (mutator plugin) к программе для визуализации молекул VMD [242] (получение структур каналов $K_v1.1$, $K_v1.3$ дикого и мутантного типа [76, 78, 79, 219, 220]),
- веб-сервис Swiss-model (получение структуры потенциал-управляемого калиевого канала $K_v10.2$ дикого типа и с введенной мутацией R327H [243]).

Кристаллические структуры ионных каналов и модели, построенные по гомологии, нуждаются в дальнейшем уточнении. Конформации петель каналов и боковых цепей аминокислотных остатков могут не соответствовать энергетически выгодным положениям. Поэтому моделирование по гомологии, как правило, сопровождается дальнейшим изучением структуры получаемых моделей с помощью методов броуновской динамики (БД), молекулярного докинга, молекулярной динамики (МД) или моделирования методом Монте-Карло (МК).

1.4.1. Броуновская динамика. Метод БД является разновидностью метода стохастической динамики и рассматривает движение молекул как твердых тел под действием внешних сил, сил трения, имитирующих взаимодействие с молекулами растворителя, и случайных сил. Применительно к исследованиям калиевых каналов метод БД наиболее широко применяется для моделирования ионного транспорта [244, 245] и, реже, - для анализа взаимодействий токсинов с каналами [246, 247]. В этом случае для проведения расчетов используется приближение, в котором каналы и блокаторы полагают жесткими структурами, растворитель – неявным, а мембрану – идеализированным диэлектрическим слоем [248]. Расчеты БД в данном приближении позволяют значительно снизить требования к вычислительным ресурсам и достичь таких времен расчета, на которых проявляются макроскопические эффекты [249]. При исследовании механизмов прохождения ионов сквозь пору каналов используется уравнение Ланжевена или броуновское движение первого порядка. Электростатические взаимодействия могут быть описаны путем решения уравнения Пуассона для различных конфигураций мобильных зарядов. Другие силы, например, стерическое отталкивание, обрабатываются в зависимости от конкретной модели.

Преимуществом использования БД является возможность моделирования в течение больших отрезков времени (≈ 1 мс) для, например, анализа потока ионов сквозь пору соответствующих каналов [250–253],

оценки роли диаметра пор и расположения заряженных аминокислотных остатков на поток ионов [254]. Это достигается за счет исследования диффузии ионов через статическую белковую пору, при этом окружающий растворитель (вода) рассматривается как непрерывная среда. Одним из ограничений прямого подхода является проблема учета гибкости селективного фильтра канала [255].

Расчет методом БД связывания токсина Lq2 (Таблица 2) с модифицированным каналом KcsA позволил построить модель комплекса, выявить взаимодействующие с каналом аминокислотные остатки пептида и описать характер их взаимодействий [246]. Использование всех 22 вариантов структуры Lq2, представленных в pdb-файле, позволило преодолеть ограничение в подвижности структуры блокатора, накладываемое в методе БД, и учесть его конформационную подвижность. Один из этих вариантов обеспечил получение модели комплекса, хорошо соответствующей экспериментальным данным. Подвижность канала в расчетах не учитывалась.

Более совершенным способом учета конформационной подвижности в расчетах БД является их сочетание с расчетами МД, как это было сделано при анализе комплексов канала K_v1.3 с аджитоксином, харибдотоксином, калиотоксином, маргатоксином и ноксиустоксином [247]. Сравнение расчетных значений энергии электростатического взаимодействия в комплексах и логарифмов констант диссоциации комплексов выявило их высокую корреляцию ($R^2=0.60$). Отметим, что в случае калиотоксина было обнаружено несоответствие этой корреляции, которое можно объяснить использованием некорректной структуры пептида (pdb-код 1KTX), значительно отличавшейся как от структур гомологичных пептидов аджитоксина и OSK1, так и от истинной структуры калиотоксина, полученной позднее (pdb-код 3ODV [256]).

1.4.2. Молекулярный докинг. Молекулярный докинг – метод молекулярного моделирования, целью которого является поиск наиболее достоверной

ориентации и конформации лиганда в сайте связывания белка-мишени. Он широко используется для построения структур комплексов калиевых каналов с блокаторами [137, 220, 247].

При выполнении расчетов докинга одна из молекул фиксируется в пространстве, а вторая пристыковывается к ней с разных сторон и в разных ориентациях. Процедура белок-белкового докинга является более сложной процедурой, чем докинг низкомолекулярных лигандов к белку, за счет необходимости учета подвижности боковых цепей аминокислотных остатков [257–259]. Для каждой конфигурации полученного комплекса производят расчеты оценочной функции, основанной на комплементарности свойств поверхности, электростатических взаимодействиях, ван-дер-ваальсовском отталкивании, энергии десольватации, энергии внутренних напряжений (деформации валентных связей), водородных связей и взаимодействия ароматических групп.

Для молекулярного докинга необходимо применение одной из специализированных программ, таких как AutoDock (<http://autodock.scripps.edu/>) [260], RosettaDock [261], BiGGER [262], HADDOCK (<http://haddock.science.uu.nl/>) [263] или ZDOCK (<http://zdock.umassmed.edu/>) [264]. Наиболее часто и успешно для предсказания структуры комплексов канал-блокатор используются три последние программы [205, 262, 263]. Протоколы молекулярного докинга, реализованные в большинстве указанных программ, являются сложными и включают несколько шагов для повышения достоверности получаемых результатов. Например, обычно на первом этапе проводится начальная стыковка, затем полученные решения ранжируются с использованием более точных силовых полей, отбираются наиболее перспективные кандидаты, и процесс повторяется до получения финального решения [248].

Наряду с алгоритмами поиска и уточнения решений докинга, оценочные функции играют ключевую роль в определении достоверной структуры белок-

белкового комплекса. Разработано множество подходов к оценке, и часто в компьютерных программах исследователю предоставляется возможность сделать выбор одной или нескольких функций на разных этапах поиска и уточнения решения докинга. Оценочные функции могут быть основаны на силовых полях, эмпирические и статистические. Следует отметить, что оценочные функции не всегда позволяют верно рассчитать энергию комплекса и отранжировать конформации пептида в сайте связывания канала на каждом этапе конформационного поиска [267]. Заранее предполагая возможность ошибки при применении оценочной функции, исследователи рассматривают не единственную структуру изучаемого комплекса, а целый набор возможных вариантов, полагая, что в нем есть правильное или близкое к нему решение. Наиболее достоверный вариант в результате выбирают на основе доступных экспериментальных данных о роли отдельных ключевых аминокислотных остатков в образовании белок-белковых контактов [268].

На данный момент, метод молекулярного докинга является наиболее распространенным методом для создания комплексов полипептидных токсинов с ионными каналами, которые затем претерпевают процедуры минимизации энергии, уравнивания и симуляции МД [71, 268–272].

Метод молекулярного докинга с помощью сервера ClusPro [274] был использован для создания комплекса потенциал-управляемого калиевого канала K_v1.2 с токсином, выделенном из яда скорпиона *Tityus stigmurus* [271] (Рисунок 21). В рамках исследования продемонстрирован вклад электростатических взаимодействий и роль положительно заряженных остатков К токсина в стабилизации комплекса. В дополнение к этому водородная связь, образованная консервативным в ряду α -КТх токсинов остатком N, имеет ключевое значение при связывании токсина *T. stigmurus*.

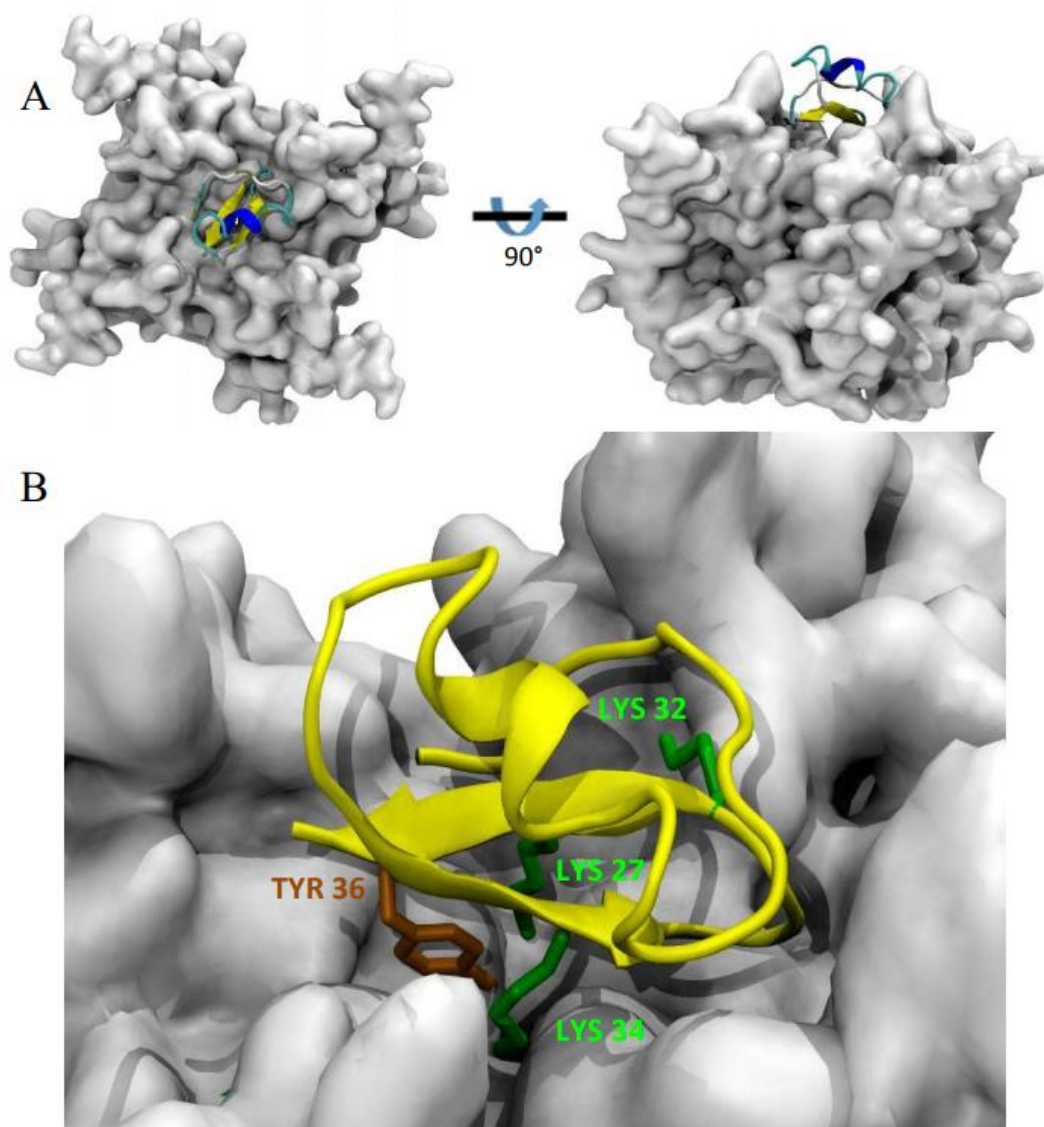


Рисунок 214. А – Молекулярный докинг токсина скорпиона *T. stigmurus* с калиевым каналом $K_v1.2$ (представлен серым цветом). Б – Взаимодействие между пептидным блокатором и поровым доменом канала. Аминокислотные остатки, выделенные зеленым цветом, представляют собой положительно заряженные лизины, оранжевым цветом – остатки тирозина. K27 и Y36 являются частью функциональной диады, а другие K32 и 34 также участвуют во взаимодействии с порами калиевого канала [271].

В качестве нового ингибитора потенциал-управляемых калиевых каналов был описан токсин PcKuz3, Kunitz-подобный пептид, выделенный из яда полипа *Palythoa caribaeorum* [275]. С помощью молекулярного моделирования, включающего структурный филогенетический анализ, молекулярный докинг в программе ZDOCK и симуляцию МД, была исследована его структура, отличающаяся от структуры известных

гомологичных пептидов, экспрессируемых в морских анемонах. С помощью метода молекулярного докинга предсказано, что токсин PcKuz3 способен блокировать калиевые каналы за счет связывания узкого участка β -поворота с консервативной последовательностью канала (аминокислотная последовательность TTVGYG). Токсин PcKuz3 представляет собой потенциальный инструмент для разработки биопрепарата для лечения нейродегенеративных заболеваний.

Для предсказания структуры комплекса ShK с каналом KV1.3 был также использован метод молекулярного докинга в программе ZDOCK с последующими этапами: кластерным анализом набора полученных решений докинга, скринингом на основе литературных данных, минимизацией энергии и моделированием МД для оптимизации полученной структуры (Рисунок 22).

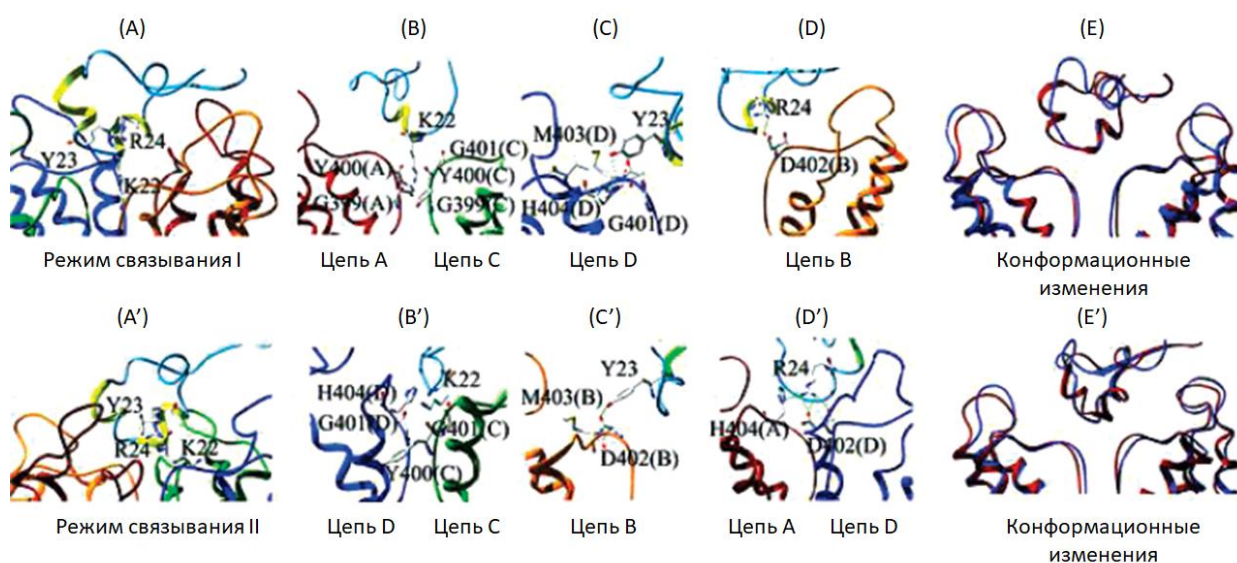


Рисунок 152. Возможные структуры комплекса блокатора ShK с потенциал-управляемым калиевым каналом KV1.3 и механизм их распознавания. Разделы (A)-(E) и (A') и (E') представляют структуру комплекса ShK-KV1.3 и механизм распознавания для режимов связывания I и II соответственно. Разделы (B)-(D) и (B')-(D') представляют вероятное взаимодействие между функциональными остатками пептида ShK и остатками канала KV1.3 в пределах расстояния контакта 4,0 Å. В разделах (E) и (E') красная и синяя структура комплекса обозначают несвязанные и связанные конформации соответственно. Пунктирная линия отображает водородную связь между двумя атомами [66].

В результате проведенных вычислений было обнаружено два вероятных положения блокатора в комплексе [66]. В первом случае СФ канала закрывался остатком K22 токсина (режим связывания I), во втором - остатком R24 (режим связывания II). Расчеты энергии связывания методом ММ-PBSA изменений ΔG при введении аланиновых замен в сопоставлении с экспериментальными данными позволили установить наиболее вероятную ориентацию токсина и идентифицировать важные для формирования комплекса аминокислотные остатки токсина (K23, I25, Y32) и канала (R254, F359, P360, D379, V381, T383).

Как было ранее отмечено, оценочные функции молекулярного докинга могут вносить ошибки при ранжировании получаемых решений. С этим обстоятельством столкнулись авторы исследования [266] при применении программы HADDOCK для анализа связывания токсинов скорпиона семейства α KTx с потенциал-управляемыми калиевыми каналами $K_v1.1$, $K_v1.2$ и $K_v1.3$. Так, алгоритм докинга предсказывает ложные энергетические минимумы в комплексах с низкой афинностью, несмотря на стерические/конформационные штрафы, очевидные из визуального осмотра. Эти «помехи» значительно усложняют энергетический анализ, хотя обычно можно получить правильное ранжирование посредством тщательной интерпретации характеристик связывания и устранения ложноположительных результатов. Для решения возникающей проблемы авторы предложили стратегию сравнительного докинга с использованием ключевых мотивов. Ее суть заключается в сопоставлении результатов докинга токсинов схожих профилей селективности для определения полного набора функциональных остатков и добавления ограничений докинга (например, фиксирование взаимодействий остатка K с остатками селективного фильтра канала) для повышения его эффективности.

Молекулярный докинг может быть использован и для учета конформационной подвижности токсинов. Так, в работе по улучшению

селективности связывания аналогов токсина C_{ss}20 [69] авторы проанализировали более миллиона решений молекулярного докинга, выполнив визуальное рассмотрение 2000 лучших решений. Недостатком такого подхода, помимо очевидной трудоемкости, является отмеченное выше несовершенство используемых оценочных функций: методы молекулярного докинга позволяют получить сотню лучших решений, среди которых гарантированно есть правильное, но не позволяют однозначно распознать его. Более оптимальным представляется проводить молекулярный докинг не столь масштабно, но сопровождать его оптимизацией получаемых решений с помощью МД, а вычисление констант связывания выполнять с помощью расчетов свободной энергии [248].

1.4.3. Молекулярная динамика. В расчетах молекулярной динамики временная эволюция системы взаимодействующих атомов или частиц отслеживается интегрированием классических уравнений движения молекулярной системы на отрезке времени.

Метод МД с использованием возможностей суперкомпьютеров позволяет исследовать системы порядка 10^6 атомов на временном диапазоне до 1 мкс. Такое представление может достаточно хорошо описывать динамику макромолекул на атомарном уровне, однако ограничением является исследование химических реакций, а также образования и разрыва химических связей.

Для описания движения атомов или частиц применяется Ньютоновская механика. Поведение каждого атома описывается классическим уравнением движения, равнодействующая сила находится как градиент потенциала, включающего в себя сумму всех взаимодействий атомов в системе. Для пар атомов это валентные связи, кулоновские, ван-дер-ваальсовы взаимодействия и водородные связи. Для троек атомов - валентные углы, а для четверок - торсионные углы.

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = \vec{F}_i, \quad (1),$$

$$\vec{F}_i = -\frac{dU(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_n)}{d\vec{r}_i}, \quad (2),$$

где i – номер атома, n – количество атомов в системе, m_i – масса атома, r_i – радиус-вектор атома, $\vec{F}_i$ – равнодействующая сил, действующих на атом, U – потенциальная энергия системы.

Затем рассчитываются новые координаты и скорости атомов в следующий момент времени $t + \Delta t$:

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = \vec{r}_i(t) + (\Delta t)\vec{v}_i(t) + \frac{1}{2}(\Delta t)^2 \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i}, \quad (3),$$

$$\vec{v}_i(t + \Delta t) = \vec{v}_i(t) + \frac{1}{2} \frac{\vec{F}_i(t + \Delta t) + \vec{F}_i(t)}{m_i}. \quad (4),$$

Ключевым моментом процедуры интегрирования является выбор величины шага интегрирования Δt , которая должна быть меньше периода самых быстрых движений системы. Так, для органических молекул это характерное время осцилляции валентной связи C-H (10 фс, [276]). Для полноатомных систем обычно выбирается значение шага интегрирования 1-2 фс. Начальные скорости системы обычно задаются случайным образом в соответствии с распределением Максвелла для заданной температуры.

Метод МД реализован в различных программных пакетах: AMBER [277], CHARMM [278], GROMACS [279], NAMD [280]. Усовершенствование алгоритмов расчетов МД, повышение производительности и вычислительной мощности позволяет анализировать все более сложные системы, включающие нативные ионные каналы в липидном окружении, на больших временах.

Точность расчетов МД зависит от выбора силового поля, то есть математических функций и их параметров, используемых для описания потенциальной энергии системы частиц.

Потенциальная энергия системы в общем виде описывается следующей формулой:

$$U(r_1, r_2, \dots, r_N) = U_{bond} + U_{n-b} = [\sum_k U_k^{bond}(r_1, r_2) + \sum_k U_k^{angle}(r_1, r_2, r_3) + \sum_k U_k^{torsional}(r_1, r_2, r_3, r_4)] + [\sum_k U_k^{LJ}(r_1, r_2) + \sum_k U_k^{coulomb}(r_1, r_2)] \quad (5),$$

где U_{bond} – потенциал всех валентных взаимодействий, U_{n-b} – потенциал невалентных взаимодействий, U_k^{bond} – потенциал валентной связи, U_k^{angle} – потенциал валентного угла, $U_k^{torsional}$ – потенциал торсионного угла, U_k^{LJ} – потенциал Ван дер Ваальсовых взаимодействий, $U_k^{coulomb}$ – потенциал электростатического взаимодействия.

Функции силового поля и наборы соответствующих параметров получают из экспериментальных работ и квантово-механических расчетов. При правильном использовании существующие в настоящее время силовые поля позволяют получать удивительно точные результаты [281]. Полноатомные силовые поля, такие как OPLS-AA и различные варианты CHARMM, учитывают все типы атомов в системе. Альтернативно, силовые поля с объединенными атомами, такие как GROMOS и OPLS-UA, рассматривают тяжелые неполярные атомы (углерод, сера) и связанные с ними атомы водорода в качестве единых центров взаимодействия [282].

При моделировании К_v-каналов наиболее часто используют программный пакет NAMD [280] в сочетании с силовым полем CHARMM [283], включая его варианты CHARMM22, CHARMM27 и CHARMM36. Отметим, что поле CHARMM27 оптимизировано для расчетов ДНК, РНК и липидов, а в комбинации с полем CHARMM22 – для исследования ДНК-белковых взаимодействий. Хотя применение CHARMM27 для анализа белок-белковых взаимодействий представляется не совсем оптимальным, результаты расчета свободной энергии связывания, выполненные с его применением [71, 78, 222], хорошо согласуются с экспериментальными значениями (Таблица 3). В CHARMM36 по сравнению с CHARMM22 введены изменения, улучшающие исследование конформационного пространства при

сворачивании белков, их сборке в комплексы и при функционально значимых конформационных изменениях [284].

Первые МД расчеты ионных каналов проводились *in vacuo*, вода была промоделирована как неявный растворитель через включение диэлектрической постоянной в значение электростатической энергии системы. Современные МД расчеты комплексов каналов с токсинами позволяют учитывать взаимодействия с явными молекулами воды, противоионами и липидами мембраны. Мембранные белки не являются жесткими телами и подстраивают свою структуру для обеспечения гидрофобного соответствия к окружающему липидному бислою. Особенно важна структура области полярных групп липидов, так как показано, что она оказывает влияние на функционирование ионных каналов, агрегацию белков и детали спираль-спиральных взаимодействий, образование ионных связей. Для токсинов, связывающихся с ПЧД каналов, расчетная структура комплекса зависит от липидного состава мембраны [285]. Однако при моделировании комплексов с пептидными блокаторами поры учет липидного бислоя в явном виде не является обязательным [66]. Это подтверждается высоким уровнем согласованности между экспериментальными данными и результатами расчетов свободной энергии образования таких комплексов, оптимизированных методом МД [285, 286]. Обоснованный отказ от учета липид-белковых взаимодействий при моделировании комплексов значительно уменьшает требования к вычислительным ресурсам, позволяя увеличить длину рассчитываемых МД траекторий и полноту исследования конформационного пространства. Еще одним приемом, позволяющим снизить ресурсоемкость расчетов, является применение модели неявного растворителя, в частности, обобщенной борновской модели (generalized Born solvation model). Вне зависимости от используемой модели растворителя, расчеты МД в настоящее время проводят с длиной траектории от 15-20 нс [79, 222] до 100 нс [73, 287].

В ряде случаев для расчета и анализа комплексов токсинов с каналами используют метод направленной МД. Метод заключается в проведении расчета МД при постепенном изменении расстояния между одной или несколькими парами остатков, взаимодействие которых при образовании комплекса представляется наиболее существенным. Достоинством этого метода является учет экспериментальных данных о взаимодействующих остатках, что позволяет считать образуемые контакты более точными. Метод направленной МД хорошо зарекомендовал себя при анализе связывания мауротоксина с каналом K_v1.2 [222], а также маргатоксина и хонготоксина с каналом K_v1.3 [73].

1.4.4. Моделирование методом Монте-Карло. Метод Монте-Карло – это численный метод решения математических задач при помощи моделирования случайных величин. Этот метод можно определить как метод статистических испытаний или метод моделирования случайных величин с целью вычисления характеристик их распределений. Основной идеей молекулярного моделирования методом МК является поиск конформаций молекул с низкой энергией на основе случайного изменения координат. Серию генерируемых случайных перемещений частиц можно интерпретировать как динамическую эволюцию системы во времени [289].

В методе Монте-Карло число частиц N , объем V и температура T выбираются как независимые переменные, сохраняющие постоянные значения при моделировании. Молекулы располагаются случайным образом в соответствии с предписаниями генератора случайных чисел, каждое новое расположение либо принимается, либо отбрасывается с вероятностью, определенной по закону

$$P = e^{-U/kT}, \quad (6),$$

где U – внутренняя энергия системы, k – константа Больцмана. Оценку равновесных свойств системы получают после расчета достаточно большого числа шагов и их последующего усреднения [290].

Одним из важных необходимых условий для моделирования Монте-Карло является то, что используемая система должна быть эргодической, а именно: каждая точка, доступная в конфигурационном пространстве, должна быть доступна из любой другой точки конфигурационного пространства за конечное число ходов Монте-Карло.

В отличие от моделирования МД, модели Монте-Карло свободны от ограничений применимости уравнения движения Ньютона. Эта свобода допускает больше возможностей в предложении ходов, которые генерируют пробные конфигурации в выбранном ансамбле статистической механики. Хотя эти движения могут быть нетривиальными, они могут привести к огромным ускорениям до 10^{10} или более раз при выборке равновесных свойств. Определенные движения Монте-Карло также могут быть объединены в симуляции, что позволяет исследователю проявлять большую гибкость при подходе к конкретной задаче. Кроме того, методы Монте-Карло, как правило, легко распараллеливаются, а некоторые методы идеально подходят для использования с большими компьютерными кластерами.

Вместе с этим, в рамках традиционного моделирования белков методом Монте-Карло отсутствие решения уравнений движений Ньютона не позволяет получать динамическую информацию о системе. Основной сложностью проведения исследований белков в явном растворителе методом Монте-Карло является сложность проведения крупномасштабных перемещений. Любое движение, которое значительно изменяет внутренние координаты белка без перемещения частиц растворителя, вероятно, приведет к большому перекрытию атомов и, таким образом, к отказу от пробной конфигурации. Моделирование с использованием неявного растворителя не обладает этими недостатками, и, следовательно, крупнозернистые белковые модели являются наиболее популярными системами для моделирования методом Монте-Карло. Условия проведения такого моделирования зависят от конкретной задачи исследования [291].

Методом Монте-Карло исследовалось пропускание и селективность модельных ионных [292], натриевых [293], кальциевых [294], калиевых каналов [295], взаимодействия калиевых каналов с низкомолекулярными лигандами: корреолитом и блокаторами hERG каналов [296,297]. Метод Монте-Карло использовался для описания конформационных перестроек бактериального канала KcsA при пропускании ионов [298].

Метод Монте-Карло применялся для анализа роли иона калия на характер взаимодействий потенциал-управляемого калиевого канала K_v1.3 с лигандом – корреолитом [299] (Рисунок 163). Исследователи помещали ионы калия в сайты 2/4 и 1/3/5 и проводили минимизацию энергии методом Монте-Карло из множества случайно сгенерированных положений и ориентаций лиганда. Показано, что во всех предсказанных низкоэнергетических комплексах атомы кислорода корреолита хелатируют ион калия. Корреолит-чувствительные остатки канала, известные по мутационному анализу, вместе с лиганд-связанным ионом калия обеспечивают основной вклад в энергию связывания лиганда. Дефицит ионов калия в селективном фильтре K_v1.3 канала стабилизировал калий-связанный корреолит во внутренней поре. Это исследование объясняет парадокс, почему нуклеофильные и катионные лиганды связываются с одной и той же областью во внутренней поре калиевых каналов, и выносит предположение, что ион калия является важной детерминантой при связывании лиганда.

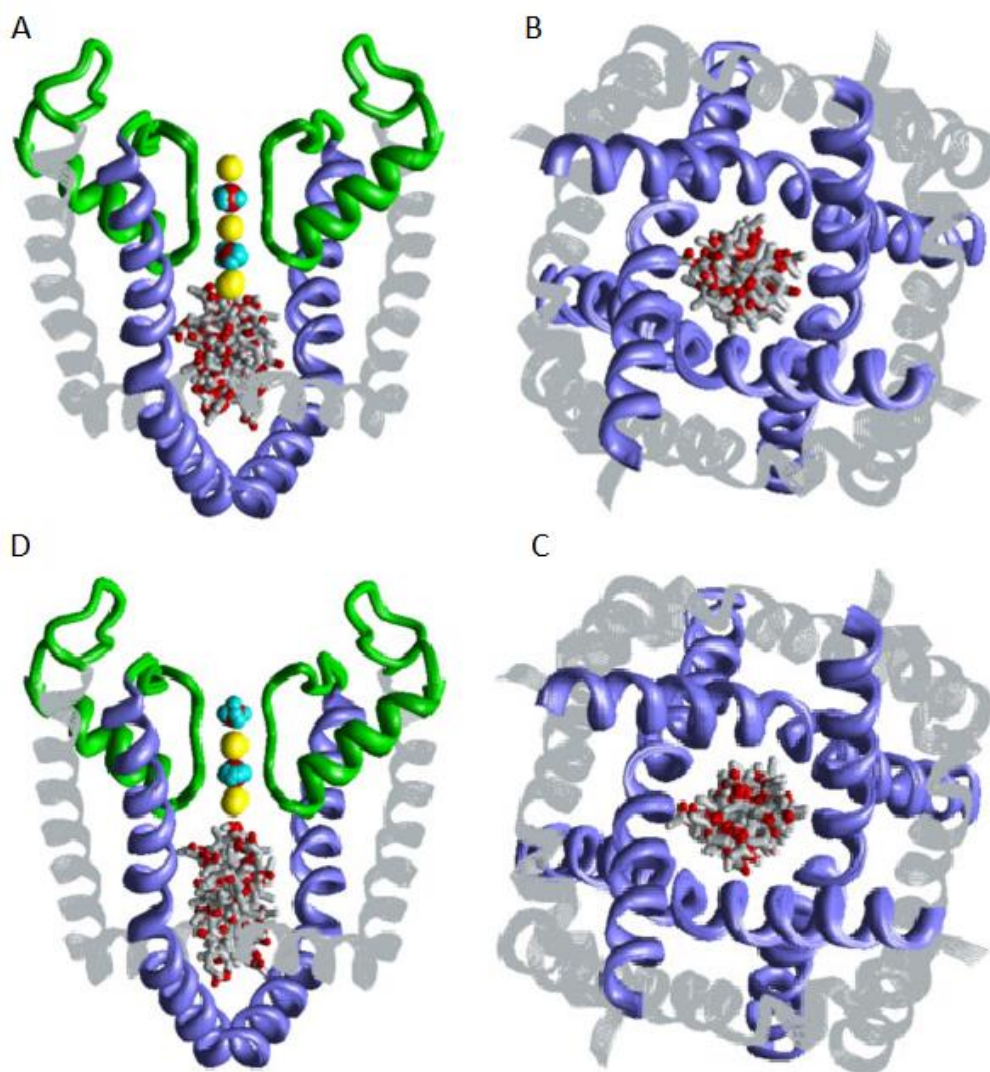


Рисунок 163. Случайный поиск оптимального положения корреолида в комплексе с потенциал-управляемым каналом $K_v1.3$. А, В – вид сбоку и сверху на 12 энергетически лучших структур, полученных из 20000 случайно сгенерированных начальных положений корреолида при условии положения ионов калия в сайте 1/3/5. С, D - вид сбоку и сверху на 6 энергетически лучших структур, полученных из 20000 случайно сгенерированных начальных положений корреолида при условии положения ионов калия в сайте 2/4 [299].

Метод Монте-Карло эффективно используется для моделирования классических и квантовых систем. Например, программа MacroModel, реализованная на базе программы Maestro (www.schrodinger.com), позволяет производить минимизацию энергии макромолекулярных систем, а также предсказывать геометрию и относительные конформационные энергии молекул [300], что имеет ключевое значение для поиска оптимального положения пептидного блокатора в сайте связывания канала.

1.4.5. Расчет энергии комплекса канал-токсин. Для оценки достоверности структуры комплексов, полученных в результате моделирования, применяются расчеты свободной энергии связывания ΔG . Такие расчеты имеют фундаментальное значение для теоретической оценки возможности осуществления многих важных биологических процессов, в том числе формирования прочных комплексов лигандов с рецепторами и конформационных изменений в них [301].

Свободную энергию взаимодействия калиевых каналов с токсинами чаще всего оценивают с использованием метода расчета потенциала средней силы (ПСС), включающего в себя получение набора конформаций методом зонтичной выборки [302]. Во многих случаях этот метод позволяет получить значения ΔG , которые согласуются с экспериментальными данными (Таблица 3), что свидетельствует о хорошей точности численного моделирования и применимости такого анализа для конструирования пептидных блокаторов с заданными свойствами. В работе [70], где рассчитанное значение ΔG превышало измеренное более чем в два раза, это расхождение было объяснено различиями в ионной силе растворов, использованных для расчетов и в эксперименте. Альтернативно причина расхождения может быть связана с меньшей точностью расчетов на основе силового поля OPLS-AA по сравнению с вариантами поля CHARMM (Таблица 3).

Менее распространенным методом расчета свободной энергии является ММ-PBSA (molecular mechanics - Poisson-Boltzmann surface area), сочетающий использование молекулярной механики для расчета потенциальной энергии молекул в вакууме и решение уравнения Пуассона-Больцмана для расчета свободной энергии сольватации.

Метод реализован в программных пакетах AMBER [277] и GROMACS [303] и применительно к комплексам калиевых каналов с блокаторами дает качественное согласие с экспериментом [304].

1.4.6. Применение методов молекулярного моделирования для расчета взаимодействий между каналами и блокаторами. Моделирование комплексов K_V-каналов с природными и модифицированными пептидными блокаторами позволяет глубже понять структурные особенности и ключевые принципы межмолекулярных взаимодействий в этих комплексах, детально описать интерфейсы взаимодействий, объяснить наблюдаемые значения аффинности и селективности связывания блокаторов.

Моделирование по гомологии с использованием шаблонов мауротоксина (Таблица 3 **Error! Reference source not found.**) и канала KcsA позволило объяснить экспериментальные результаты по связыванию токсина Pi1 и его мутантов с каналом K_V1.2 [265]. Выполнив молекулярный докинг, авторы обнаружили важную роль основных остатков R5, R12, R28 и K31 пептида в стабилизации комплекса.

Аналогичный подход был использован для определения интерфейса взаимодействия канала K_V1.2 с коботоксином (Таблица 3) и его искусственным аналогом ACoTX1, отличающимся заменами T7P и D9Q [207]. Авторы установили, что направление дипольного момента токсина не является определяющим для объяснения его селективности, и заключили, что молекулярное моделирование облегчает разработку более аффинных и/или селективных аналогов существующих блокаторов.

На основе сравнительного анализа результатов молекулярного докинга токсина Vm24 и ряда других токсинов было найдено объяснение высокой селективности Vm24 в отношении канала K_V1.3 [305]. По мнению авторов, эта селективность связана с образованием плотных контактов N-конца Vm24 с каналом, что нехарактерно для других токсинов семейства α КТх.

С использованием молекулярного докинга для предсказания структуры комплекса ShK с каналом K_V1.3 и молекулярной динамики для оптимизации этой структуры было обнаружено два вероятных положения блокатора в комплексе [306]. В первом случае СФ канала закрывался остатком K22

токсина, во втором - остатком R24. На основе расчета методом ММ-PBSA изменения ΔG при замене некоторых остатков токсина на остатки аланина и сопоставления расчетов с экспериментальными данными о константах диссоциации комплексов предпочтение было отдано второму варианту с участием R24.

Для исследования образования комплексов каналов с токсинами был предложен метод анализа цикла мутаций (mutant cycle analysis), разработанный при картировании взаимодействий канала Shaker с аджитоксином [307]. Метод основан на предположении о том, что влияние одновременной замены остатка токсина и остатка канала на константу диссоциации комплекса зависит от того, взаимодействуют ли эти аминокислотные остатки, и может быть описано коэффициентом взаимосвязи. Учет экспериментальных данных о взаимодействующих аминокислотных остатках позволяет смоделировать структуру комплекса с помощью молекулярного докинга. По мере развития алгоритмов расчета ΔG метод анализа цикла мутаций находит все более широкое применение в молекулярном моделировании комплексов блокаторов с калиевыми каналами [68, 285, 303, 305].

Изучая взаимодействие мауротоксина с каналом $K_v1.2$ методами молекулярного докинга и МД [308], авторы рассмотрели несколько возможных ориентаций токсина в комплексе. Расчеты методом ММ-PBSA изменений ΔG при введении аланиновых замен в сопоставлении с экспериментальными данными позволили установить наиболее вероятную ориентацию токсина и идентифицировать важные для формирования комплекса аминокислотные остатки токсина (K23, I25, Y32) и канала (R254, F359, P360, D379, V381, T383).

Исследование связывания блокатора ADWX-1 с каналами $K_v1.1$ и $K_v1.3$, поддержанное молекулярным моделированием структуры их комплексов [309], позволило предложить три варианта расположения поровых

петель при взаимодействии с блокаторами: открытое, полуоткрытое (полузакрытое) и закрытое. В первом случае токсин взаимодействует лишь с остатками, окружающими СФ, и петли не оказывают влияния на связывание. Именно так, по мнению авторов, формируется комплекс мауротоксина с $K_v1.2$ каналом [308]. Во втором случае петли оказывают небольшое влияние на связывание, как например, в комплексах ADWX-1 с каналами $K_v1.1$ и $K_v1.3$. В третьем случае и петли, и область вокруг СФ определяют интенсивность и селективность взаимодействия с токсином.

Токсин Css20 характеризуется избирательностью связывания с каналами $K_v1.2$ и $K_v1.3$ по сравнению с $K_v1.1$ и $K_v1.4$ [69]. Моделирование структуры комплексов показало, что аминокислотные остатки каналов $K_v1.2$ и $K_v1.3$, контактирующие с Css20, сосредоточены в основном вокруг СФ и в Р-петле (7 из 8 остатков, различающихся в рассматриваемых каналах). Установлено, что остаток K28 важен для связывания с $K_v1.2$ и $K_v1.3$, а остатки Q11, I30, K33 и Y37 образуют благоприятные контакты только с каналом $K_v1.2$. Показано, что дополнительные благоприятные контакты с $K_v1.2$ могут возникнуть при замене A19 и A20 токсина на положительно заряженные R или K. Авторы предположили, что введение подходящих мутаций позволит повысить селективность аналогов Css20 по отношению к одному из каналов $K_v1.2$ и $K_v1.3$.

В работе [71] авторы показали, что электростатические взаимодействия в комплексах харибдотоксина, OSK1 и ShK с каналом $K_v1.3$ превалируют над ван-дер-ваальсовыми, а ключевыми аминокислотными остатками токсинов в этих взаимодействиях являются остатки лизина и аргинина: K27 и R25 для харибдотоксина, K27 и R24 для OSK1, а также K22 и R11 для ShK. Анализ энергии связывания, выполненный посредством расчета ПСС, дал значения, согласующиеся с экспериментальными данными (Таблица 3). Высокая ресурсоемкость расчетов методом ПСС, которая необходима для обеспечения их точности, сдерживает широкое применение численного анализа энергии

связывания и требует разработки более эффективных вычислительных процедур. Следует отметить, что отличия моделей комплексов ShK с K_V1.3, полученных в работах [306] и [73], требуют проведения дополнительных исследований.

Методика, включающая проведение расчетов МД и ПСС, была применена для изучения взаимодействия OSK1 с каналами K_V1.1, K_V1.2, K_V1.3 и подбора аминокислотных замен, способствующих увеличению селективности этого блокатора по отношению к K_V1.3 [77]. Авторы заключили, что замены K9S и S11R приведут к улучшению связывания с K_V1.3 при снижении связывания с K_V1.1 и K_V1.2. Расчеты констант связывания показали, что данные замены тысячекратно повышают селективность связывания пептида с каналом K_V1.3 и в 100 раз усиливают аффинность к этому каналу.

Применение МД для изучения конформационных изменений в гибридном канале KcsA-K_V1.3 при взаимодействии с калиотоксином [235] позволило авторам построить структурную модель комплекса и выдвинуть гипотезу об участии в связывании токсина остатков Y78 и D80 канала, которое сопровождается изменением их ориентации. Данная гипотеза была подтверждена данными спектроскопии ЯМР.

Ранее была описана гипотеза о ключевой роли функциональной диады аминокислотных остатков, состоящей из лизина, взаимодействующего с СФ, и отстоящего от него на 6-7 Å гидрофобного аминокислотного остатка (Y, F или L) [310] в способности токсинов различных животных распознавать K_V каналы. Как было отмечено, дальнейшие исследования, в том числе и с помощью методов молекулярного моделирования, показали, что избирательность связывания токсинов с различными K_V каналами зависит от многих других аминокислотных остатков. Степень, в которой функциональная диада определяет силу взаимодействия, также варьирует для

разных токсинов и модулируется вкладом в комплексообразование дополнительных аминокислотных остатков этих пептидов [210].

Повышение селективности блокаторов K_v -каналов является актуальной задачей современной фармакологии, поскольку природные токсины зачастую имеют высокую аффинность сразу к нескольким типам каналов. Выявление достоверных отличий во взаимодействиях исследуемого токсина с родственными K_v -каналами, которое обеспечивают методы молекулярного моделирования, открывает возможность подбора аминокислотных замен, усиливающих или ослабляющих сродство токсина к заданному каналу.

Сайт-направленный мутагенез использовался для создания высокоаффинного по отношению к каналу $K_v1.3$ токсина ADWX-1 путем введения замен G11R, I28T и D33N в токсин BmKTX [304]. Остатки, подлежащие замене, были определены исходя из анализа пространственной структуры комплекса ADWX-1 с $K_v1.3$, полученной методами молекулярного моделирования. Расчеты энергии связывания для ADWX-1 и ряда его мутантов (R23A, F24A, K26A, N29A, T35A) выявили важную роль положительно заряженных остатков в узнавании токсином $K_v1.3$ канала. Кроме того, было установлено, что замены R23A и F24A мешают взаимодействию ключевого остатка K26 с порой канала. Экспериментально измеренная аффинность ADWX-1 к $K_v1.3$ повысилась почти в 100 раз по сравнению с исходным BmKTX, а избирательность взаимодействия с каналом $K_v1.3$ усилилась в 340 и более чем 10^5 раз по сравнению с каналами $K_v1.1$ и $K_v1.2$.

Проведенные исследования показывают, что применение методов молекулярного моделирования позволяет достоверно воспроизводить молекулярные взаимодействия между калиевыми каналами и пептидными блокаторами, а также предсказывать эффект вводимых аминокислотных замен на селективность и аффинность связывания. Компетентное использование и развитие новых методов и алгоритмов молекулярного моделирования

необходимо для решения поставленных задач, позволяющих получать наибольшую корреляцию с экспериментальными данными. Развитие вычислительных подходов к моделированию макромолекулярных комплексов позволит значительно ускорять и повышать эффективность процесса разработки селективных блокаторов, которые смогут найти широкое применение в исследовательской и медико-биологической практике.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Анализ известных данных об активности блокаторов. Для отбора блокаторов, в дальнейшем использующихся для построения комплексов с K_v1 каналами, был проведен анализ опубликованных экспериментальных данных по их активности. В результате анализа 23 публикаций было найдено более 240 значений констант диссоциации (K_d) комплексов блокаторов с каналами $K_v1.X$ ($X=1, 2, 3, 6$). Параметры образования комплексов в анализируемых работах оценивались авторами различными методами и на разных объектах исследования. Методы оценки констант диссоциации включают в себя: метод локальной фиксации потенциала (англ. patch-clamp); метод фиксации напряжения, (англ. voltage clamp); метод радиолигандного связывания (англ. radioligand binding analysis). Для экспрессии каналов используют клеточные линии B82, CHO [174], COS-7 [69, 210], HEK-293 [202], Jurkat [311], L929 [176], LTK, MEL [204], PC12 [312], tsA-20 [176], клетки насекомых Sf9, ооциты лягушки и лимфоциты [132, 180, 201, 203, 205, 311–314], клетки бактерий *E.coli* [236], а также сферопласты [234, 310]. Эксперименты проводят на каналах различного происхождения: крысиных, мышинных и человеческих. Для сравнения молекулярных расчетов с экспериментом решено в первую очередь использовать данные, полученные коллегами в Лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН под руководством А.В. Феофанова [236, 316] на сферопластах в силу соответствия исследуемых молекул (гибридные каналы $KcsA-K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$)) и

доступности результатов связывания мутантных форм блокатора аджитоксина 2 (AgTx2). Сферопласт представляет собой модельную систему – бактериальная клетка с частично редуцированной клеточной стенкой, позволяющая эффективно экспрессировать и анализировать мембранные белки.

Дополнительно к анализу параметров связывания пептидных блокаторов был произведено выравнивание аминокислотных последовательностей с помощью веб-сервиса CLUSTAL [176] для выявления консервативных участков (Таблица 2).

2.2. Получение и уравнивание структур токсинов. В качестве первого этапа построения молекулярных моделей интересующих молекул в работе производился поиск аминокислотных последовательностей в базе данных NCBI Protein (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Protein>), а также пространственных структур, полученных методом спектроскопии ЯМР или рентгеновской кристаллографии, в базе данных белковых структур PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). При отсутствии доступной структуры блокатора проводилось моделирование по гомологии в программе Modeller [232] с наиболее близким по аминокислотной последовательности пептидом, определенным с помощью сервиса FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>). Мутантные формы токсинов были получены методом введения точечных замен в программе Maestro (www.schrodinger.com).

Для уравнивания структуры токсинов были проведены расчеты молекулярной динамики (МД). Для этого структура токсина помещалась в расчетную ячейку $5 \times 5 \times 5$ нм, заполненную около 2600 молекулами воды (модель точечных зарядов (англ. Single Point Charge model, SPC)) и примерно 20 ионов натрия и хлора для воспроизведения физиологических условий. Минимальное расстояние от комплекса до границы ячейки составляло 1 нм. Для проведения расчетов был использован программный пакет Gromacs

(www.gromacs.org) с силовым полем *opls-AA* [14]. Методы наискорейшего спуска и сопряженных градиентов были применены для проведения минимизации потенциальной энергии системы. Затем системы были уравновешены в каноническом (NVT, постоянное число частиц, объем и температура системы) и изотермо-изобарическом (NPT, постоянное число частиц, давление и температура системы) ансамбле при температуре 300 К (27° С) и давлении 1 бар. Расчеты МД были произведены в течение 5 нс.

В программном пакете Gromacs было рассчитано среднеквадратичное отклонение (СКО) C α -атомов токсинов для определения стабильности их структур. Кластерный анализ отдельных фреймов траектории МД, отобранных через каждые 20 пс, был проведен для выбора наиболее презентативных структур, в дальнейшем использующихся для построения комплекса с каналами.

2.3. Конструирование уравновешенных структур каналов. По аналогии с получением структур блокаторов, аминокислотные последовательности калиевых потенциал-управляемых каналов человека K_V1 были найдены в базе данных NCBI Protein (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Protein>). Поиск гомологов для моделирования структур каналов производился в сервисе FASTA.

Нативные структуры K_V1 каналов были получены с помощью метода моделирования по гомологии по шаблону полученных экспериментально с помощью метода PCA моделей канала K_V1.2, отличающимися положением Р-петель (pdb-коды 2A79 [63] и 3LUT [65]).

Аминокислотные последовательности гибридных каналов KcsA-K_V1 были получены с помощью замещения участков Р-петель бактериального канала KcsA на соответствующие участки эукариотических каналов K_V1. В качестве шаблона для построения моделей гибридных структур KcsA-K_V1 были выбраны две структуры бактериального канала: полноразмерные структуры канала KcsA в открытой конформации с pdb-кодами 3PJS и 1J95.

Во втором случае в селективном фильтре канала расположены ионы калия, которые существенно влияют на взаимодействие каналов с токсинами.

Для всех сконструированных каналов были проведены расчеты МД в водном окружении по алгоритму, описанному выше для структур токсинов. Отличием было применение заморозки C α -атомов трансмембранных остатков для имитации меньшей подвижности остатков в условиях мембранного окружения.

2.4. Получение и уравнивание структур комплексов каналов с токсинами. Построение структур комплексов калиевых каналов с блокаторами проводили методом моделирования по гомологии в программе Modeller по шаблону полученных экспериментально структур. Структуры комплексов нативных каналов K_V1.X (X=1, 3, 6) с токсинами строились по гомологии с каналом K_V1.2-2.1 в комплексе с ChTx (pdb-код 4JTA [87]); комплексов гибридных каналов KcsA-K_V1 с блокаторами – по гомологии с каналом KcsA с введенными мутациями в комплексе с ChTx (pdb-код 2A9H [84]), а также по шаблону структуры с pdb-кодом 4JTA.

В полученных комплексах структуры каналов и блокаторов были заменены на уравновешенные в результате МД модели в программе Maestro. Дополнительно были вручную минимизированы наталкивания боковых цепей аминокислотных остатков каналов с остатками токсинов. Ион калия был помещен в сайт S2 селективного фильтра. В альтернативные сайты связывания иона калия S1 и S3 были помещены молекулы воды, так как присутствие K⁺ иона в этих положениях препятствует проникновению блокирующего пору остатка К токсина в селективный фильтр канала [85].

Для получаемых комплексов были проведены расчеты МД по описанному выше алгоритму. Заморозка C α -атомов остатков трансмембранных цепей была применена для имитации мембранного окружения. Мы не производили моделирования мембраны вокруг канала, так как проведенные ранее вычислительные эксперименты выявили

согласованность экспериментальных и расчетных данных о взаимодействии токсинов скорпиона с калиевыми каналами, полученными с применением этой упрощающей аппроксимации [66, 284, 285, 316].

Подбор оптимальной стартовой ориентации токсина в сайте связывания K_v1 канала

Для поиска оптимальной стартовой конформации блокатора в сайте связывания K_v1 канала было произведено его оттягивание на 1 Å от первоначального положения в комплексе, а затем поворот на различные углы относительно ориентации харибдотоксина в структуре 4JTA. За ось вращения токсина была принята ось поры канала. Поворот производился на угол от -45° до 45° с шагом 5°, где за положительное направление было принято направление против часовой стрелки при взгляде с внешней стороны мембраны. Для каждой конформации были произведены расчеты МД.

Другим алгоритмом поиска оптимального положения токсина в сайте связывания канала являлось оттягивание токсина из сайта связывания, а затем его ассоциация с каналом в процессе молекулярной динамики.

2.5. Анализ данных. На основе распределения углов поворота молекулы AgTx2 в сайте связывания канала в течение траектории МД комплексов была определена предпочтительная ориентация токсина. Анализ гидрофобных контактов и стэкинг-взаимодействий водородных и ионных связей токсина с каналом был произведен с помощью расширенной версии программы Platinum (www.model.nmr.ru/platinum) [15] для 70 выбранных кадров траектории МД, в течение которых система была уравновешена (период 3–5 нс расчета МД).

Для расчета значения (*HPC*), являющегося характеристикой интенсивности гидрофобных контактов, использовалась площадь гидрофобного контакта между каналом и токсином (в Å²). Площадь гидрофобного контакта рассчитывалась как число точек контакта, деленное на поверхностную плотность точек (1.6 точек на Å²), используемую в программе Platinum.

Интенсивность водородных связей, характеризуемая значением HB , оценивалась в Platinum с помощью уравнения

$$HB = HB_r(r_{AD}) \times HB_\alpha(\alpha_{AHD}) \quad (7),$$

где r_{AD} – это расстояние между атомами донора и акцептора, α_{AHD} – угол между атомами донора, водорода и акцептора, $HB_r(r_{AD})$ и $HB_\alpha(\alpha_{AHD})$ – коэффициенты расстояния и угла.

$$HB_r(r_{AD}) = \begin{cases} 1.0; & r_{AD} \leq r_1 \\ (r_0 - r_{AD}) / (r_0 - r_1); & r_1 \leq r_{AD} \leq r_0 \\ 0.0; & r_{AD} \geq r_0 \end{cases} \quad (8),$$

где r_1 and r_0 равны 3.2 и 3.4 Å, соответственно.

$$HB_\alpha(\alpha_{AHD}) = \begin{cases} 1.0; & \alpha_{AHD} \leq \alpha_1 \\ (\alpha_0 - \alpha_{AHD}) / (\alpha_0 - \alpha_1); & \alpha_1 \leq \alpha_{AHD} \leq \alpha_0 \\ 0.0; & \alpha_{AHD} \geq \alpha_0 \end{cases} \quad (9),$$

где $\alpha_1 = 0^\circ$ и $\alpha_0 = 20^\circ$ в случае, когда донор – азот, $\alpha_1 = 20^\circ$ и $\alpha_0 = 40^\circ$, когда донор – кислород. Соответственно, значение HB является безразмерным и для каждой водородной связи может изменяться от 0 до 1.

Расстояния (r_{ii} , Å) между центрами масс положительно и отрицательно заряженных групп N- и C-концевых остатков, боковых цепей D, E, R и K рассчитывались в программе Platinum. Интенсивность ионных взаимодействий, охарактеризованные значением ION , рассчитывались с помощью выражения:

$$ION \sim 1/r_{ii} \quad (10).$$

Под сильно взаимодействующими остатками понимались те, что обладают существенной площадью гидрофобного контакта ($> 0,2 \text{ Å}^2$) и (или) образуют сильную водородную связь (значение параметра $HB > 0,5$) и (или) проявляют короткодействующее ионное взаимодействие (расстояние между ионами $< 6 \text{ Å}$) после усреднения параметров по 70 отобранным для анализа

кадрам. Эти остатки были отнесены к интерфейсу взаимодействия и представлены в сводной таблице для анализа.

2.6. Расчет энергии связывания токсинов с Kv1 каналами методом потенциала средней силы. Для определения энергии связывания были произведены расчеты методом зонтичной выборки (англ. umbrella sampling) [319]. С его использованием свободная энергия может быть вычислена из потенциала средней силы, рассчитываемого для серии конформаций, получаемых в результате молекулярной динамики.

Отбор исходных структур комплекса канал-токсин был осуществлен с помощью метода кластерного анализа траектории МД в программном пакете Gromacs. Алгоритм кластеризации использует СКО межатомных расстояний для определения отдельных кластеров структур, среднее положение наиболее представительного из них используется для дальнейших расчетов.

В процессе реализации метода зонтичной выборки на первом этапе создается ряд конфигураций комплекса по одной степени свободы (координате реакции): из уравновешенного ранее комплекса канала с блокатором оттягивается токсин на 5 нм, в то время как канал остается зафиксированным. Затем траектория МД нарезается на отдельные кадры динамики («фреймы»), соответствующие увеличению расстояния между каналом и токсином с шагом 0,1 нм (порядка 45 кадров динамики).

Для каждой конфигурации производится запуск зонтичной выборки при условии удержания комплекса в выбранном диапазоне по координате реакции. Траектории всех расчетов комбинируются с помощью метода взвешенного анализа гистограмм (WHAM), и восстанавливается изменение свободной энергии системы вдоль координаты реакции и потенциал средней силы (ПСС) [320].

Глава 3. Результаты и обсуждение

3.1. Моделирование структур нативных каналов K_v1 и гибридных каналов KcsA-K_v1. Эукариотические каналы K_v1 принадлежат к семейству Shaker-подобных каналов, обладающих сходной структурой [26]. Поровый домен K_v1 каналов представляет собой гомотетрамер, каждая субъединица которого состоит из ТМ спиралей S5, S6 и региона Р-петли. Аминокислотные последовательности поровых доменов K_v1 каналов демонстрируют высокий уровень гомологии [321].

Для подробного изучения функционирования поровых доменов K_v1 каналов и характера их взаимодействия с пептидными блокаторами на модельных системах, например, сферопластах, были разработаны гибридные каналы KcsA-K_v1 [322]. Они так же являются гомотетрамерами, в которых две ТМ спирали прокариотического KcsA канала (M1 и M2) каждой субъединицы соединяются за счет частично структурированного полипептида, называемого Р-петлей, обладающего характерной аминокислотной последовательностью эукариотического канала. Внеклеточная Р-петля содержит несколько структурных элементов: так называемую «башню», поровую спираль и характерную последовательность, формирующую при тетрамеризации K⁺ селективный фильтр поры канала [64]. Перенос полипептидного фрагмента Р-петли K_v1 канала на соответствующий участок канала KcsA увеличивает гомологию внеклеточной области поровых доменов до 84% и формирует внеклеточный сайт связывания поровых блокаторов K_v1 канала в гибридном канале KcsA-K_v1 [213, 321], одновременно с этим позволяя экспрессировать такие упрощенные конструкции на мембране сферопластов. KcsA-K_v1 каналы, так же, как и каналы KcsA, не обладают ПЧД, который в K_v1 каналах формируется за счет 4 дополнительных ТМ спиралей каждой субъединицы. Так как эти спирали не участвуют в связывании поровых блокаторов [66, 87, 284], ПЧД обычно исключается из моделей при моделировании комплексов канал-блокатор [323].

Точные структуры большинства представителей семейства K_V1 каналов и гибридных каналов KcsA- K_V1 пока не определены экспериментально, однако применение молекулярного моделирования может заполнить этот пробел за счет построения структур каналов по гомологии с известной структурой $K_V1.2$ канала [87].

В рамках данной работы было проведено моделирование поровых доменов нативных каналов K_V1 и гибридных каналов KcsA- K_V1 [321]. Результаты моделирования показывают, что внеклеточный фрагмент порового домена KcsA- K_V1 (K_V1) каналов характеризуется широким и довольно плоским плато квадратной формы (площадью около 10 нм^2), окружающим просвет поры. Плато граничит с неструктурированными Р-образными петлями, поднимающимися над плато приблизительно на 1 нм.

Основные структурные черты области поры каналов K_V1 являются консервативными [265, 320], наибольшая вариабельность наблюдается в области Р-петель, аминокислотные последовательности которых индивидуальны для каждого вида K_V1 каналов. Р-петли имеют различную конформацию в разных кристаллографических структурах: наиболее распространена конформация, как в структурах с pdb-кодами 2A79 и 3LNM, уникальна – в структуре с pdb-кодом 3LUT [25] (Рисунок 24). Последовательность Р-петель богата заряженными остатками, которые несут отрицательный заряд: $K_V1.1$ (суммарный заряд четырех петель -20), $K_V1.2$ (-16), $K_V1.3$ (-16) и $K_V1.6$ (-24), при условии, что гистидин не вносит существенного заряда. Величина отрицательного заряда, по-видимому, влияет на связывание пептидных катионных блокаторов, облегчая им распознавание K_V1 каналов на плазматической мембране.

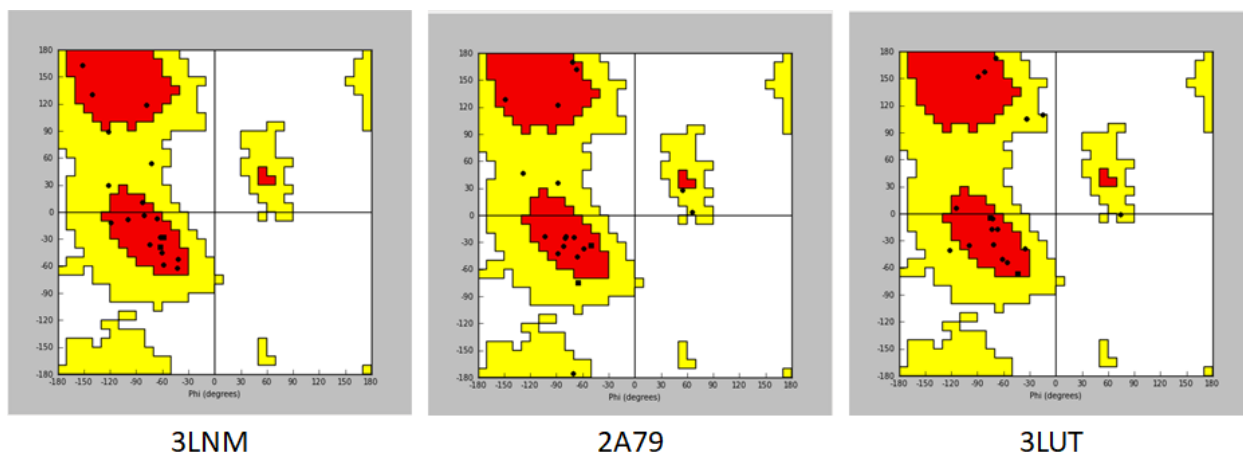


Рисунок 174. Карты Рамачандрана для различных структур потенциал-управляемого калиевого канала Kv1.2.

Боковые цепи основных аминокислот Kv1.1, Kv1.3 и Kv1.6 (а также гибридных каналов KcsA-Kv1) практически скрыты, тогда как аргинин Kv1.2 канала экспонирован во внеклеточную сторону в области Р-петли (Рисунок 25, 27, 29-31). Было обнаружено, что расположение ароматических остатков на поверхности каналов Kv1 (KcsA-Kv1) консервативно, за исключением Y429 (Y82; здесь и далее в скобках указана нумерация в случае KcsA-Kv1 каналов), который присутствует в Kv1.1 и Kv1.6 (KcsA-Kv1.6), но не в Kv1.3.

Присутствие остатка L405 (L58) в Р-петле создает четыре четко определенных гидрофобных участка в гидрофильной поверхности канала Kv1.6 (KcsA-Kv1.6) канала, что отличает его от других Kv1.X (X = 1-3) каналов [266] (Рисунок 25). Очевидно, что эти гидрофобные сайты могут заметно влиять на связывание пептидных блокаторов с Kv1.6 (KcsA-Kv1.6) каналом.

Во время проведения расчетов МД селективный фильтр каналов не претерпевает значительных изменений, и его конечная структура очень похожа на структуру Kv1.2 в кристалле (СКО С α -атомов ~ 1 Å). Этот результат согласуется с общим мнением о том, что область поры потенциал-управляемых калиевых каналов является консервативной и стабильной среди эукариотических и прокариотических видов [324].

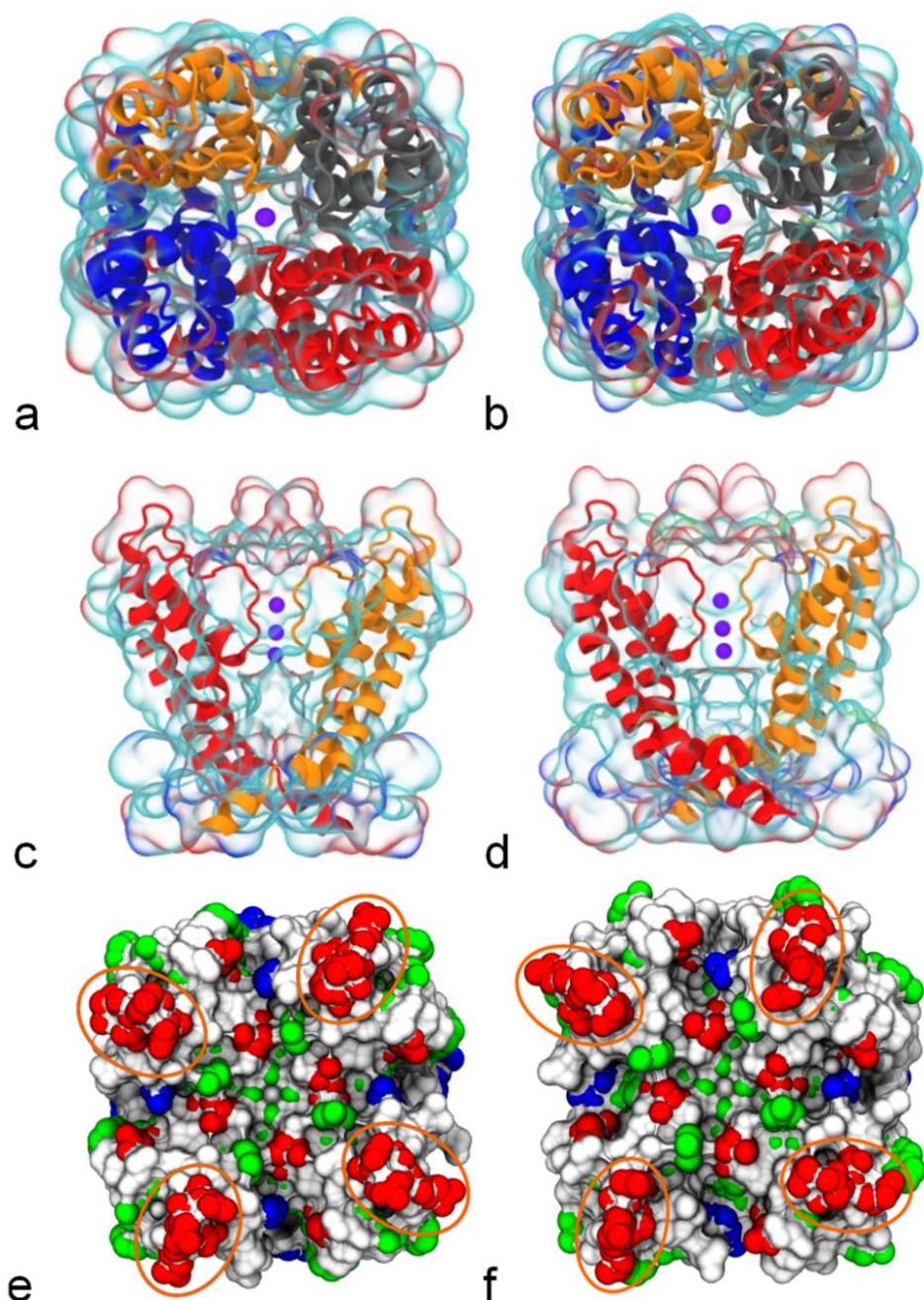


Рисунок 185. Структурные модели каналов KcsA-Kv1.6 (a, c, e) и Kv1.6 (b, d, f): вид сверху (a, b, e, f) и сбоку (c, d). Ленты и сплошные линии разного цвета (a-d) показывают основные части субъединиц каналов. «Облака» ограничивают области боковых цепей. Синие шары (a-d) представляют собой ионы калия в поре канала. Вид сбоку (c, d) показан для ясности без передней и задней субъединицы. (e, f) Распределение боковых цепей основных (синих), кислотных (красных) и ароматических (зеленых) аминокислотных остатков. Оранжевые овалы показывают положение характерных массивов остатков D400, D401, D402 и D403 (D53-D56), расположенных в верхней части Р-петель. Представление в виде цветных сфер используется для отображения боковых цепей [321].

3.2. Моделирование структур пептидных блокаторов. Для изучения связывания с калиевыми каналами методами молекулярного моделирования были отобраны следующие блокаторы: аджитоксин (AgTx2), калиотоксин (КТх), токсин OSK1 (Рисунок 26). Для этих блокаторов известны пространственные структуры, полученные методом спектроскопии ЯМР (pdb-коды 1AGT [131], 3ODV [256], 1SCO [132], соответственно), что послужило основой для проведения молекулярно-динамического (МД) расчета этих структур в растворе и определения наиболее вероятных конформаций.

Исследуемые токсины демонстрируют высокий уровень гомологии аминокислотных последовательностей: 87%, 76% между AgTx2 и КТх, AgTx2 и OSK1 соответственно, 79% между токсинами КТх и OSK1. Наиболее консервативным участком структуры является вторая и третья β -цепь, в то время как участок α -спирали и поворота перед ней обладает наибольшим числом различающихся аминокислотных остатков.

При pH=7 суммарный заряд изучаемых токсинов – положительный и варьирует от +6 (AgTx2, КТх) до +8 (OSK1), отрицательно заряженные остатки встречаются преимущественно в N-концевой половине пептида.

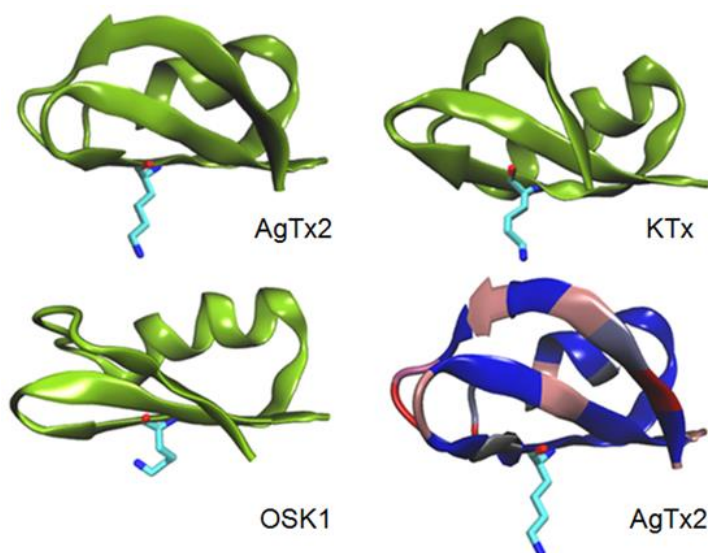


Рисунок 196. Трехмерные структуры токсинов AgTx2, КТх, OSK1 в ленточной презентации, аминокислота K27 – в стержневом представлении. Цветная структура AgTx2 визуализирует локализацию переменных (красных) и консервативных (синих) остатков токсинов.

По результатам расчета было обнаружено, что вторичная структура блокаторов в процессе МД остается практически неизменной (СКО Са-атомов ~ 1 Å), однако боковые цепи отдельных остатков демонстрируют высокую подвижность, что выражается, в частности, в изменении доступной растворителю поверхности этих остатков, а также изменении общего числа водородных связей в молекулах блокаторов.

3.3. Моделирование структур комплексов калиевых потенциал-управляемых калиевых каналов с пептидными блокаторами. В рамках проведенной работы были построены комплексы потенциал-управляемых калиевых каналов семейства $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) с пептидным блокатором AgTx2 и комплексы $K_v1.6$ с KTx, OSK1, выделенным из яда скорпиона, методом моделирования по гомологии. Новизной примененного метода является моделирование комплекса целиком, используя экспериментальную структуру комплекса гибридного эукариотического канала $K_v1.2-2.1$ с харибдотоксином (pdb-код 4JTA). Это позволяет получить наиболее достоверную структуру исследуемого комплекса, а также воспроизвести подстройки Р-петель каналов в процессе связывания токсинов.

Уравновешенный участок траектории МД был использован для определения предпочтительной ориентации токсина в сайте связывания каналов. Согласно МД расчетам структуры токсинов сохраняют свою вторичную структуру (три β -тяжа и α -спираль, соединенные тремя дисульфидными мостиками) в комплексе с $K_v1.X$ и KcsA- $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) каналами. Жесткость вторичной структуры токсинов при связывании с каналами согласуется с экспериментальными данными о структуре комплекса харибдотоксина с $K_v1.2-2.1$ и модифицированным KcsA каналами [84, 87], а также с результатами МД расчетов комплексов других каналов с токсинами [325].

Для исследований оптимальной ориентации токсинов в сайте связывания канала K_v1 производился поворот токсина относительно оси

канала с шагом 5° (в плоскости мембраны). В результате МД AgTx2 в комплексе с KcsA-K_V1.6 каналом вернулся в исходное положение, соответствующее ориентации харибдотоксина в комплексе с K_V1.2-2.1 каналом (4JTA структура). Поворот на $+5^\circ$ и $+12^\circ$ относительно оси канала (при наблюдении с внеклеточной стороны) нами наблюдался при связывании AgTx2 с каналами KcsA-K_V1.1 и KcsA-K_V1.3 [326] соответственно. Отметим, что ChTx не меняет своей ориентации относительно канала K_V1.2-2.1 в течение расчета МД по идентичному алгоритму (данные не показаны). Повороты токсинов могут рассматриваться как характерные подстройки для взаимодействий с отдельными видами KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) каналов. Моделирование поворота токсинов в сайте связывания канала-мишени позволило исследовать все возможные положения блокаторов и выделить из них наиболее стабильные. Такой подход позволяет получать наиболее достоверные комплексы при условии отсутствия молекулярных протранственных структур, полученных экспериментальными методами.

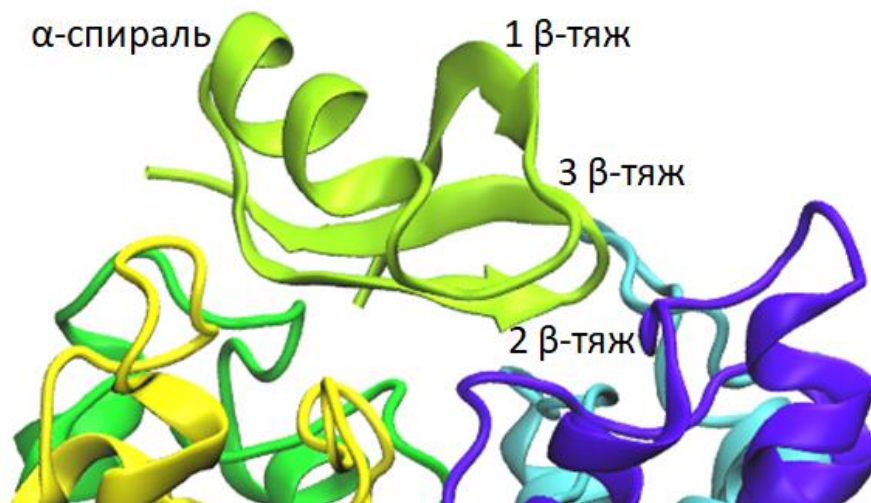


Рисунок 27. Молекулярная модель структуры комплекса гибридного калиевого канала KcsA-K_V1.1 с AgTx2. Обозначено три β-тяжа, образующих β-лист, и α-спираль.

Общая картина связывания пептидных блокаторов, выделенных из яда скорпионов, является схожей. В уравновешенном комплексе токсины ассиметрично связываются с плато, образованным субъединицами канала

вокруг поры и окруженным четырьмя выступами Р-петель. Результаты МД расчетов показывают, что вторичная структура токсинов не изменяется в комплексе по сравнению со структурой в свободном состоянии ($СКО < 1,5 \text{ \AA}$). Первый β -тяж и α -спираль токсинов скорпиона обращены в противоположную от канала сторону, в то время как второй и частично третий β -тяжи образуют контакты с поверхностью канала (Рисунок 27). Площадь соприкосновения токсинов скорпиона составляет примерно треть поверхности канала. Вторым β -тяж образует большую часть контактов с порой канала, в то время как α -спираль преимущественно связывается с одной из Р-петель канала. Во время моделирования МД структура канала адаптируется к токсину в основном в регионах Р-петель, тогда как структура поровых спиралей, СФ и петель D80-T85 не изменяется. Так, $СКО$ α -атомов консервативного СФ (последовательность TVGYG) составляет $< 1 \text{ \AA}$ после оптимизации.

3.3.1. Особенности интерфейса взаимодействия $K_v1.X$ каналов с аджитоксином 2. Для детального анализа были выбраны комплексы каналов KcsA- $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) с токсином скорпиона аджитоксином 2 (AgTx2), демонстрирующим высокую аффинность к потенциал-управляемым каналам K_v1 . Константы диссоциации в этих комплексах равны 0,044, 0,004 и 0,037 нМ, соответственно (www.kaliumdb.org). Анализ публикаций показал, что, несмотря на интенсивные исследования связывания пептидных блокаторов с ионными каналами, комплексы аджитокина 2 с каналами $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) не были построены и детально описаны.

Для характеристики интерфейсов связывания комплексов каналов KcsA- $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) с токсином скорпиона аджитоксином 2 (AgTx2), определения взаимодействующих остатков, типов формирующихся связей и их количественного описания была применена специально разработанная методика, включающая в себя оригинальный алгоритм расчета МД и использование расширенной версии программного пакета Platinum для

оценки вклада каждого образующего контакта (Таблица 7). Детально разработанный подход описан в разделе Материалы и методы.

3.3.1.1. Характеристика интерфейса связывания аджитоксина 2 с каналом KcsA-K_v1.3. В результате анализа стабильного участка траектории структуры комплекса гибридного канала KcsA-K_v1.3 с AgTx2 было обнаружено, что пептид поворачивается в сайте связывания канала KcsA-K_v1.3 на 12° (в плоскости мембраны при наблюдении с внеклеточной стороны) относительно исходного положения (Рисунок 28). Поворот AgTx2 на 12° вокруг оси канала может считаться характерным для взаимодействия с K_v1.3-каналом и способствовать адаптации структуры токсина под жесткую структуру сайта связывания канала.

В уравновешенном комплексе AgTx2 ассиметрично связывается с плато, образованным субъединицами канала вокруг поры и окруженным четырьмя выступами Р-петель (Рисунок 28). Вторичная структура AgTx2 не изменяется в комплексе по сравнению со структурой в свободном состоянии (СКО С α -атомов остатков токсина < 1,2 Å). Во время моделирования МД структура канала адаптируется к токсину в основном в регионах Р-петель, в то время как структура поровых спиралей, СФ и петель D80-T85 не изменяется. Так, СКО С α -атомов консервативного СФ составляет < 1 Å после оптимизации.

В результате проведенного анализа было выявлено 16 остатков AgTx2 и 11 остатков канала KcsA-K_v1.3, образующих контакты (Рисунок 28). Остатки токсина, участвующие во взаимодействиях, образуют бóльшую часть контактов за счет второго и третьего β -тяжей и α -спирали преимущественно с третьей субъединицей канала. Сеть взаимодействий сложна и включает в себя 12 гидрофобных контактов, 21 водородную и 7 ионных связей.

Поровый домен канала K_v1.3 обогащен анионными остатками, в то время как AgTx2 имеет 7 катионных и только 1 анионный остаток. Среди катионных остатков AgTx2, участвующих во взаимодействии с поровым доменом, остаток K27 играет особую роль как остаток, закупоривающий пору.

Взаимодействие остатка K27 с порой является идентичным для комплексов AgTx2 с родственными K_V1-каналами. Это экспериментально *in vitro* показано для комплекса с каналом Shaker [23], K_V1.3 [24], а также *in silico* для K_V1.6-канала [21]. Предполагается, что сила взаимодействия остатка K27 с селективным фильтром канала характеризует стабильность образуемого комплекса [25]. В случае комплекса AgTx2 с каналом KcsA-K_V1.3 K27 образует водородные связи со всеми 4 остатками Y78 селективного фильтра.

Значительный вклад в образование водородных связей также вносят остатки токсина T9 и R31. За образование гидрофобных контактов отвечают остатки S11, P12, I15, F25, M29, P37. Взаимодействия остатков R24, F25, K27 и N30 являются ключевыми для образования комплекса с каналом K_V1.3, а также с каналами Shaker и K_V1.6 согласно результатам лабораторных и вычислительных экспериментов [21–24]. Эти остатки могут рассматриваться как основа высокой аффинности AgTx2 к каналам Shaker и K_V1.X (X= 1,3,6).

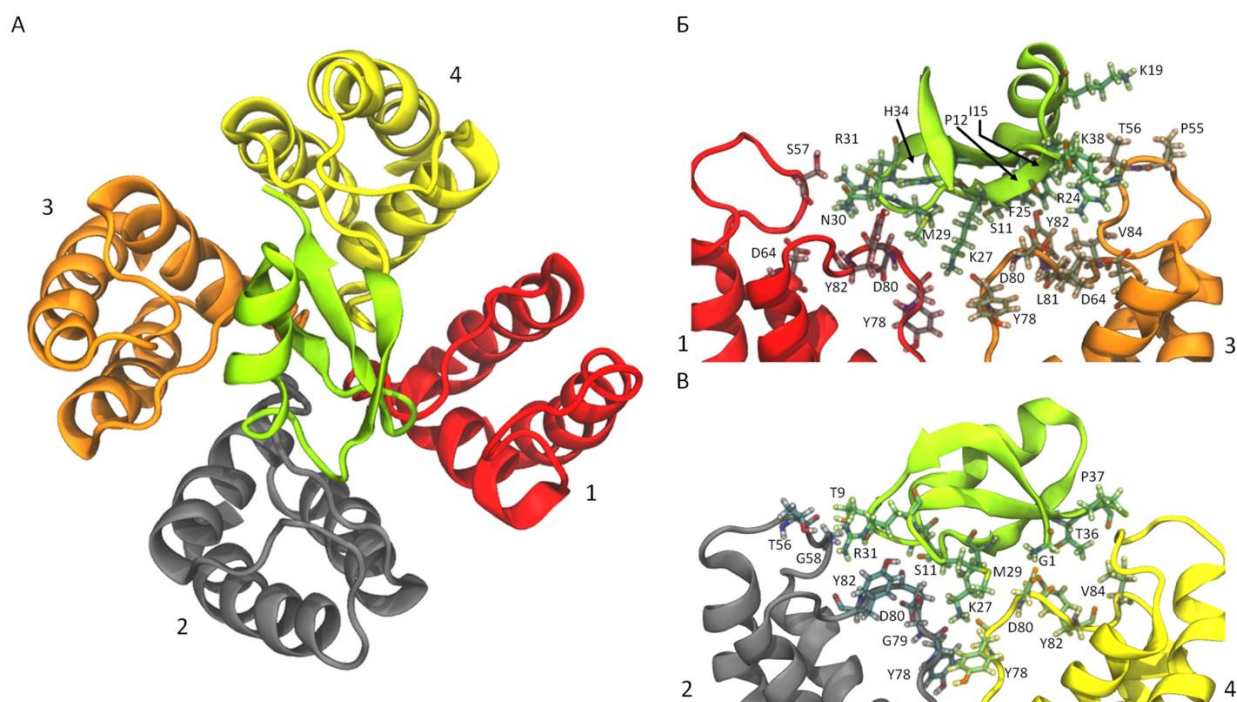


Рисунок 28. Модель комплекса гибридного канала KcsA-K_V1.3 с AgTx2: вид сверху (А) и сбоку (Б, В). Боковые цепи субъединиц канала и токсина показаны в спиральном представлении. Номера субъединиц указаны арабскими цифрами. Вид сбоку показан без передней и задней субъединиц для удобства восприятия.

3.3.1.2. Детальный анализ структур комплексов каналов K_v1.6 и KcsA-K_v1.6 с пептидными блокаторами. Ряд вычислительных исследований последнего десятилетия был направлен на изучение связывания токсинов с ионными каналами [248, 327]. Для выявления механизма распознавания пептидными блокаторами канала K_v1.6 нами были получены и охарактеризованы молекулярные модели комплексов эукариотического канала K_v1.6 и гибридного канала KcsA-K_v1.6 и набором токсинов скорпионов: аджитоксином 2 (AgTx2), калиотоксином (КТх) и токсином OSK1 – с помощью комбинированных вычислительных подходов. Такой подход позволил оценить различия между моделированием процесса связывания блокаторов с нативным калиевым каналом и с выделенным внеклеточным сайтом связывания, что необходимо для доказательства возможности экстраполяции результатов, полученных при изучении комплексов с KcsA-K_v1.6 каналом, на эукариотический канал K_v1.6. Конструирование комплексов с набором гомологичных токсинов позволяет оценить структурные основы аффинности и селективности связывания, сделать предположения о возможных сайтах введения мутаций для изменения функционирования каналов.

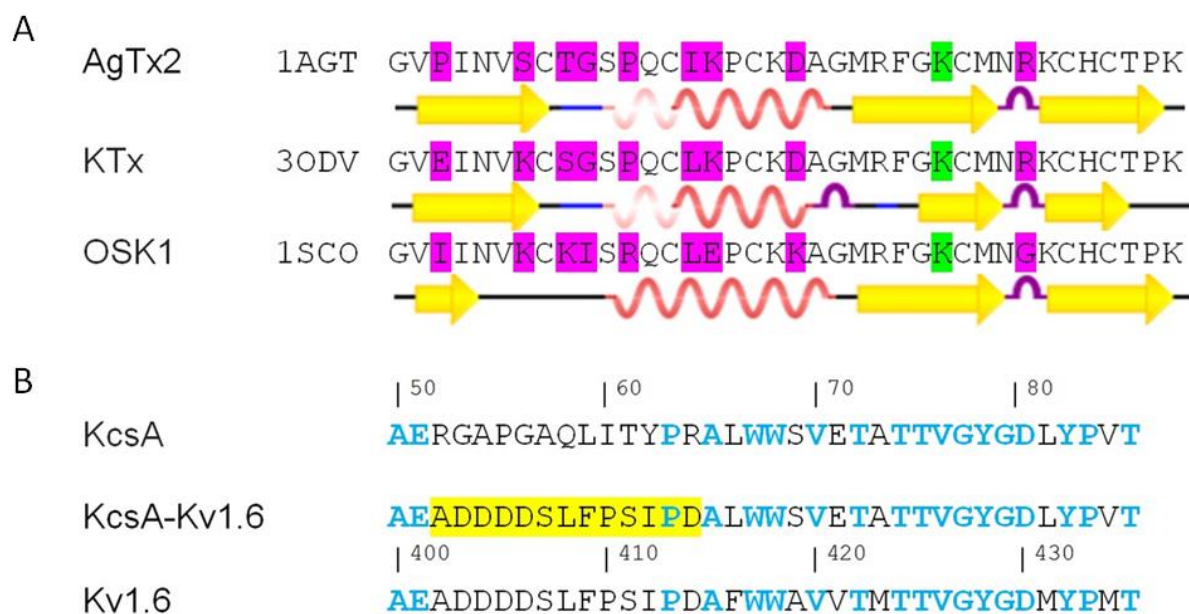


Рисунок 29. А – Выравнивание последовательностей и элементов вторичной структуры токсинов AgTx2, KTx, OSK1 в соответствии с PDB-файлами 1AGT, 3ODV и 1SCO. Вариабельные аминокислоты отмечены пурпурным. Блокатор поры K27 отмечен зеленым. Красные и светло-красные волнистые линии обозначают α -спирали и 3/10-спирали, соответственно, фиолетовые мостики - повороты, синие линии - изгибы, желтые стрелки - β -структуры, черные линии – неупорядоченные вторичные структуры. В – Выравнивание аминокислотных последовательностей Р-петель каналов KcsA, KcsA-Kv1.6 и Kv1.6. Желтый цвет обозначает последовательность, перенесенную из Kv1.6 в KcsA для формирования канала KcsA-Kv1.6. Остатки, идентичные в Kv1.6 и KcsA, отмечены синим.

Применение метода моделирования по гомологии для конструирования моделей комплексов каналов Kv1.6 и KcsA-Kv1.6 с пептидными блокаторами по шаблону экспериментально полученной структуры комплекса гибридного канала Kv1.2-2.1 с харибдотоксином (PDB код 4JTA) обусловлено высоким уровнем гомологии между поровыми доменами каналов Kv1.2-2.1 и Kv1.6, Kv1.2-2.1 (Kv1.2) и KcsA-Kv1.6: 92% и 42%; и среди пептидных токсинов: идентичность между аминокислотными последовательностями харибдотоксина и AgTx2, OSK1, KTx составляет 45%, 39% и 39%, соответственно (Рисунок 29). Подобные уровни гомологии отвечают условию проведения моделирования по гомологии, заключающемуся в обеспечении 30%

уровня гомологии последовательностей таргетной молекулы и молекулы-шаблона для достоверного построения трехмерной структуры [328, 329].

Общий вид структуры комплексов поровых доменов KcsA-K_V1.6 (K_V1.6) каналов с поровыми блокаторами консервативен в ряду комплексов K_V1.X (X=1, 3, 6) каналов. Предполагается, что высокое значение отрицательного заряда KcsA-K_V1.6 (K_V1.6) канала (-24) по сравнению с зарядом K_V1.1 (-20), K_V1.2 (-16) и K_V1.3 (-16) каналов повышает эффективность распознавания K_V1.6 на плазматической мембране катионными пептидными блокаторами [321].

Согласно расчетам МД AgTx2, KTx и OSK1 сохраняют свою исходную структуру в комплексе с KcsA-K_V1.6 и K_V1.6 каналами (Рисунок 30-32). При оптимизации комплексов в МД экспериментах структура селективного фильтра канала KcsA-K_V1.6 (K_V1.6) не претерпевала значительных изменений (СКО С α -атомов = 1 Å), тогда как структура Р-петель менялась в большей степени (СКО С α -атомов = 2,5 Å). Подобно каналам K_V1.X (x = 1-3), селективный фильтр K_V1.6 (KcsA-K_V1.6) является очень консервативной и жесткой областью. Р-петли способны гораздо более эффективно перестраиваться для различных взаимодействий с остатками токсинов. В изученных комплексах Р-петля первой субъединицы имеет наибольшую подвижность, что можно объяснить наименьшим числом связей, образованных между первой субъединицей и токсинами.

Расчеты молекулярной динамики показали, что AgTx2 и KTx релаксируют в комплексе с K_V1.6 (KcsA-K_V1.6) каналом к исходной ориентации харибдотоксина в структуре 4JTA, в то время как OSK1 поворачивается на -5° в плоскости, перпендикулярной к оси канала. В процессе МД СКО С α -атомов токсинов в предпочтительной ориентации составляет примерно 0,5 Å. В уравновешенных комплексах поверхность взаимодействия формируется вторым и, частично, третьим β -тяжем токсинов и плато порового домена канала, в то время как α -спираль и первый β -тяж

токсинов отдален от поры канала. Второй β -тяж токсинов расположен практически параллельно к плато порового домена и образует гидрофобные контакты (F25, M29) с аминокислотными остатками вокруг поры канала. K27 второго β -тяжа токсинов предотвращает поток ионов сквозь пору, что является важной общей чертой комплексов токсинов скорпиона с каналами $K_v1.X$. Токсины ассиметрично связываются с поровым доменом канала: α -спиральная сторона токсинов касается р-петель, окружающих плато канала, тогда как противоположная сторона токсинов (область первого β -тяжа) далека от границы плато (Рисунок 30-32).

Комплексы стабилизируются разнообразными взаимодействиями 15-19 аминокислотных остатков AgTx2, KTx и OSK1 с 10 остатками канала. Все субъединицы канала вовлечены в формирование комплексов с блокаторами, но в разной степени: в случае AgTx2 и KTx доминируют взаимодействия с 3 субъединицей, токсин OSK1 формирует значительное число контактов с 3 и 4 субъединицей (Таблица 4-6).

Таблица 4. Взаимодействия аминокислотных остатков токсина AgTx2 с калиевыми каналами KcsA-K_v1.6 и K_v1.6.

А. о. AgTx2	А. о. KcsA-K _v 1.6 канала	А. о. K _v 1.6 канала
G1	D80(4):HB * Y82(3):HB *	G426(3):HB D427(3):HB * Y429(3):HB *
V2	L58(3):HPC *	L405(3):HPC *
T9	Y78(2):HB	D427(3):HB
S11	G79(2):HB * D80(2):HB Y82(3):HB	G426(2):HB * Y429(3):HB *
P12	Y82(3):HPC V84(3):HPC	слабые взаимодействия
I15	L58(3):HPC * Y82(3):HPC * V84(3):HPC *	L405(3):HPC * Y429(3):HPC * M431(3):HPC *
K19	D55(3):HB, ION *	D402(3):ION * L405(3):HPC
R24	L58(3):HPC * D64(3):HB, ION *	L405(3):HPC * D411(3):HB, ION * M428(3):HPC
F25	L58(3):HPC * D80(3):HPC * L81(3):HPC * Y82(3,4):HPC *	L405(3):HPC * D427(3):HPC * M428(3):HPC * Y429(3):HPC * M431(3):HPC
G26	Y82(3):HB	нет взаимодействий
K27	Y78(1, 2, 3, 4):HB *	Y425(1, 2, 3, 4):HB *
C28	Y82(2):HB *	Y429(2):HB *
M29	G79(4):HPC * D80(4):HPC * Y82(1):HPC *	G426(4):HPC * D427(3):HPC * Y429(1):HPC, HB *
N30	G79(1):HB D80(1):HB *	D427(4):HB * Y429(4):HB
R31	D55(2):ION D56(2):HB, ION * D64(1):ION *	D403(2):ION * D411(1):ION *
T36	D80(3):HB * Y78(4):HB	D427(3):HB * Y429(3):HPC
P37	L58(4):HPC * V84(3):HPC *	L405(3):HPC * Y429(3):HPC M431(1):HPC *
K38	D64(3):ION	нет взаимодействий

HB – водородная связь, HPC – гидрофобный контакт, ION – ионная связь. Номер субъединицы канала показан в круглых скобках. Звездочками отмечены взаимодействия, которые воспроизводятся для обоих каналов. Взаимодействия, одинаковые во всех комплексах изучаемых токсинов с K_v1.6 и KcsA-K_v1.6 каналами, выделены жирным шрифтом.

Таблица 5. Взаимодействия аминокислотных остатков токсина KTx с калиевыми каналами KcsA-Kv1.6 и Kv1.6.

А. о. KTx	А. о. KcsA-Kv1.6 канала	А. о. Kv1.6 канала
G1	G79(4):HB * D80(4):HB, ION * Y82(3):HB *	G426(4):HB * D427(4):HB * Y429(3):HB *
V2	L58(4):HPC *	L405(3):HPC *
S11	G79(2):HB * D80(2):HB *	Y425(2):HB G426(2):HB * D427(2):HB *
P12	L58(3):HPC	M428(3):HPC
L15	L58(3):HPC * Y82(3):HPC * V84(3):HPC *	L405(3):HPC * Y429(3):HPC * M431(3):HPC *
K19	D55(3):HB, ION D56(3):ION *	D403(3):ION *
R24	D56(3):ION * L58(3):HPC * D64(3):ION *	D403(3):HB, ION* L405(3):HPC * D411(3):ION *
F25	L58(3):HPC * P60(3):HPC * D80(3):HPC * L81(3):HPC * Y82(3):HPC *	L405(3):HPC * P407(3):HPC * D427(3):HPC * M428(3):HPC * Y429(3):HPC *
G26	Y82(3):HPC, HB *	Y429(3):HPC, HB *
K27	Y78(1, 2, 3, 4): HPC, HB*	Y425(1, 2, 3, 4):HB *
C28	Y82(2):HB	нет взаимодействий
M29	G79(4):HPC * D80(4):HPC * Y82(1):HPC *	G426(4):HPC * D427(4):HPC * Y429(1):HPC *
N30	G79(1):HPC D80(1):HB *	D427(1): HB *
R31	D56(2):HB, ION * D64(1):ION D80(1):ION	D403(2):HB, ION *
T36	D80(3):HPC, HB * Y82(4):HPC, HB * V84(3):HPC	D427(3):HPC, HB * Y429(4):HPC, HB *
P37	L58(3):HPC * Y82(4):HPC V84(3):HPC *	L405(3):HPC * M431(3):HPC *
K38	D64(3):ION *	нет взаимодействий

Обозначения соответствуют Таблице 4.

Таблица 6. Взаимодействия аминокислотных остатков токсина OSK1 с калиевыми каналами KcsA-Kv1.6 и Kv1.6.

А. о. OSK1	А. о. KcsA-Kv1.6 канала	А. о. Kv1.6 канала
G1	D80(4):ION	D403(4):ION
I3	w.i.	L405(4):HPC
K7	D56(2):HB, ION *	D403(2):ION *
C8	L58(1):HPC	нет взаимодействий
K9	D55(2):HB, ION *	D402(2):HB, ION * D403(2):ION L405(4):HPC
I10	w.i.	L405(2):HPC
S11	D80(2):HB *	D427(2):HB * Y429(2):HB
R12	D56(3):HB, ION *	D403(3):HB, ION *
L15	L58(3):HPC * Y82(3):HPC * V84(3):HPC *	D403(3):HPC L405(3):HPC * Y429(3):HPC * M431(3):HPC *
K19	D56(3):HB, ION * L58(3):HPC	D402(3):HB, ION D403(3):HB, ION *
R24	L58(4):HPC * D64(4):HB, ION * D80(4):HB, ION	L405(4):HPC * D411(4):HB, ION *
F25	G79(3):HPC D80(3):HPC * L81(3):HPC * Y82(4):HPC *	G426(3,4):HPC * D427(3):HPC * M428(3,4):HPC * Y429(3,4):HPC *
K27	Y78(1,2,3,4):HB *	Y425(1,2,3,4):HB *
C28	Y82(2):HB, HPC	нет взаимодействий
M29	G79(1):HPC D80(4):HPC * Y82(1):HPC *	D427(4):HPC * Y429(1,4):HPC *
N30	D80(1):HB * Y82(1):HB *	D427(1):HB * Y429(1):HB *
K32	D56(1):ION * Y82(1):HPC, HB *	D403(1):ION * Y429(1):HB *
H34	G79(4):HB D80(4):HB * Y82(4):HPC *	L405(4):HPC G426(4):HPC * D427(4):HPC, HB * Y429(4):HPC *
T36	L58(3):HPC * Y82(4):HPC *	L405(4):HPC * Y429(4):HPC * M431(4):HPC
P37	L58(4):HPC	L405(4):HPC *
K38	V84(4):HPC	нет взаимодействий

Обозначения соответствуют Таблице 4.

Взаимодействия канала K_v1.6 с токсинами: интерфейсы канала

Аминокислотные остатки канала, которые взаимодействуют с AgTx2, KTx и OSK1, формируют два основных кластера (Рисунок 30-32). Первый кластер расположен на Р-петле и включает три остатка: D402, D403, L405 (соответствует D55, D56, L58 в гибридном канале KcsA-K_v1.6) в комплексах с AgTx2 и OSK1. Второй кластер взаимодействующих остатков включает остатки Y425 и G426 (Y78, G79) в селективном фильтре и 4 последующих остатка (D427, M428, Y429, M431 в канале K_v1.6; D80, L81, Y82, V84 в гибридном канале KcsA-K_v1.6), формирующих плато вокруг поры канала. Остаток поровой спирали (D411; D64) так же участвует в образовании комплексов с токсинами.

Результаты исследования показывают схожесть интерфейсов взаимодействия каналов KcsA-K_v1.6 и K_v1.6. KcsA-K_v1.6 воспроизводит набор контактов, образуемых остатками L405, D427 и Y429 в комплексе канала K_v1.6 с изучаемыми токсинами, конкретные связи остатка D403 в комплексе с токсином OSK1 и определенное число связей с токсинами остатков D402, D411, M428 и M431. В то же время инвариантные взаимодействия этих остатков дополняются дополнительными связями, которые варьируются в комплексах каналов KcsA-K_v1.6 и K_v1.6. В целом молекулярное моделирование предсказывает, что 81, 77 и 75% связей в комплексах (KcsA-K_v1.6)-AgTx2, (KcsA-K_v1.6)-KTx и (KcsA-K_v1.6)-OSK1 являются такими же, как в комплексах K_v1.6-AgTx2, K_v1.6-KTx и K_v1.6-OSK1 соответственно. И наоборот, 72, 93 и 73% связей в комплексах K_v1.6-AgTx2, K_v1.6-KTx и K_v1.6-OSK1 такие, как в (KcsA-K_v1.6)-AgTx2, (KcsA-K_v1.6)-KTx и (KcsA-K_v1.6)-OSK1 (Таблица 4-6). Высокий уровень воспроизводимости образуемых контактов доказывает возможность использования модели гибридного канала KcsA-K_v1 для исследования процесса связывания блокаторов соответствующим нативным каналом K_v1.

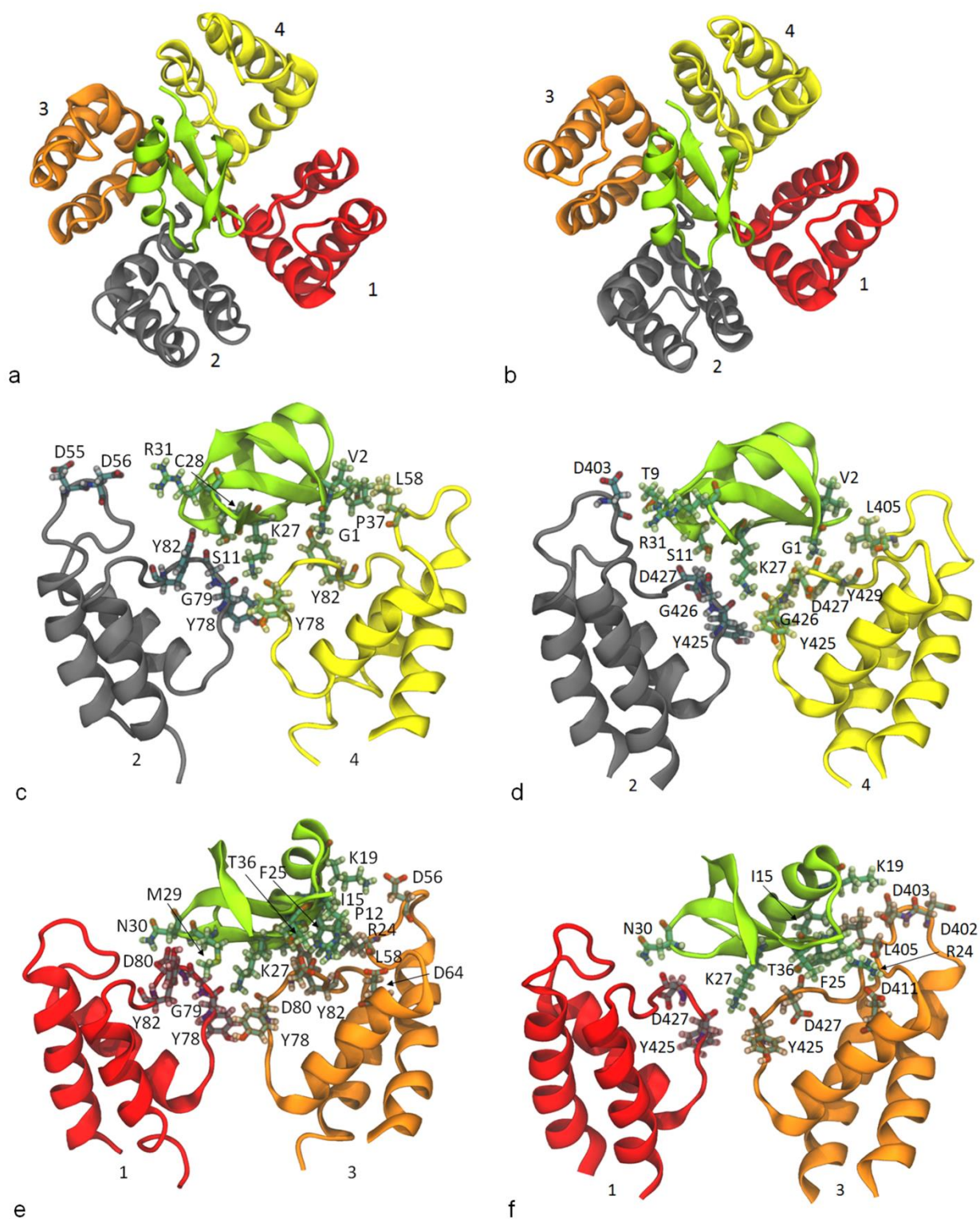


Рисунок 30. Модель комплекса гибридного канала KcsA-Kv1.6 (a, c, e) и Kv1.6 (b, d, f) с AgTx2: вид сверху (a, b) и сбоку (c-f). Боковые цепи субъединиц канала (красный, серый, оранжевый и желтый) и токсина (зеленый) показаны в ленточном представлении. Номера субъединиц указаны арабскими цифрами. Вид сбоку показан без передней и задней субъединиц для удобства восприятия. В панелях c-f боковые цепи взаимодействующих остатков показаны в стержневом представлении [321].

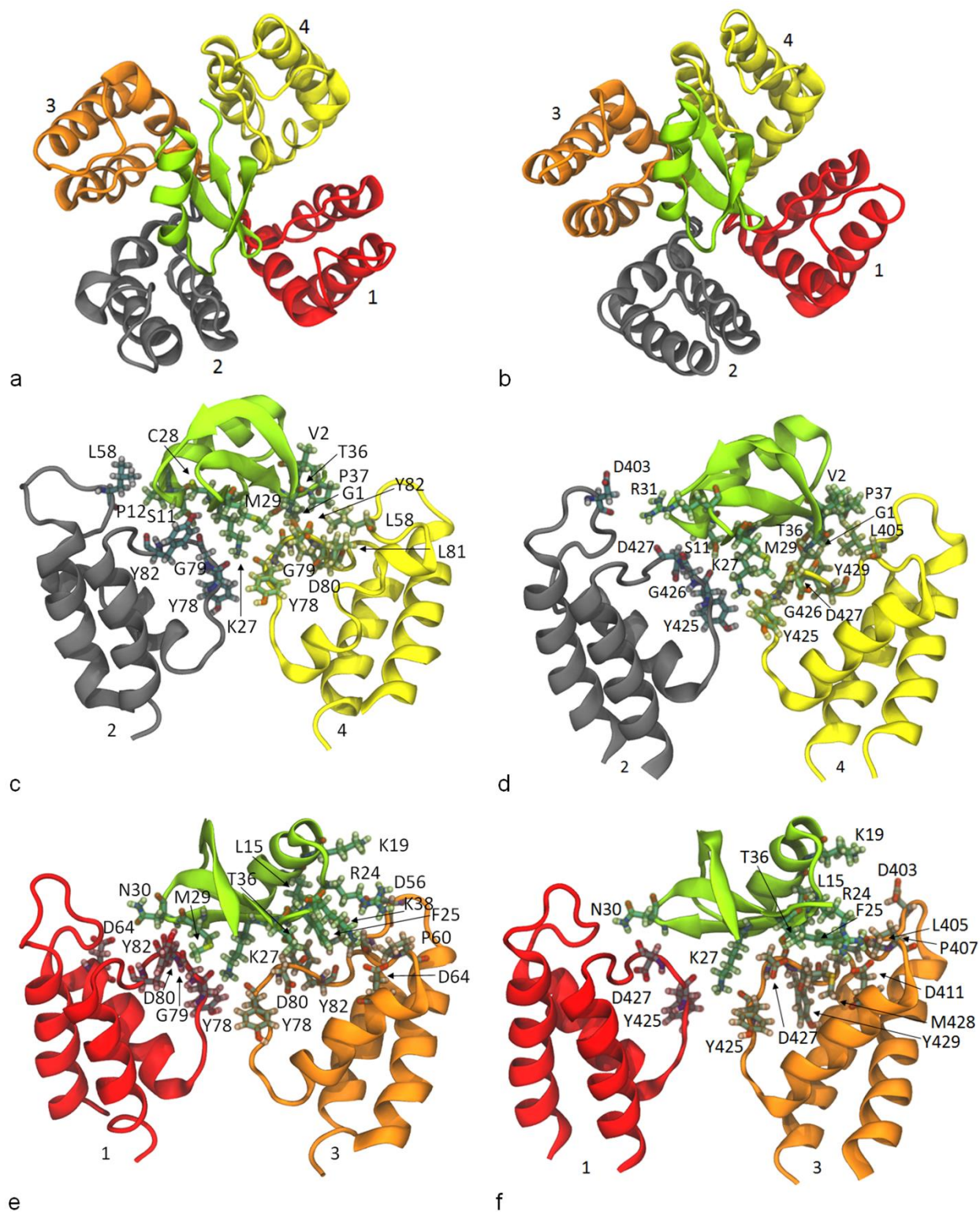


Рисунок 31. Модель комплекса гибридного канала *KcsA-Kv1.6* (a, c, e) и *Kv1.6* (b, d, f) с *KTx*: вид сверху (a, b) и сбоку (c-f) [321]. Обозначения соответствуют рисунку 6.

Среди взаимодействующих остатков канала K_V1.6, остатки D402, D403, L405 и P407, расположенные на Р-петле, и остаток Y429 могут быть ответственны за специфическую модуляцию связывания пептидного блокатора, поскольку являются наиболее вариабельным участком в основной консервативной последовательности каналов K_V1.X (X=1-3). Остаток P407 канала K_V1.6 присутствует в K_V1.2, но не в K_V1.1 и K_V1.3. Остаток D403 отличает последовательность канала K_V1.6 от K_V1.3 и частично от K_V1.1 и K_V1.2, у которых эти сайты заняты гомологичными остатками глутаминовой кислоты. Y429 канала K_V1.6 представлен в K_V1.1, но не в K_V1.2 и K_V1.3 (Рисунок 29).

Как было ранее отмечено, остатки L405 (L58) и Y429 (Y82) образуют две группы взаимодействий. Остаток L405 (L58) формирует разнообразные гидрофобные контакты со всеми изучаемыми токсинами. От пяти до восьми остатков токсинов взаимодействуют с остатком L405 (L58). Среди них есть как вариабельные, так и консервативные остатки токсинов L(I)15 и R24. В комплексах с AgTx2 и KTx, остаток L405 (L58) третьей субъединицы образует наибольшее число гидрофобных контактов по сравнению с остатком L405 (L58) других субъединиц. Остатки L405 (L58) субъединиц 3 и 4 вовлечены в образование комплекса с токсином OSK1. Набор гидрофобных контактов Р-петли является характерной чертой комплексов каналов K_V1.6 (KcsA-K_V1.6).

Остаток Y429 (Y82) образует набор гидрофобных контактов и водородных связей с 6-8 аминокислотными остатками токсинов. Остатки Y429 (Y82) всех субъединиц вовлечены в связывание токсинов, однако участие субъединицы 3 превалирует в случае комплекса с AgTx2. Консервативные остатки L(I)15, M29 и T36, а также ряд вариабельных остатков взаимодействуют с остатком Y429 (Y82).

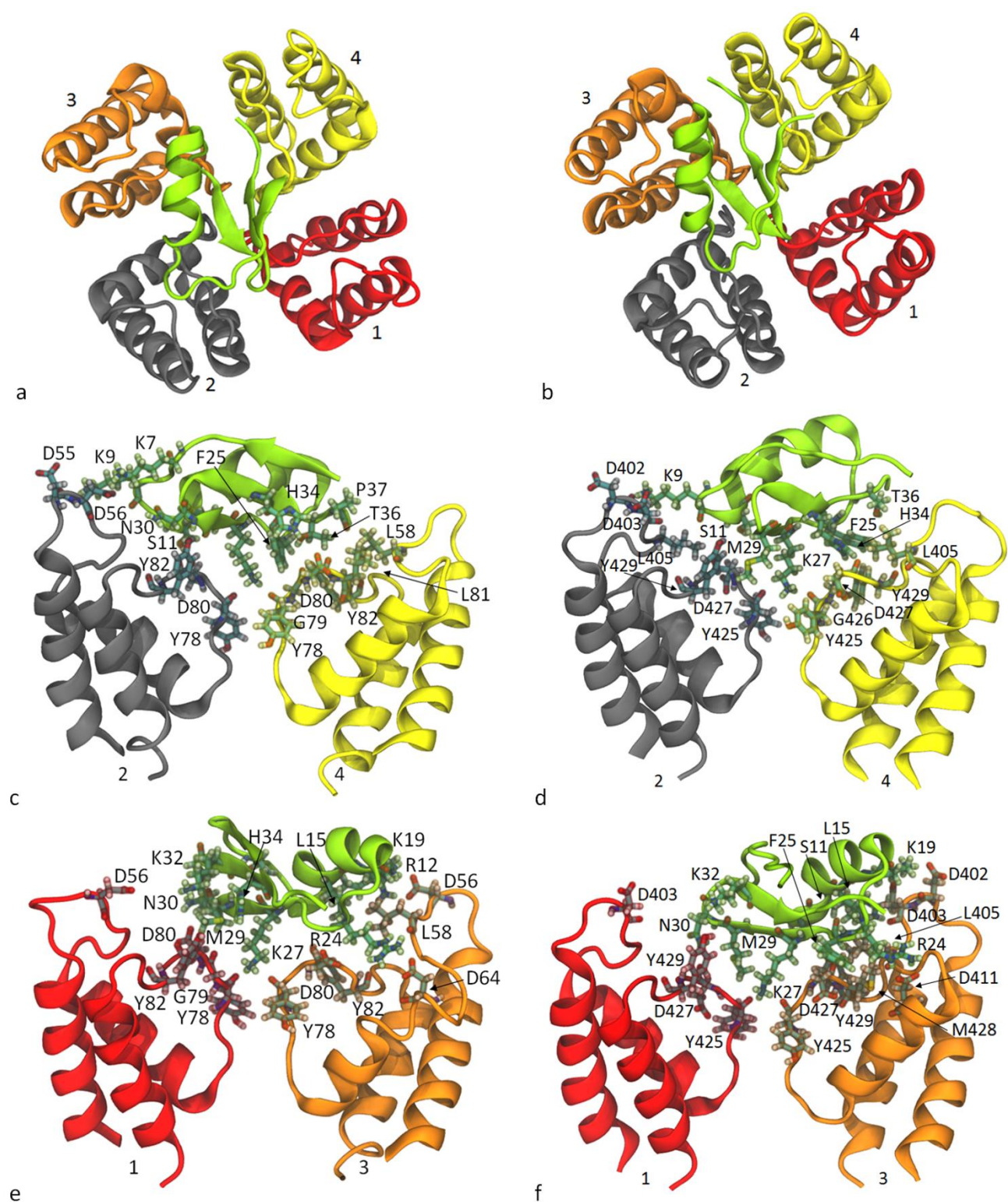


Рисунок 32. Модель комплекса гибридного канала KcsA-Kv1.6 (a, c, e) и нативного канала Kv1.6 (b, d, f) с OSK1: вид сверху (a, b) и сбоку (c-f) [321]. Обозначения соответствуют рисунку 6.

Ионные и водородные связи, образуемые остатком D402 (D55), обнаружены во всех комплексах, кроме КТх-K_V1.6. Разнообразные солевые мостики и водородные связи остатка D403 (D56) являются характерной чертой комплекса с токсином OSK1. И наоборот, участие остатка D403 (D56) в стабилизации комплексов с КТх и AgTx2 значительно ниже. Связь остатка P407 (P60) была выявлена только в комплексе с токсином КТх. Очевидно, что структурные различия пептидов приводят к многочисленным особенностям их взаимодействия с каналом-специфическими остатками.

Остатки D411, Y425, G426, D427 и M428 канала K_V1.6 являются консервативными в ряду K_V1.X (X = 1-3) каналов и проявляют заметный консерватизм во взаимодействиях с токсинами. Хотя по-прежнему существуют пробелы в понимании структуры комплексов каналов K_V1.X (X = 1-3) с токсинами AgTx2, КТх и OSK1, опубликованные данные поддерживают это утверждение. Остаток D411 образует ионную связь с катионным остатком R24 токсинов AgTx2, КТх и OSK1, как и его аналог (D381) в комплексе с K_V1.3-AgTx2 [330]. Роль остатка Y425 совпадает с ролью аналогичного остатка тирозина в каналах K_V1.X (X = 1-3) [285, 331, 332], а именно: связывать остаток K27 токсина, который закупоривает поры канала. Остаток G426 участвует во взаимодействиях с AgTx2, КТх и OSK1, его аналог (G396) в K_V1.3 также связан с S11 AgTx2 [330]. Остаток D427 образует водородную связь с остатком N30 и дополнительные связи с остатками G1, T9 и T36 (Таблица 4-6). Аналогичное взаимодействие (D375-N30) обнаружено в кристаллографической структуре комплекса канала K_V1.2 с харибдотоксином [87] и предсказано для комплекса K_V1.3 канала с токсином КТх (D402-N30) [333]. Гидрофобный контакт остатка M428 с инвариантным остатком F25 воспроизводится в комплексе K_V1.3-AgTx2 [330].

Для комплексов нескольких токсинов с каналами K_V1.2-2.1 [87], K_V1.1 [334], K_V1.2 [207] и K_V1.3 [330,331,333] было сделано заключение, что остатки Y425, G426 и D427 выступают в качестве якоря на поверхности канала

для связывания токсинов (Таблица 4-6). Наши данные позволяют распространить этот вывод на комплексы канала K_v1.6. Но, несмотря на консерватизм, остатки Y425, G426, D427, по-видимому, недостаточны для связывания токсинов, поскольку канал KcsA, в котором они присутствуют в аналогичных положениях, не связывает пептидные поровые блокаторы. Мутация R64D (аналогичная D411 в K_v1.6) требуется для передачи свойства связывания токсина с KcsA [335]. Поэтому остаток D411 вместе с остатками Y425, G426 и D427 следует рассматривать как базовую группу остатков для связывания токсинов с K_v1.X (X=1-3) и K_v1.6. В K_v1.6 помимо описанных выше связей остатков Y425 и D411, водородные и, что удивительно, гидрофобные контакты реализуются между остатком канала D427 и пятью (OSK1) или шестью (AgTx2, KTx) остатками токсинов. Остаток G426 образует либо только гидрофобные контакты (OSK1), либо как гидрофобные контакты, так и водородные связи (AgTx2, KTx) с тремя остатками токсинов.

Гипотеза о роли Р-петель каналов в подстраивании к структуре токсинов подтверждается анализом взаимодействий. В изученных комплексах Р-петля первой субъединицы образует наименьшее число контактов с токсинами и также демонстрирует наибольшую подвижность (Таблица 4-6).

Взаимодействия токсинов с каналом K_v1.6: интерфейсы токсинов

Роль гомологичных остатков токсина

AgTx2, KTx и OSK1, представители подсемейства α KTx3 токсинов скорпиона, являются высокогомологичными: 29 из 38 аминокислотных остатков являются инвариантными для всех трех пептидов, 34 остатка инвариантны для пары AgTx2 и KTx (Рисунок 30-32). В это же время, двенадцать инвариантных остатков не участвуют в связывании с каналами K_v1.6 (KcsA-K_v1.6). Предполагается, что их основная роль (одновременно с другими гомологичными остатками) заключается в поддержании характерной вторичной структуры, что важно для связывания как с каналами K_v1.6 (KcsA-

K_V1.6), так и с K_V1.X (X=1-3) [321]. Среди всех взаимодействующих остатков семь гомологичных аминокислотных остатков токсинов (L(I)15, R24, F25, K27, M29, N30, P37) формируют сеть взаимодействий, воспроизводимых во всех изучаемых комплексах и включающих одно ионное, разнообразные гидрофобные контакты и несколько водородных связей. Эта сеть устойчивого взаимодействия дополняется отдельными связями инвариантных остатков, которые варьируются в комплексах. В частности, остатки F25 и M29 участвуют в нескольких дополнительных взаимодействиях, которые различаются для комплексов с AgTx2, KTx и OSK1.

Пять остатков токсинов (L(I)15, R24, F25, K27 и M29) вносят наибольший вклад в создание сети контактов с каналом K_V1.6 (KcsA-K_V1.6), поскольку они образуют узлы взаимодействий (три и более связей) во всех комплексах, остаток H34 в OSK1 и остаток T в KTx создают специфические узлы взаимодействий (Рисунок 30-32).

В случае анализа только комплексов с AgTx2 и KTx, в список инвариантных остатков добавляются три дополнительных остатка (G1, V2, S11 и T36). Это расширенное сходство объясняется наибольшим уровнем идентичности и сходной ориентацией AgTx2 и KTx в сайте связывания канала K_V1.6 (KcsA-K_V1.6).

Большинство остатков токсинов, задействованных в образовании устойчивой сети взаимодействий, расположены на втором β-тяже, демонстрирующим 100% уровень идентичности среди изучаемых контактов и обеспечивающем обширный и плотный контакт с плато вокруг поры канала (Таблица 4-6). Предполагается, что устойчивая сеть взаимодействий, образованная инвариантными остатками, является основой комплексов AgTx2, KTx и OSK1 с K_V1.6 (KcsA-K_V1.6) каналом и, вероятно, с другими K_V1-каналами. В соответствии с этим предположением, роль остатков L15, R24, F25, K27, M29 и N30 в связывании KTx с K_V1.3 каналом была доказана экспериментально [306, 336–338] и с помощью метода молекулярного

докинга [339]. Молекулярное моделирование так же предсказывает, что остатки R24, F25, K27, M29 и N30 AgTx2 взаимодействуют с K_V1.3 каналом [330, 340] (Рисунок 28). Было показано, что мутации остатков R24, F25, K27, N30 и P37 значительно уменьшают связывание AgTx2 с каналом Shaker K⁺ Drosophila [337,341]. Теоретические функциональные карты комплексов OSK1 с каналами K_V1.X (X = 1-3) подчеркивают важность следующих взаимодействий: остатков R24, K27 и M29 с K_V1.1; остатков R24, F25, K27 и M29 с K_V1.2; остатков R24, F25, K27, M29 и N30 с K_V1.3 [210].

Участие переменных остатков токсинов в образовании комплексов с K_V1.6 каналом

Переменными аминокислотными остатками изучаемых токсинов являются 3, 7, 9 и частично, 15 для KTx по отношению к AgTx2, остатки 3, 7, 9, 10, 16, 20 и 31 для OSK1 против AgTx2 и KTx (Рисунок 29, Таблица 4-6).

Как было ранее отмечено, остатки P3/D3 и S7/K7 токсинов AgTx2/KTx не взаимодействуют с каналом K_V1.6 (KcsA-K_V1.6) (Рисунок 30, 31). Взаимодействия остатков I15/L15 AgTx2/KTx с K_V1.6 (KcsA-K_V1.6) практически идентичны. Остаток T9 AgTx2 образует водородную связь с каналом, тогда как остаток S9 KTx не участвует в связывании. Переменные остатки AgTx2 и KTx не вносят заметных различий в взаимодействия этих токсинов с каналом K_V1.6 (KcsA-K_V1.6). Это служит определенной причиной сходства аффинности AgTx2 и KTx к K_V1.6, обнаруженного с помощью исследований связывания с каналом KcsA-K_V1.6. Трехмерная структура, которая сохраняется в комплексах, и аналогичный репертуар связей, образованных гомологичными остатками, являются двумя существенными факторами, которые выравнивают взаимодействия AgTx2 и KTx с поровым доменом K_V1.6.

В случае OSK1, переменные остатки 16, 20 и 31 не участвуют во взаимодействиях с K_V1.6 (KcsA-K_V1.6) (Рисунок 32). Переменные остатки 3, 7, 9 и 10 способствуют взаимодействию за счет гидрофобных контактов

(остатки I3 и I10) или водородных и ионных связей (остатки K7 и K9) с остатками каналов. Это должно усилить связывание OSK1 с каналом по сравнению с AgTx2, обладающем невзаимодействующими остатками 3, 7 и 10. Однако обнаружены дополнительные существенные различия в связях, создаваемых этими токсинами, которые в конечном итоге приводят к чуть более слабой аффинности OSK1 к K_v1.6 каналу. В частности, остатки V2, G26 и R31 участвуют во взаимодействиях AgTx2, тогда как остатки C8, K32 и H34 участвуют в связывании OSK1.

Взаимодействия токсинов с остатком L405 (L45) канала K_v1.6

Как обсуждалось выше, гидрофобный сайт на P-петле, сформированный остатком L405 (L45), является характерной особенностью K_v1.6 (KcsA-K_v1.6) канала и распознается токсинами в процессе связывания (Рисунок 33). Пять-шесть аминокислотных остатков токсинов снижают неблагоприятное воздействие на связывание гидрофобных групп канала путем образования гидрофобных контактов с остатком L405 (L58). Контакты остатков I15 (L15), R24 и P37 воспроизводятся для всех токсинов. AgTx2 и KTx имеют дополнительные гидрофобные контакты остатков V2 и F25 с остатком L405 (L58). Гидрофобные контакты OSK1 с остатком L405 (L58) усиливаются за счет остатка T36, а также остатков C8 и K19 или K9 и I10 в случае KcsA-K_v1.6 или K_v1.6 соответственно.

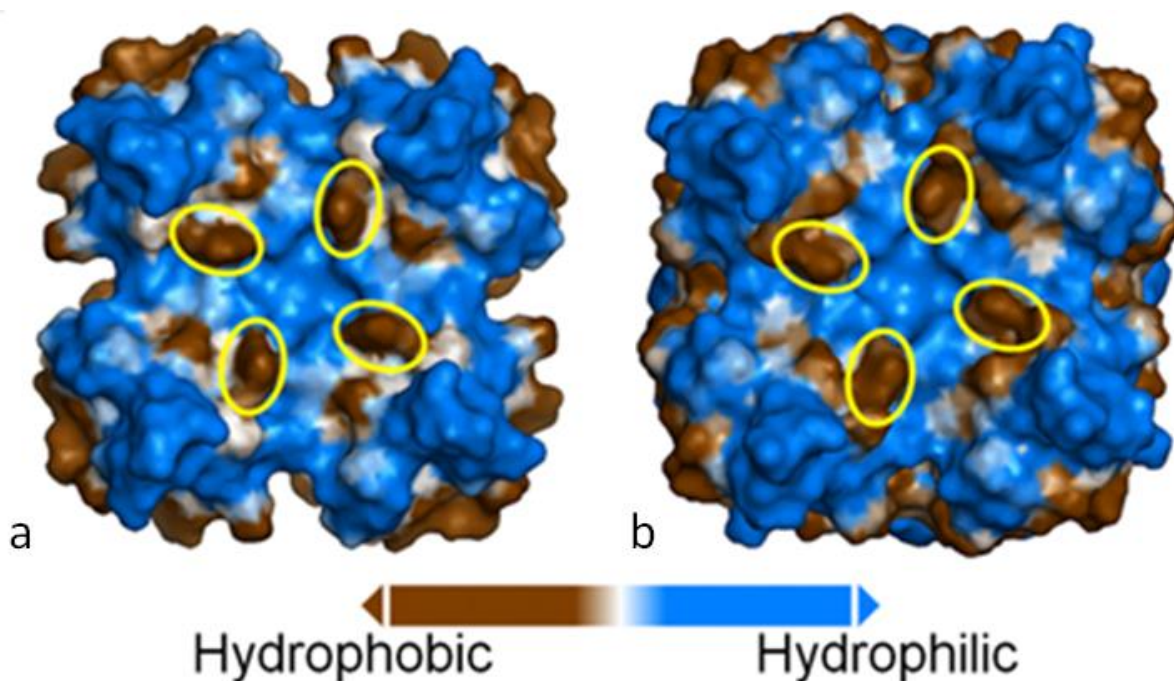


Рисунок 33. Структурные модели каналов KcsA-Kv1.6 (a) и Kv1.6 (b): вид сверху [321]. Распределение боковых цепей экспонированных гидрофобных (коричневого цвета) и гидрофильных (синего) остатков. Желтые овалы указывают характерные позиции аминокислотного остатка L405 (L58) в Р-петлях.

Взаимодействия токсинов с заряженными остатками канала Kv1.6

Положительно заряженные аминокислоты токсинов играют важную роль в их ориентации относительно каналов и последующим связывании. Токсины AgTx2, OSK1 и KTx имеют высокий положительный заряд (Таблица 2), что позволяет создавать эффективные ионные связи. По сравнению с наименее заряженным AgTx2, токсин OSK1 имеет две дополнительные катионные аминокислоты, тогда как KTx имеет один катионный и один анионный дополнительный остаток. Мы не обнаружили прямой связи между числом заряженных остатков и аффинностью связывания с каналами. Некоторые из заряженных аминокислот (включая переменные) не образуют связей с Kv1.6 (KcsA-Kv1.6): остатки K32 и K38 в AgTx2; остатки E3, K7 и K32 в KTx; остатки E16 и K20 в OSK1. Среди инвариантных катионных остатков K19 и особенно R24 и K27 участвуют в связывании во всех комплексах. Взаимодействие других заряженных аминокислот варьируется для изученных токсинов и иногда отличается для каналов Kv1.6 и

KcsA-K_v1.6. Ионные связи остатка R31 вносят вклад в особые взаимодействия AgTx2 и KTx с K_v1.6 и KcsA-K_v1.6 по сравнению с OSK1, который не имеет этого остатка. Остаток R24 KTx образует специфический солевой мостик в дополнение к инвариантному. Остатки K7, K9, R12 и K32 OSK1 образуют набор отличительных ионных связей с аспартатами D-массива K_v1.6 (KcsA-K_v1.6) канала (Рисунок 30-32, Таблица 4-6).

Как обсуждалось выше, D-массив является характерной особенностью K_v1.6 (KcsA-K_v1.6) канала, узнаваемой катионными аминокислотами изученных токсинов, которые образуют ионные и водородные связи с остатками D402 (D55) и D403 (D56). Это распознавание наиболее выражено для OSK1, в котором пять катионных остатков образуют расширенный набор взаимодействий с остатками D402 (D55) и D403 (D56). Два и три катионных остатка взаимодействуют с этими аспартатами в случае токсинов AgTx2 и KTx соответственно.

Семь (восемь) из десяти заряженных остатков OSK1 участвуют в комплексообразовании с K_v1.6 (KcsA-K_v1.6), а число ионных связей является самым высоким в этих комплексах по сравнению с комплексами с AgTx2 и KTx (Таблица 4-6). AgTx2 образует наименьшее число ионных связей в комплексах, но его сродство несколько выше, чем у OSK1. По всей видимости, аффинность связывания токсинов с K_v1.6 (KcsA-K_v1.6) каналом определяется всей совокупностью образующихся контактов: гидрофобными контактами, водородными и ионными связями.

3.3.1.3. Детальное описание связывания нативной и мутантных форм аджитоксина 2 с каналом KcsA-K_v1.1. Модель комплекса канала KcsA-K_v1.1 с AgTx2 была построена с помощью стандартной методики, описанной в разделе Материалы и методы. Новшеством по сравнению со стандартным протоколом стало использование двух алгоритмов расчетов МД. В первом случае, C α -атомы аминокислотных остатков трансмембранных спиралей были заморожены для симуляции мембранного окружения. Эволюцию структуры

комплекса оценивали за счет расчета СКО С α -атомов в каждом кадре МД. Значения СКО достигли плато после первой наносекунды при общей длине траектории МД 5 нс.

При реализации расчетов МД по второму алгоритму, во время моделирования МД (5 нс) все С α -атомы комплекса канала с токсином были заморожены, за исключением С α -атомов Р-петель, чтобы достичь окончательной адаптации наиболее подвижных Р-петель к токсину в комплексе. В течение следующих 5 нс МД проводили с замороженными С α -атомами остатков трансмембранных спиралей.

Для сравнения структур комплексов, полученных с помощью двух алгоритмов МД, они были усреднены по 70 выбранным кадрам, взятым из уравновешенных частей соответствующих траекторий МД. Было обнаружено, что эти структуры не имеют заметных различий (СКО С α -атомов Р-петель < 1,6 Å). В частности, был обнаружен поворот AgTx2 на угол +5° относительно его начальной ориентации в комплексе. Заметим, что харибдотоксин не изменял ориентацию в комплексе с K_v1.2-2.1 во время аналогичного моделирования МД (данные не показаны), а AgTx2 не поворачивался в комплексах с K_v1.6 и KcsA-K_v1.6 [321]. Этот поворот токсина, по-видимому, является характерным для взаимодействия AgTx2 с сайтом связывания K_v1.1 канала.

В уравновешенном комплексе AgTx2 связывается с плато, образованным субъединицами канала вокруг поры канала и окруженным четырьмя башенками Р-петель. Вторичная структура AgTx2 не меняется в комплексе по сравнению со свободным состоянием (СКО С α -атомов < 1,5 Å). С течением времени при расчете МД (3 нс) структура канала адаптируется к положению токсина в большей степени за счет изменения конформации Р-петель, тогда как структура поровых спиралей, СФ и петель D80-T85 остается неизменной. Так, СКО С α -атомов высоко консервативного СФ

(последовательность TVGYG) равно 1 Å после оптимизации структуры комплекса.

Оценка возникающих взаимодействий выполнена согласно процедуре, описанной в Материалах и Методах. Результаты анализа показали, что интерфейс взаимодействия формируется 13 остатками токсина AgTx2 и 8 остатками канала KcsA-K_v1.1 (Таблица 7, Рисунок 34). Вовлечение субъединиц канала во взаимодействие с AgTx2 заметно отличается: третья и первая субъединицы образуют наибольшее и наименьшее число связей с токсином соответственно. Номер 3 присваивается субъединице, имеющей доминирующие взаимодействия с α -спиралью AgTx2, нумерация идет по часовой стрелке при взгляде с внеклеточной стороны. Остатки токсина, которые участвуют в образовании комплекса, концентрируются на втором и третьем β -тяже и присутствуют (в меньшей степени) в других частях молекулы. Сеть взаимодействий сложна и включает в себя шесть ионных связей, пятнадцать водородных связей, четыре гидрофобных контакта и стэкинг взаимодействие.

Таблица 7. Взаимодействия токсина AgTx2 с калиевыми каналами KcsA- Kv1.X (X=1, 3, 6) и каналом Kv1.6.

А. о. токсина	А.о. канала KcsA-Kv1.1 в комплексе с			А. о. канала KcsA- Kv1.3 в комплексе с AgTx2	А. о. KcsA-Kv1.6 канала в комплексе с AgTx2	А. о. Kv1.6 канала в комплексе с AgTx2
	AgTx2	AgTx2(R31G)	AgTx2(H34K)			
11	D80(3)*:ION=0.2 Y82(4):HB=0.7	D80(3):ION=0.1 D80(4):ION=0.1	D80(4):HB=0.4 , ION=0.2	D80(4):HB, ION**	Y82(3):HB	G426(3):HB D427(3):HB Y429(3):HB
V2					L58(3):HPC	L405(3):HPC
T9	H58(2):HB=0.4	E56(2):HB=1.0 H58(2):HB=0.9	E56(2):HB=0.5 H58(2):HB=0.8 Y82(2):HB=0.5	T56(2):HB G58(2):HB Y82(2):HB	Y78(2):HB	D427(3):HB
S11	G79(2):HB=0.9	G79(2):HB=0.4 D80(2):HB=0.6	G79(2):HB=0.9	G79(2):HB D80(2):HPC, HB Y82(3):HPC	G79(2):HB Y82(3):HB	G426(2):HB
P12				Y82(3):HPC V84(3):HPC	Y82(3):HPC V84(3):HPC	
I15	H58(3):HPC=3.1		Y82(3):HPC=4.1	Y82(3):HPC V84(3):HPC	L58(3):HPC Y82(3):HPC V84(3):HPC	L405(3):HPC Y429(3):HPC M431(3):HPC
K16	E56(3):HB=0.3, ION=0.1					
K19	E56(3):HB=0.3, ION=0.2	E56(3):HB=0.3 , ION=0.1		P55(3):HB	D55(3):HB, ION	D402(3):ION L405(3):HPC
R24	D64(3): ION=0.2 D80(3):HB=0.8, ION=0.2	E56(4):ION=0.1 D64 (3):HB=0.3, ION=0.2 D80(3):ION=0.1	D64 (3):HB=0.8 , ION=0.1 D80(3): ION=0.1	T56(3):HB D64(3):HB, ION D80(3):ION	L58(3):HPC D64(3):HB, ION	L405(3):HPC D411(3):HB, ION M428(3):HPC
F25	H58(3):HPC=6.6 L81(3):HPC=4.4	H58(3): HPC=2.9 L81(3):HPC=5.4	H58(3): HPC=7.4	L81(3):HPC	L58(3):HPC L81(3):HPC	L405(3):HPC M428(3):HPC

	Y82(3):HPC=3.8		Y82(3):HPC=7.9 V84(3):HPC=4.1	Y82(3):HPC	Y82(3,4):HPC	Y429(3):HPC M431(3):HPC
G26		Y82(3):HB=0.3	Y82(3):HB=0.3		Y82(3):HB	
K27	Y78(1,2,3,4):HB=0.7	Y78(1,2,3,4):HB=0.6	Y78(1,2,3,4):HB=0.6	Y78(1,2,3,4):HB	Y78(1,2,3,4):HB	Y425(1,2,3,4):HB
C28	Y82(2):HB=0.8	Y82(2):HB=0.8	Y82(2):HB=0.3		Y82(2):HB	Y429(2):HB
M29				D80(4):HPC Y82(1):HPC	Y82(1):HPC	Y429(1):HPC, HB
N30	D80(1):HB=0.8	D80(1):HB=1.0 Y82(1):HB=0.4	G79(1):HB=0.3 D80(1):HB=1.1 Y82(1):HB=0.3	S57(1):HB D80(1):HB Y82(1):HB, ION	G79(1):HB D80(1):HB	D427(4):HB Y429(4):HB
R/G/R31	E56(2):HB=2.3, ION=0.2		D80(1):HB=2.7, ION=0.3	S57(1):HB D64(1):ION D80(1):HB, ION Y82(2):HB	D55(2):ION D56(2):HB, ION	D403(2):ION
K32		E56(1):ION=0.1				
H/H/K34			D80(4):HB=0.9, ION=0.3 Y82(1):HB=0.3	Y82(1):HB		
T36	D80(3):HB=1.0 Y82(4):HB=0.3		D80(3):HB=1.2	Y82(4):HB V84(4):HPC	Y78(4):HB D80(3):HB	D427(3):HB Y429(3):HPC
P37				V84(4):HPC	L58(4):HPC V84(3):HPC	L405(3):HPC Y429(3):HPC M431(1):HPC
K38				D64(3):ION		

*Субъединицы канала отмечены в скобках. Типы взаимодействий: HPC – гидрофобный контакт, HB – водородная связь, ION – ионная связь. Показаны только сильные, стабильные в процессе МД взаимодействия. В случае комплексов с каналом KcsA-Kv1.1 указаны типы взаимодействий и их оценки.

Остаток E56 Р-петли канала является партнером ионных взаимодействий для трех остатков токсина: K16, K19, R31. Остаток R24 образует две ионные связи с остатком D64 поровой петли и остатком D80, примыкающим к СФ канала. Тот же остаток D80 взаимодействует с заряженными N-концевыми аминокислотными группами токсина. В целом, поровой домен канала K_v1.1 обогащен анионными остатками и не содержит катионных аминокислотных остатков, в то время как AgTx2 обладает семью катионными и только одним анионным остатком. Большое число противоположно заряженных аминокислот позволяет предположить мультиточечные электростатические взаимодействия, важные для узнавания токсином канала в процессе связывания и являющиеся определенно необходимыми участниками стабилизации комплекса. Ионные взаимодействия AgTx2, по-видимому, являются движущей силой образования комплекса с каналом K_v1.1 и с другими каналами семейства K_v1 [319, 332].

Среди пяти катионных остатков AgTx2 остаток K27 имеет ключевое значение для замыкания поры и образует стабильные водородные связи с гидроксильными группами тирозинов поры канала K_v1.1. Многие из этих связей дополняются ионными взаимодействиями заряженных остатков, но некоторые водородные связи работают как независимые точки связывания для остатков T9, S11, C28, N30 и T36. Гидрофобные контакты неполярных остатков I15 и F25 являются еще одним фактором стабилизации комплекса. Остаток F25, образующий набор гидрофобных контактов, участвует в дополнительном гидрофобном контакте с остатком H58 Р-петли.

Согласно результатам экспериментов *in vitro* и *in silico*, остатки R24, F25, K27, расположенные на втором β-тяже AgTx2, и остаток N30 являются важными для связывания с K_v1.1, а также для образования комплексов с каналами Shaker, K_v1.3 и K_v1.6 [306, 320, 333, 341]. Предполагается, что эти остатки формируют основу высокой аффинности токсина AgTx2 к каналам Shaker и K_v1.X (X=1, 3, 6).

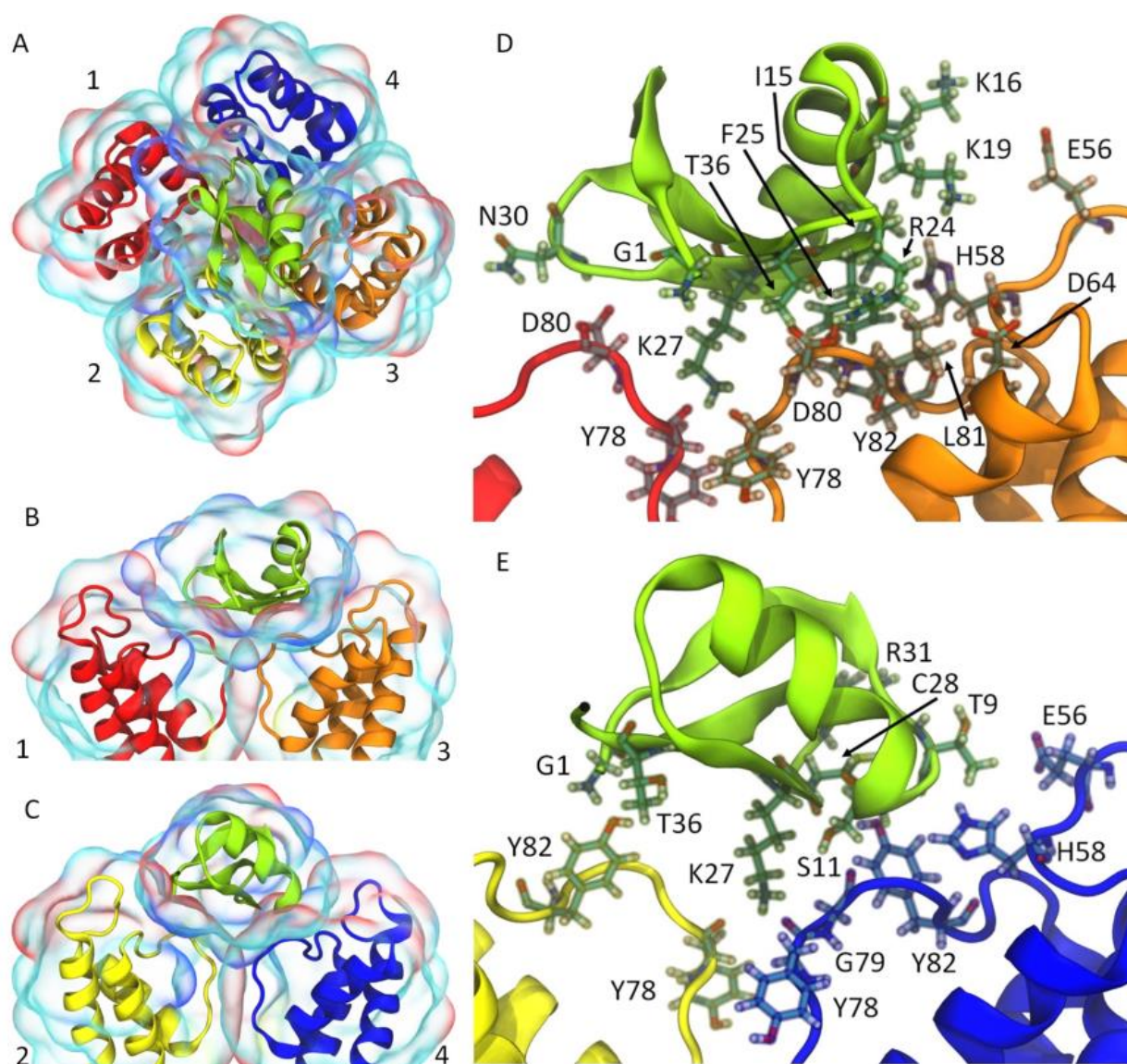


Рисунок 34. Модель комплекса AgTx2 с каналом KcsA-K_v1.1: вид сверху (A) и сбоку (B-E). Тяжи субъединиц канала (красный, синий, оранжевый и желтый) и токсин (зеленый) показаны сплошными линиями и лентами. Номера субъединиц отмечены арабскими цифрами. Боковые виды представлены без передних и задних субъединиц для ясности визуализации. Молекулярные поверхности показаны в облачном представлении [56] на панелях A-C (N, C и O атомы кодируются синим, голубым и красным цветом соответственно). На панелях D и E боковые цепи взаимодействующих остатков показаны в стержневом представлении.

Согласно модели остатки R24, F25, K27, C28, N30 и R31, расположенные во второй β -цепи и следующем β -повороте AgTx2, образуют область контактов с сайтом связывания K_v1.1 (Таблица 7).

Со стороны $K_v1.1$ канала сайт связывания с токсином AgTx2 сформирован в большей степени за счет пяти аминокислотных остатков селективного фильтра и прилегающей петли, формирующей плато вокруг поры. В дополнение, два и один взаимодействующий остаток расположены на башенке и поровой спирали соответственно. Следует отметить, что остатки E56, D64, Y78, G79 и Y82 так же важны для связывания токсинов: HsTx1 [342], ShK [75] и BgK [343]. Можно предположить, что эти остатки являются частью общего интерфейса, участвующих в связывании $K_v1.1$ канала с различными пептидными блокаторами.

Остатки поровой спирали (D64), селективного фильтра (Y78, G79) и плато (D80, L/M81) являются инвариантными среди родственных каналов $K_v1.X$ ($X=1-3, 6$). Инвариантные аналоги остатков G79 и D80 взаимодействуют с AgTx2 в комплексе с каналом $K_v1.6$, тогда как инвариантные аналоги остатков D64, L/M81 и Y78 участвуют в связывании AgTx2 с каналами $K_v1.3$ и $K_v1.6$ [48,60]. Значительное число инвариантных остатков, участвующих в связывании AgTx2, по-видимому, является причиной как одинакового высокого сродства, так и низкой селективности взаимодействий AgTx2 с родственными K_v1 -каналами. Среди остатков H58, E56, Y78, D80 и Y82, которые образуют четыре или более контактов с AgTx2, остатки E56, H58 и Y82 (частично) варьируются в K_v1 -каналах и могут рассматриваться как ключевые для корректировки селективности связывания AgTx2 с $K_v1.1$ путем введения соответствующих мутаций.

Созданная модель комплекса токсина AgTx2 с каналом $K_v1.1$ может быть использована для рационального дизайна пептидных блокаторов с измененными параметрами связывания путем введения точечных мутаций в последовательность AgTx2. Для проверки этой гипотезы было предложено две точечные мутации AgTx2(R31G) и AgTx2(H34K) с предполагаемыми противоположными эффектами на аффинность связывания пептида с KcsA-

K_V1.1 каналом и созданы модели их комплексов, а также рассчитаны параметры связывания токсинов с каналом KcsA-K_V1.1.

Остаток R31 взаимодействует с остатком E56, который представляет собой переменный остаток в родственных каналах K_V1.X (X = 1-3, 6). Можно предположить, что замещение остатка R31 остатком G нарушит водородную связь и ионное взаимодействие пептида с остатком E56, уменьшит площадь контактов и, наконец, ослабит комплекс с KcsA-K_V1.1. И наоборот, замещение остатка H34 катионным остатком K в пептиде может спровоцировать дополнительные взаимодействия с близко расположенным анионным остатком D80 канала, усилить вовлечение третьей β -тяжа в комплексное образование и укрепить комплекс.

Для проверки этой гипотезы были проведены *in vitro* эксперименты в Лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Константы диссоциации были измерены с помощью оригинальной разработки (Рисунок 35), основанной на детекции уровня флуоресценции при вытеснении флуоресцентно-меченого лиганда (дикий и мутантные формы токсина AgTx2) немеченым лигандом из комплекса с мембранным белком, каналом KcsA-K_V1.X (X = 1, 3, 6), экспрессируемого на поверхности сферопласта из клеток *E.coli* [243]. Измеренные константы диссоциации составляют $0,9 \pm 0,2$, $1,7 \pm 0,3$ и $0,26 \pm 0,03$ нМ для комплекса с AgTx2, AgTx2(R31G) и AgTx2(H34K) соответственно (личное сообщение).

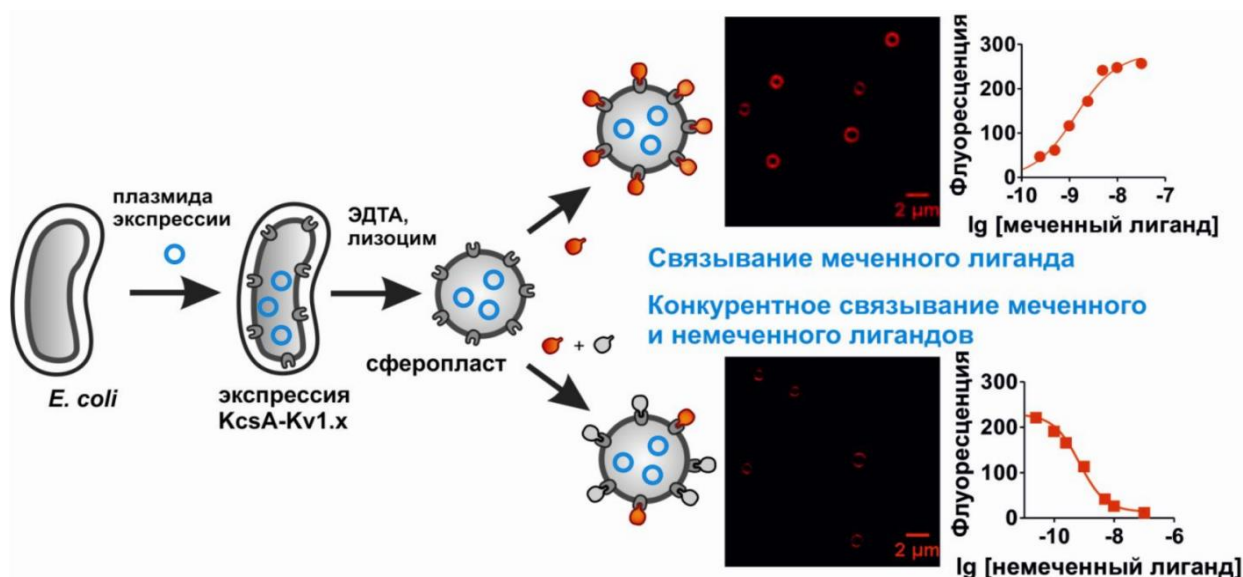


Рисунок 35. Схема проведения *in vitro* эксперимента определения констант диссоциации блокаторов с гибридными калиевыми каналами KcsA-K_v1.X в составе мембраны сферопластов [237].

Для детального анализа молекулярных детерминант различий связывания дикого и мутантных форм AgTx2 с каналом K_v1.1 были созданы *in silico* модели комплексов AgTx2(R31G) и AgTx2(H34K) токсинов с каналом KcsA-K_v1.1 и рассчитаны параметры связывания токсинов в этих комплексах. Молекулярное моделирование токсинов AgTx2(R31G) и AgTx2(H34K), дополненное МД, показало, что введенные мутации не изменяют вторичную структуру пептидов (Таблица 8-9).

Таблица 8. Расчетное СКО (Å) Cα-атомов токсинов AgTx2, AgTx2(R31G), AgTx2(H34K).

	AgTx2 (дикий тип)	AgTx2(R31G)	AgTx2(H34K)
AgTx2 (дикий тип)	0	0,9±0,1	0,7±0,1
AgTx2(R31G)	0,9±0,1	0	0,6±0,1
AgTx2(H34K)	0,7±0,1	0,6±0,1	0

Таблица 9. Вторичная структура токсина AgTx2 и его мутантных форм по данным анализа спектров кругового дихроизма.

	α -спираль, %	β -лист, %	β -поворот, %	петля, %
AgTx2	9	35	23	33
AgTx2(R31G)	9	37	23	31
AgTx2(S7K)	9	38	21	32

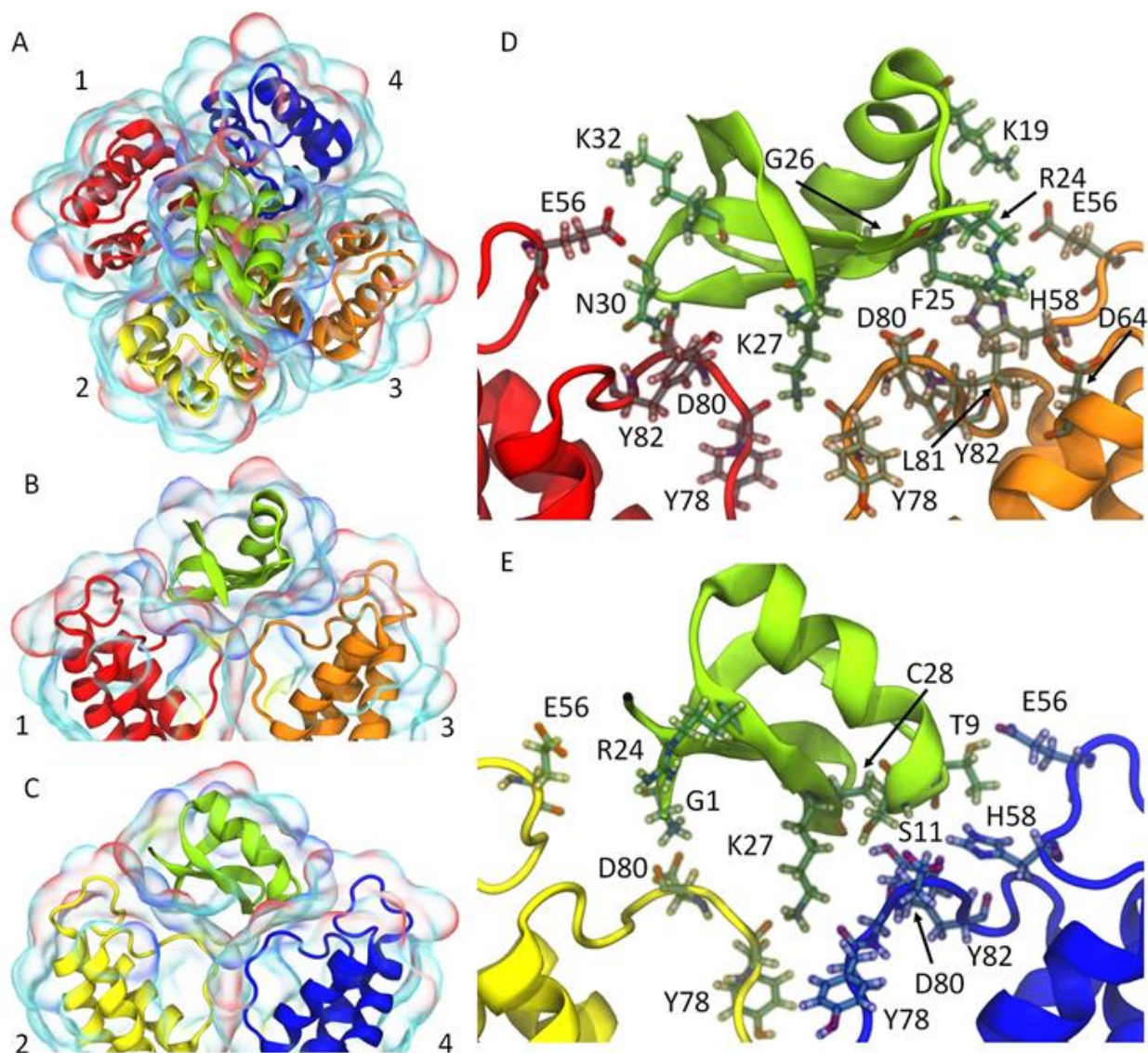


Рисунок 36. Модель комплекса AgTx2(R31G) с каналом KcsA-K_v1.1: вид сверху (A) и сбоку (B-E). Остальные обозначения соответствуют легенде на рисунке.

Моделирование структур комплекса канала KcsA-K_v1.1 и мутантных форм AgTx2 и расчет МД были выполнены по методике, описанной выше. Было обнаружено, что основные структурные особенности комплекса

канала KcsA-K_V1.1 с AgTx2 сохраняются в комплексах с мутантами, включая асимметричное связывание пептидов с каналом, их ориентацию в сайте связывания, отсутствие существенных изменений в структурах пептидов и K⁺ селективного фильтра, а также замыкание боковой цепью остатка K27 токсина поры канала за счет образования водородной связи с карбонильными остатками Y78 четырех субъединиц канала (Таблица 7). В то же время анализ межмолекулярных взаимодействий показал, что изменения в комплексах канал-токсин, вызванные точечными мутациями, значительны и не ограничиваются взаимодействиями замененного остатка.

Точечные мутации токсинов изменили репертуар аминокислотных остатков, участвующих в связывании (Таблица 7), вследствие изменения ориентации боковых цепей остатков как токсина, так и канала. В случае AgTx2(R31G) мутированный остаток 31, а также остатки I15, K16 и T36 потеряли все связи с остатками канала, тогда как остатки G26 и K32 оказались вовлеченными в связывание (Таблица 7, Рисунок 36). Что касается AgTx2(H34K), K16 и K19 сохранили список партнеров – взаимодействующих остатков, тогда как остатки K34 и G26 значительно изменили его (Таблица 7, Рисунок 37). Большинство других остатков токсина частично изменили партнеров и силу взаимодействий (Таблица 7, Рисунок 37C). Только три остатка токсина сохранили свои исходные связи (иногда с измененными параметрами связывания): а.о. K19, K27 и C28 AgTx2(R31G); S11, K27 и C28 AgTx2(H34K) (Таблица 7, Рисунок 37A, C).

Ансамбль взаимодействующих остатков канала KcsA-KV1.1 сохраняется в комплексе с AgTx2(R31G), но только остатки Y78, G79 и L81 воспроизводят исходные наборы связей (Таблица 7, Рисунок 36B). В комплексе с AgTx2(H34K) остаток L81 заместился на остаток V84 в гидрофобных контактах с остатком F25 токсина, а комплекты связей изменились для всех взаимодействующих остатков канала, за исключением остатка Y78 (Таблица 7, Рисунок 37D).

Несмотря на сложную сеть изменений в репертуаре взаимодействующих остатков, а также типов и прочности образующихся связей, наблюдаемые в *in vitro* экспериментах, проведенных в Лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, различия в аффинности пептидов к KcsA-K_v1.1 можно объяснить полуколичественно путем сравнения вычисленных сумм оценок гидрофобных контактов, водородных и ионных связей (Рисунок 38).

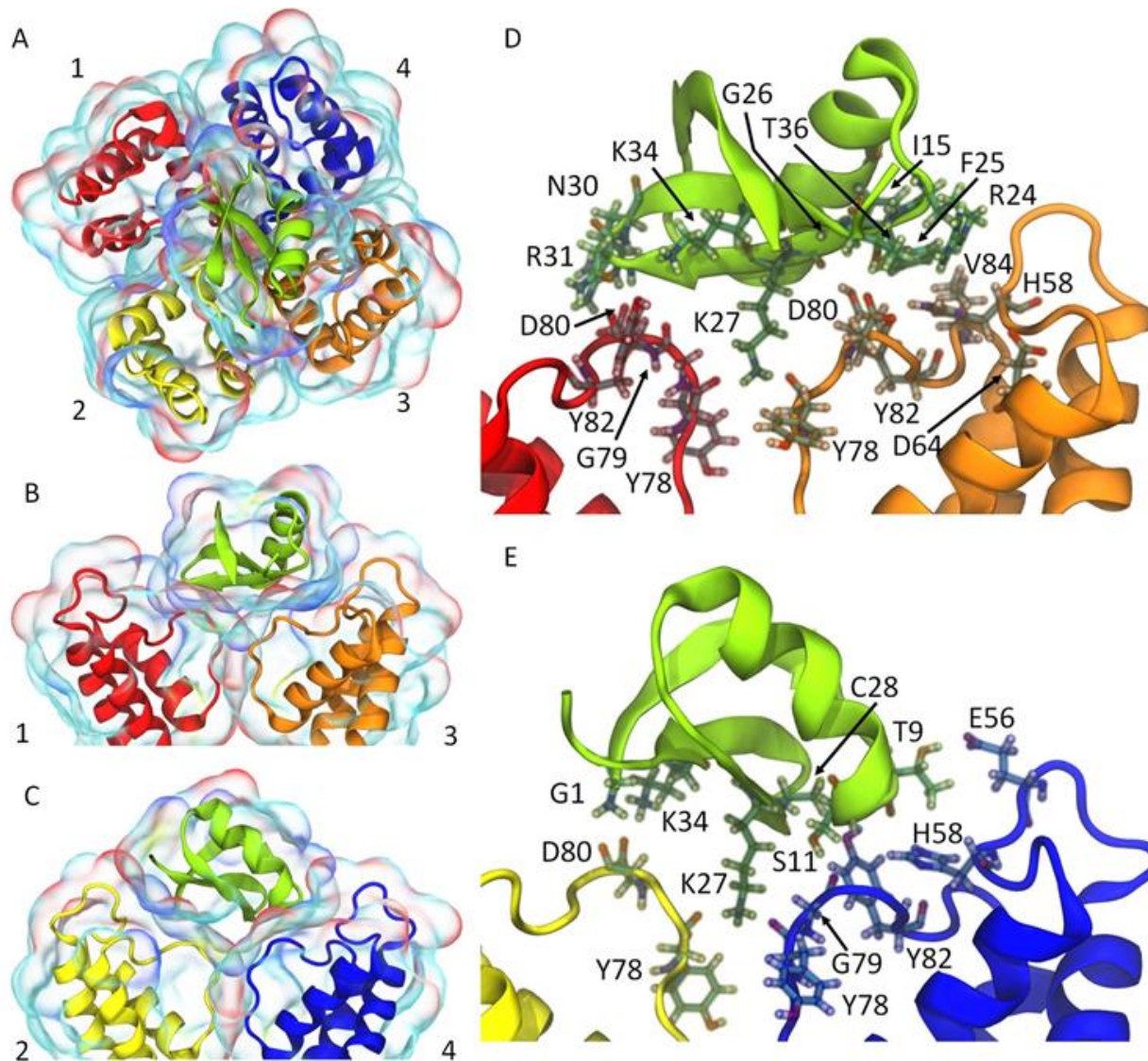


Рисунок 37. Модель комплекса AgTx2(H34K) с каналом KcsA-K_v1.1: вид сверху (A) и сбоку (B-E). Остальные обозначения соответствуют легенде на рисунке.

Суммы оценок гидрофобных контактов, водородных и ионных связей уменьшились для комплекса с AgTx2(R31G) по сравнению с соответствующими суммами оценок для комплекса AgTx2 (Рисунок 38E). Это

означает, что мутация R31G приводит к общему ослаблению всех трех типов взаимодействий. Наиболее масштабные изменения, связанные с мутацией R31G, наблюдались в ионных взаимодействиях остатка 31, гидрофобных контактах остатков I15 и F25, водородных связей остатка T9, остатка 31 и остатка T36 (Рисунок 38А). В отличие от других масштабных изменений, водородная связь остатка T9 была усилена.

Можно сделать вывод, что ослабление связывания токсина в комплексе с KcsA-K_v1.1 каналом, индуцированное мутацией R31G, является умеренным (Таблица 10) по следующим причинам. Во-первых, образовались новые связи остатка E56 с остатками T9, R24 и K32 вместо отключенных взаимодействий 31 остатка с остатком E56. Во-вторых, усиление взаимодействий N30 и появление связей остатков K32-E56 и G26-Y82 не позволили добиться сокращения области контактов между токсином и каналом.

Суммы оценок гидрофобных контактов и водородных связей увеличились, а сумма оценок ионных связей немного уменьшилась для AgTx2(H34K) в комплексе с KcsA-K_v1.1 по сравнению с AgTx2 (Рисунок 38Е). По-видимому, мутация H34K улучшает сродство пептидов к сайту связывания канала K_v1.1 из-за общего усиления гидрофобных контактов и водородных связей. Значительные изменения, вызванные мутацией H34K, были обнаружены в гидрофобных контактах остатков I15 и F25, а также в водородных связях остатка 34, остатка T9 и остатка N30 (Рисунок 38С). Усиление электростатических взаимодействий остатка 34 было сверхкомпенсировано ослаблением ионных связей, образованных остатками K16, K19 и R24 (Рисунок 38С). Интерфейс взаимодействия токсина был расширен в области третьего β -тяжа, и достигнуто улучшенное сродство, но уменьшенные ионные взаимодействия в областях α -спирали и второго β -тяжа токсина ограничивали действие мутации H34K.

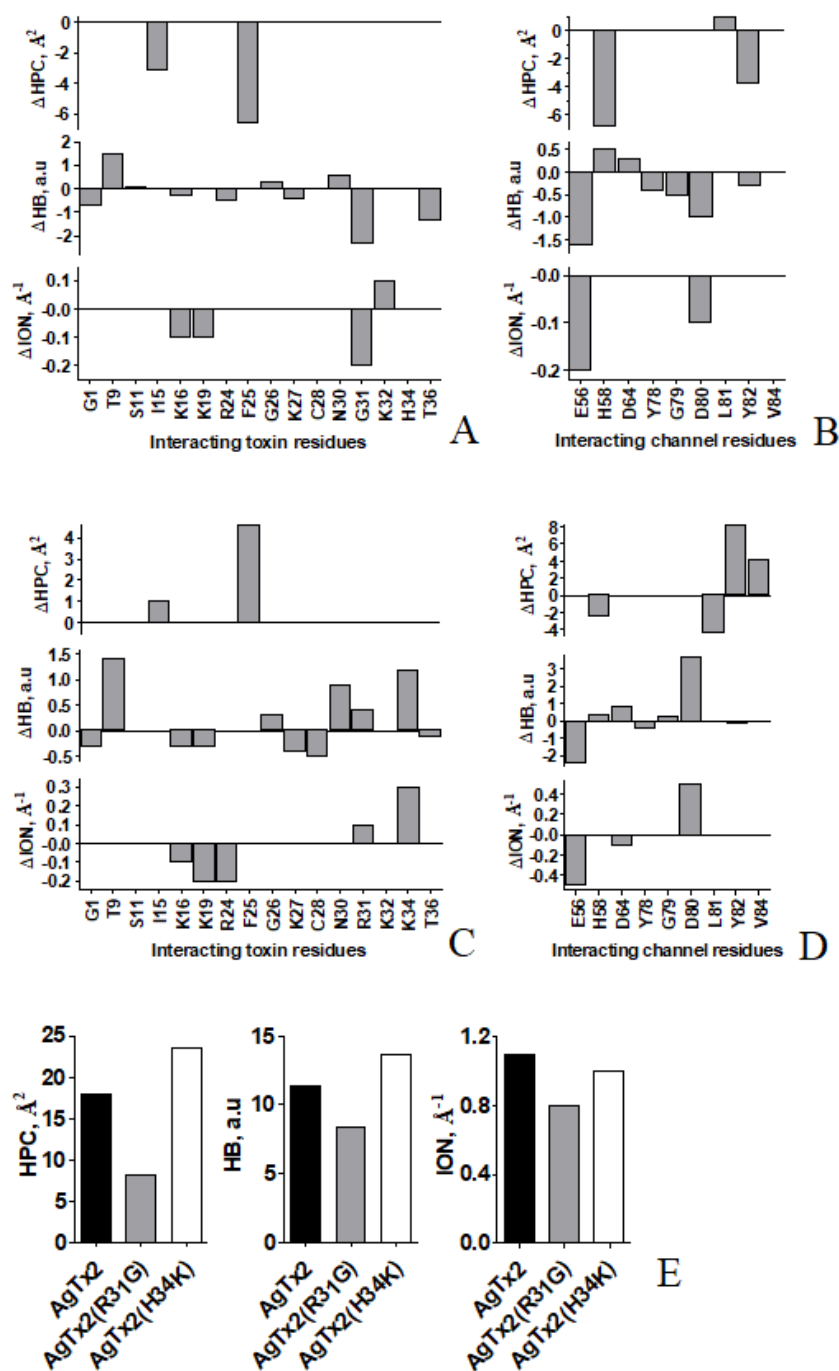


Рисунок 208. Изменения в взаимодействиях между аминокислотными остатками сайта связывания $Kv1.1$ канала и мутантов токсина AgTx2 по сравнению с взаимодействиями в комплексе с диким типом токсина AgTx2. А-Д. Изменения в оценках контактов HPC, HB и ION для каждого взаимодействующего токсина (А, С) и канала (В, D), вызванного мутациями R31G (А, В) и H34K (С, D) (рассчитанными как различия в соответствующих оценках, перечисленных в Таблица 7). Е. Сравнение сумм гидрофобных контактов (HPC), водородных (HB) и ионных связей (ION) для AgTx2 и его мутантов в комплексе с каналом KcsA-Kv1.1 (рассчитано с использованием данных, перечисленных в Таблица 7).

3.3.2. Общие черты связывания аджитоксина с каналами семейства KcsA-Kv1.X. Как было отмечено ранее, структура комплексов каналов KcsA-Kv1.X (X=1, 3, 6) с AgTx2 достаточно консервативна. Общая архитектура комплексов включает асимметричное связывание AgTx2 с внеклеточной стороны поровой спирали калиевого канала. Вторичная структура AgTx2 сохраняется в процессе взаимодействия с калиевым каналом. Структура порового домена так же остается стабильной: структура селективного фильтра каналов KcsA-Kv1.X (X=1, 3, 6) не претерпевает значительных изменений (СКО С α -атомов = 1 Å), тогда как структура Р-петель меняется в большей степени (СКО С α -атомов = 2,5 Å). Жесткость большинства структурных элементов порового домена KcsA-Kv1.1 канала и структуры AgTx2, связанного в комплексе, является распространенной особенностью комплексов α -КТх токсинов и Kv1-каналов [84, 87, 174, 319].

Поворот AgTx2 в сайте связывания исследуемых каналов вокруг их оси относительно положения харибдотоксина в комплексе с каналом Kv1.2-2.1 воспринимается как характерная черта отдельных комплексов и служит компенсацией описанной конформационной жесткости макромолекул.

Комплексы потенциал-управляемых калиевых каналов семейства Kv1 с AgTx2 стабилизируются за счет совокупности взаимодействий до 10 аминокислотных остатков каждого канала и до 20 аминокислотных остатков аджитоксина 2 (Таблица 7). Все субъединицы каналов в разной степени задействованы в процесс связывания. Наибольшее число взаимодействий наблюдается с субъединицей, контактирующей с α -спиралью и вторым и третьим β -тяжем аджитоксина 2. Многоточечная сеть взаимодействий включает в себя в большей степени водородные и ионные связи, а также гидрофобные контакты и стэкинг-взаимодействия.

Наиболее стабильные контакты AgTx2 с каналами KcsA-Kv1.X (X=1, 3, 6) образуются за счет взаимодействия остатков второго β -тяжа токсина: с 24 по 28 остаток. Среди катионных остатков AgTx2, участвующих во

взаимодействии с поровым доменом, K27 играет особую роль как остаток, закупоривающий пору. Взаимодействие K27 с порой, а именно образование водородных связей с карбоксильными группами остатков Y селективного фильтра канала, является идентичным для комплексов AgTx2 с родственными K_V1-каналами. Это экспериментально показано для комплекса с каналом Shaker [23], K_V1.3 [24], а также *in silico* для K_V1.1, K_V1.3 [326], K_V1.6 канала [21]. Предполагается, что взаимодействие K27 с селективным фильтром канала определяет стабильность образуемого комплекса [25].

Поровые домены каналов K_V1 обогащены анионными остатками, в то время как исследуемый аджитоксин 2 обладает катионными остатками. Большое число противоположно заряженных аминокислот позволяет предложить, что многоточечные электростатические взаимодействия играют важную роль в первичном узнавании и связывании токсина каналом. Ионные взаимодействия рассматриваются как ключевые при образовании и стабилизации комплексов AgTx2 с каналами K_V1 [321, 326, 333].

Остатки поровой спирали (остаток D64), селективного фильтра (остатки Y78, G79) и плато (остатки D80, L/M81) являются инвариантными для родственных каналов KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6). Инвариантные аналоги остатков G79 и D80 взаимодействуют с AgTx2 в канале K_V1.6, тогда как инвариантные аналоги остатков D64, L/M81 и Y78 участвуют в связывании AgTx2 с каналами K_V1.3 и K_V1.6 [321, 330]. Значительное число инвариантных остатков, участвующих в связывании AgTx2, по-видимому, является причиной как одинакового высокого сродства, так и низкой селективности взаимодействий AgTx2 с близкородственными K_V1-каналами. Среди остатков H58, E56, Y78, D80 и Y82, которые производят четыре или более контактов с AgTx2, остатки E56, H58 и Y82 (частично) изменяются в K_V1-каналах и могут рассматриваться как ключевые точки для корректировки селективности связывания AgTx2 с KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) путем введения соответствующих мутаций в последовательность пептида.

3.3.3. Расчет энергии связывания аджитоксина 2 (дикого типа и мутантных форм) с каналом Kv1.1.

Наиболее распространенным методом, используемым в расчетах ПСС, является зонтичная выборка МД, где вводится гармонический потенциал для усиления выборки лиганда в точках с высокой энергией [63]. Зонтичную выборку проводили, как описано в Методах.

Анализ СКО боковых цепей дикого и мутантных типов AgTx2 в каждом зонтичном окне показал, что они демонстрируют аналогичное поведение. Во время расчета ПСС не происходит искусственной деформации пептида (данные не показаны).

Таблица 10. Сравнение полученных *in vitro* и *in silico* значений энергии связи диких и мутированных форм AgTx2 с каналом KcsA-Kv1.1.

	AgTx2	AgTx2 (R31G)	AgTx2 (S7K)	AgTx2 (H34K)	AgTx2 (T9G)
ΔG_{exp} (кДж/М)	-53,7±0,6	-52,0±0.5	-56,5±0,5	-56,9±0,3	-55,4±0,4
ΔG_{PMF} (кДж/М)	-55,1±0,7	-52,4±1,2	-69,2±0,9	-72,7±0,8	-88,0±1,1

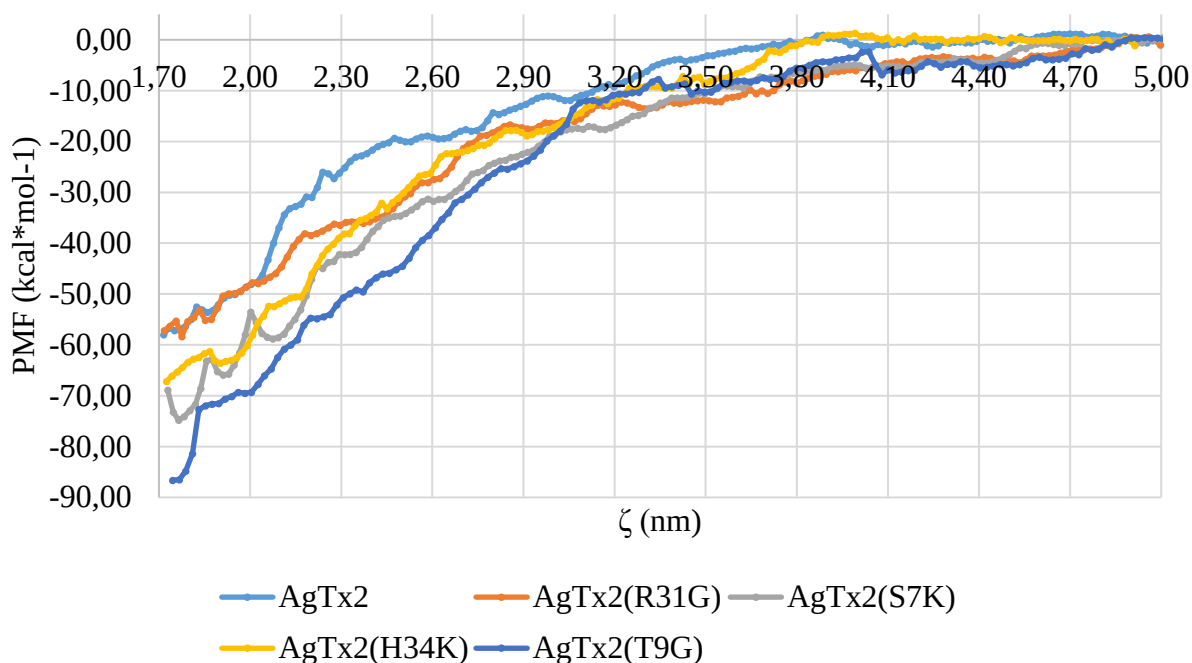


Рисунок 219. Сравнение профилей ПСС для оттаскивания нативной и мутированных форм AgTx2 от канала KcsA-Kv1.1.

Введение мутаций S7K, H34K и T9G AgTx2 приводит к уменьшению энергии связывания с каналом KcsA-Kv1.1 на 14,1, 17,6 и 32,9 кДж/моль соответственно, тогда как введение мутации R31G в аминокислотную последовательность AgTx2 увеличивало энергию связи на 2,7 кДж/моль (Таблица 10, Рисунок 39). Полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными значениями констант связывания, увеличивая уровень доверия к сложным моделям и вычислительным методам.

Анализ связывания мутантных форм AgTx2 с калиевым каналом Shaker был проведен в работе [344] вычислительными методами. На первом этапе было сгенерировано большое количество моделей комплекса с использованием высокотемпературной молекулярной динамики, учитывающей гибкость боковой цепи с ограничениями по расстоянию, полученными из термодинамического анализа циклов двойных мутантов. С помощью этой процедуры было найдено четыре вероятные модели связывания. На втором этапе качество получаемых комплексов оценивали путем изучения их стабильности при моделировании молекулярной динамики

с явными молекулами воды и путем расчета свободных энергий связывания мутантных белков и сравнения с экспериментальными данными.

Авторы продемонстрировали, что комплекс стабилизируется за счет комбинации гидрофобных контактов, водородных связей и электростатических взаимодействий, а поверхность межбелкового контакта составляет около 1000 Å с примерно одинаковыми вкладами каждой из четырех субъединиц канала. Расчет энергии связывания и анализ влияния 13 точечных мутаций на параметры связывания AgTx2 с калиевым каналом Shaker был проведен с использованием приближения континуальной сольватации. Суммарные вклады электростатических и неполярных взаимодействий в свободную энергию связывания ($\Delta G_{\text{elec}} + \Delta G_{\text{np}}$) были рассчитаны для 18 точечных мутаций и усреднены по восьми конфигурациям, взятых в конце траектории МД, для четырех режимов связывания (Рисунок 40).

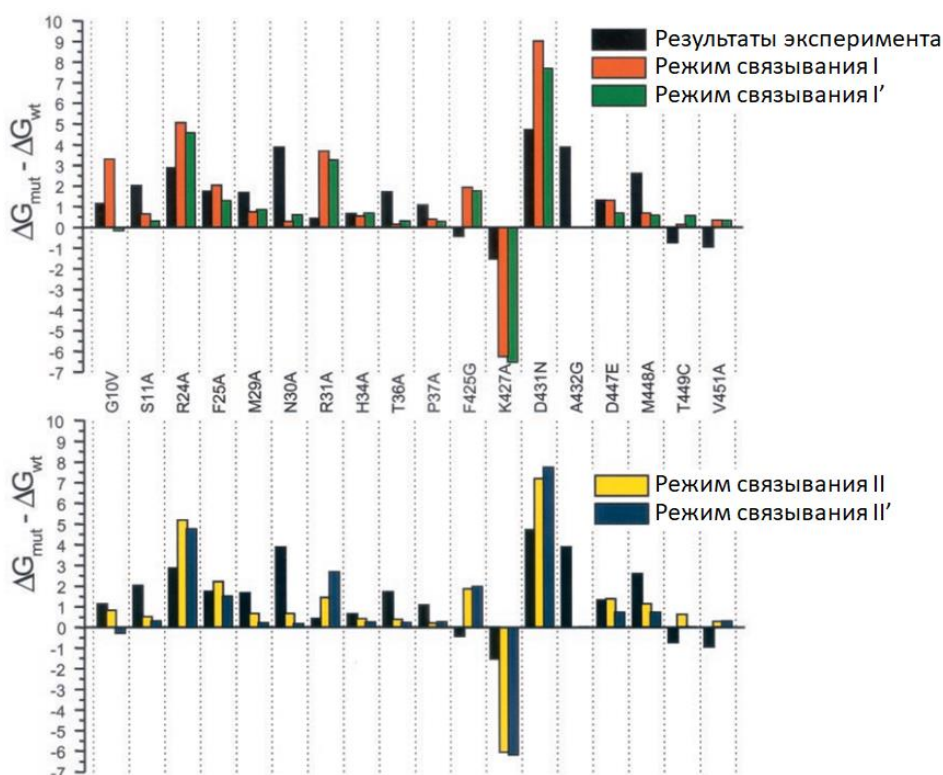


Рисунок 40. Сравнение рассчитанных и экспериментальных значений энергии связывания для 18 точечных мутаций в комплексе AgTx2 с калиевым каналом Shaker [344].

Заключение

Разработка эффективных способов построения достоверных структур биологических макромолекул и их комплексов с лигандами является необходимым шагом в понимании их функционирования, а также для решения прикладных задач рационального дизайна лекарственных средств и детектирующих систем. Предложенная в данной работе методика компьютерного моделирования, включающая моделирование порового домена калиевых каналов с пептидными блокаторами по гомологии с использованием шаблона гомологичного комплекса, молекулярную динамику системы в водном окружении, отбор предпочтительной ориентации блокатора в сайте связывания целевого канала и анализ всех образующихся взаимодействий, позволил впервые подробно изучить структурную организацию поровых доменов калиевых каналов $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$), KcsA- $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) и их комплексов с токсинами скорпиона.

Анализ общей организации комплексов каналов KcsA- $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) с пептидными блокаторами показал высокую консервативность структуры, а также стабильность образующихся комплексов в процессе молекулярной динамики. Одной из характерных черт структурной организации комплексов является специфический поворот токсина в сайте связывания канала и локальная подстройка Р-петель канала.

Детальное изучение полной картины образуемых между молекулами контактов было использовано для выявления молекулярных основ селективности взаимодействия. Результаты молекулярного моделирования позволяют заключить, что интерфейсы взаимодействия токсинов с каналами формируются сразу многими аминокислотными остатками, создающими сложные системы связей. Эти системы образующихся взаимодействий существенно отличаются не только для пептидов из разных групп и подсемейств, но и для токсинов с высокой гомологией, что, по всей видимости, обосновывает их селективность. Наибольший вклад в образование контактов

с каналом был показан для остатков блокаторов, расположенных на плато, которое образовано β -листом, с поровыми остатками каналов. Созданные нами модели выявляют кластеры взаимодействующих остатков со стороны каналов и токсинов, а также позволяют обнаружить общие принципы связывания блокаторов с C α / β -структурой с K $_V$ 1-каналами.

Полученные *in silico* оценки аффинности связывания нативной и мутантных форм AgTx2 с гибридными каналами KcsA-K $_V$ 1.X (X=1, 3, 6) показали высокую степени корреляции с экспериментальными (*in vitro*) константами связывания как в случае применения разработанного алгоритма детального анализа вклада всех образованных контактов, так и с помощью расчета энергии связывания широко используемым методом потенциала средней силы. В результате детального анализа интерфейса связывания мутантных форм с поровым доменом канала K $_V$ 1.1 доказана гипотеза о многоточечном характере взаимодействия и компенсирующем вкладе аминокислотных остатков, соседних к мутационным сайтам, что в свою очередь обосновывает необходимость системного рассмотрения макромолекулярных комплексов.

Результаты проведенных исследований связывания мутантных форм токсинов могут использоваться как для фундаментального изучения структурных основ взаимодействий в комплексах макромолекул, так и для разработки детектирующих систем и высокоэффективных лекарственных средств для терапии аутоиммунных и невропатических заболеваний.

Выводы

1. Архитектура комплексов пептидных блокаторов семейства α -КТх с нативными каналами $K_v1.X$ и гибридными каналами KcsA- $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$), а также интерфейс взаимодействия в этих комплексах являются попарно консервативными.
2. Взаимодействия блокаторов с калиевыми каналами K_v1 имеют многоточечный характер: в стабилизации комплексов калиевых каналов семейства $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) с токсином AgTx2 задействовано до 10 аминокислотных остатков каждого канала и до 20 аминокислотных остатков блокатора.
3. Высокая аффинность и низкая селективность связывания блокаторов семейства α -КТх с каналами $K_v1.X$ ($X=1, 3, 6$) обусловлена консервативными остатками D411, Y425, G426, D427 и L/M428 со стороны каналов.
4. Мутантные формы блокатора AgTx2 с заменами R31G и H34K демонстрируют разнонаправленное изменение связывания с каналом $K_v1.1$ по сравнению с природной формой, что подтверждается экспериментальными данными

Благодарности

Выражаю благодарность своим научным руководителям: доценту кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ Новоселецкому Валерию Николаевичу за неоценимый вклад в освоение необходимых навыков и проведение исследований и заместителю заведующего кафедрой биоинженерии, профессору Шайтану Константину Вольдемаровичу за помощь при выполнении диссертационной работы, советы и ценные замечания.

Отдельно благодарю коллектив Лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН и лично Феофанова Алексея Валерьевича за идейное вдохновение и совместную работу, активную помощь и поддержку на протяжении всего срока обучения в аспирантуре, а также руководителя группы нанобиоинженерии ИБХ РАН Некрасову Оксану Васильевну, обеспечивающую экспериментальную сторону проводимых исследований, без которых эта работы была бы невозможна.

Благодарю коллектив лаборатории молекулярного моделирования кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ за добрую рабочую атмосферу, взаимовыручку и моральную поддержку.

Я искренне признательна своей семье за понимание, терпение и вдохновение.

Список публикаций по теме диссертации

Публикации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI

1. **Volyntseva A.D.**, Novoseletsky V.N., Shaitan K.V., Nekrasova O.V., Feofanov A.V. Molecular modeling of agitoxin 2 complex with Kv1.1 binding site // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. – 2018. – Т. 50, № 6. – С. 467-603.
2. Nekrasova O., Kudryashova K., Kuzmenkov A., VassIvski A., Korolkova Y., **Volyntseva A.**, Novoseletsky V., Yakimov S., Kirpichnikov M., Feofanov A. Bioengineered analytical system to study potassium channel–ligand binding // *FEBS Open Bio*. – 2018. – Т. 8 (Suppl. S1). – С. 488.
3. Nekrasova O.V., **Volyntseva A.D.**, Kudryashova K.S., Novoseletsky V.N., Lyapina E.A., Illarionova A.V., Yakimov S.A., Korolkova Y.V., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Complexes of Peptide Blockers with Kv1.6 Pore Domain: Molecular Modeling and Studies with KcsA-Kv1.6 Channel // *Journal of NeuroImmune Pharmacology*. – 2017. – Т. 12, № 2. – С. 260-276.
4. **Волынцева А.Д.**, Новоселецкий В.Н., Шайтан К.В., Феофанов А.В. Молекулярное моделирование взаимодействий аджитоксина 2 с потенциал-управляемым калиевым каналом Kv1.3 // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2017. – № 1. – С. 29-34.
5. Некрасова О.В., Кудряшова К.С., **Волынцева А.Д.**, Новоселецкий В.Н., Якимов С.А., Кирпичников М.П., Феофанов А.В. Получение рекомбинантных пептидных токсинов из яда скорпионов – молекулярных инструментов и перспективных лекарственных средств // *Acta Naturae*. – 2017. – № спецвыпуск. – С. 87.

6. **Volyntseva A.D.**, Novoseletsky V.N., Shaitan K.V. Molecular studies of scorpion toxin and its mutants interactions with voltage-gated potassium channels // FEBS Journal. – 2016. – Т. 283, № Suppl. 1. – С. 233
7. Новоселецкий В.Н., **Волынцева А.Д.**, Шайтан К.В., Кирпичников М.П., Феофанов А.В. Моделирование структуры комплексов потенциал-управляемых калиевых каналов с пептидными блокаторами: методы и результаты // Acta Naturae. – 2016. – Т. 8, № 2 (29). – С. 39-52.

Тезисы докладов по теме диссертации

1. Volyntseva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V., Nekrasova O.V., Feofanov A.V. Molecular modeling of agitoxin 2 complex with Kv1.1 binding site // International Conference "BIOMEMBRANES 2018", Moscow, Russia, 1-5 October.
2. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Якимов С.А., Кирпичников М.П., Некрасова О.В., Кудряшова К.С., Феофанов А.В. Получение рекомбинантных пептидных токсинов из яда скорпионов - молекулярных инструментов и перспективных лекарственных средств // 12th International Scientific Conference on Bioorganic Chemistry devoted to the Memory of Professor Ovchinnikov/Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия, 18-22 сентября 2017. – С. 14.
3. Novoseletsky V.N., Karlova M.G., Volyntseva A.D., Shaitan K.V., Sokolova O.S. Electron microscopy and molecular modeling study of a full-length structure of a Kv7.1 potassium channel // Российская международная конференция по криоэлектронной микроскопии RICCEM-2017, Москва, Россия, 6-8 июня 2017. – Р. 14
4. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н. Молекулярное моделирование взаимодействий пептидных блокаторов с калиевыми каналами // V

International scientific conference of young researchers, Baku, Azerbaijan, 5-6 мая 2017. – С. 22

5. Volyntseva A., Novoseletsky V., Shaitan K., Feofanov A. Molecular modeling of interactions of agitoxin and its mutants with Kv1.6 voltage-gated potassium channel // Fourth biennial German–Russian symposium «Molecular Neurobiology Today and Tomorrow», Moscow, Russia, 5-9 April 2017. – P. 39.
6. Volyntseva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V. Molecular modeling of interactions of inwardly rectifying potassium channel Kir1.1 with tertiapin // IX International Congress Biotechnology: state of the art and perspectives, Moscow, Russia, 21-22 February 2017. – P. 403
7. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Соколова О.С., Шайтан К.В. Моделирование пространственной структуры с-концевого фрагмента калиевого канала Kv10.2 человека // Первый Российский кристаллографический конгресс, Москва, Россия, 21-26 ноября 2016. – С. 37
8. Volyntseva A. Molecular studies of scorpion toxins interactions with calcium-activated potassium channels // 7th International Conference on Bioinformatics, Rome, Италия, 24-25 октября 2016. – P. 26
9. Ehov G.S., Novoseletsky V.N., Volyntseva A.D., Shaitan K.V., Sokolova O.S. The Tee-dimensional structure of the human ion channel Kv10.2, microscopy and molecular modeling // Biomembranes 2016, Долгопрудный, Россия, 26-30 сентября 2016. – P. 133.
10. Ekhov G., Novoseletsky V., Volyntseva A., Shaitan K., Sokolova O. Tee-dimensional structure of truncated human Kv10.2 ion channel studied by cryoelectron microscopy and molecular modelling // 41st FEBS Congress, Kuşadasi, Turkey, September 3-8 2016. – P. 274
11. Novoseletsky V.N., Volyntseva A.D., Shaitan K.V. Mapping the interaction site for the mesobuthus scorpion toxins in the voltage-gated potassium channel

- Kv1.2 // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/BGRS-2016, Новосибирск, Россия, 29 августа - 2 сентября 2016. – P. 41
12. Novoseletsky V.N., Volyntseva A.D., Sokolova O.S., Shaitan K.V. ImpVed Tee-dimensional structure of human Kv10.2 ion channel studied by single particle electron microscopy and molecular modelling // Channelopathy-2016, Paris, France, June 12-17 2016. – P. 97.
13. Volyntseva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V. Development of the algorithm for calculating the interactions between scorpion toxins and voltage-gated potassium channels // International school-conference for students and young researchers on structure and functions of ion channels ISonIC2016. May 26-27 2016. — P. 10
14. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Шайтан К.В. Проектирование селективных блокаторов потенциал-зависимых калиевых каналов // VII РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ», Новосибирск, Россия, 12-17 июля 2015. – С. 52
15. Новоселецкий В.Н., Волынцева А.Д. Молекулярное моделирование комплексов калиевых каналов с блокаторами из яда скорпиона // III International scientific conference of young researchers, Baku, Azerbaijan, 17-18 April 2015. – P. 4.
16. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Шайтан К.В. Расчет взаимодействия пептидных блокаторов с потенциал-зависимыми калиевыми каналами // XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015", Москва, Россия, 13-17 апреля 2015. – С. 24
17. Volyntseva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V. Molecular modeling of Potassium channels complexes with several scorpion venom toxins // 22 Международная Конференция "МАТЕМАТИКА. КОМПЬЮТЕР. ОБРАЗОВАНИЕ", Пущино, 26 - 31 января 2015. – С. 26

Список 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., Pardo L.A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets // Nat. Rev. Drug Discov. 2009. Vol. 8, № 12. P. 982–1001.
3. Lahoria R. et al. Clinical-pathologic correlations in voltage-gated Kv1 potassium channel complex-subtyped autoimmune painful polyneuropathy. // Muscle Nerve. 2017. Vol. 55, № 4. P. 520–525.
4. Judge S.I.V., Bever C.T. Potassium channel blockers in multiple sclerosis: Neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment // Pharmacol. Ther. 2006. Vol. 111, № 1. P. 224–259.
5. Chandy K.G. et al. Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. // J. Exp. Med. 1984. Vol. 160, № 2. P. 369–385.
6. Panyi G. et al. Looking through ion channels: recharged concepts in T-cell signaling. // Trends Immunol. 2004. Vol. 25, № 11. P. 565–569.
7. Wulff H. et al. K⁺ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. // J. Immunol. 2004. Vol. 173, № 2. P. 776–786.
8. Pardo L.A. et al. Oncogenic potential of EAG K(+) channels. // EMBO J. 1999. Vol. 18, № 20. P. 5540–5547.
9. Camacho J. et al. Cytoskeletal interactions determine the electrophysiological properties of human EAG potassium channels. // Pflugers Arch. 2000. Vol. 441, № 2–3. P. 167–174.
10. Farias L.M.B. et al. Ether à go-go Potassium Channels as Human Cervical Cancer Markers // Cancer Res. 2004. Vol. 64, № 19. P. 6996–7001.
11. Lastraioli E. et al. herg1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. // Cancer Res. 2004. Vol. 64, № 2. P. 606–611.
12. Teisseyre A., Gąsiorowska J., Michalak K. Voltage-Gated Potassium Channels Kv1.3 - Potentially New Molecular Target in Cancer Diagnostics and Therapy // Adv. Clin. Exp. Med. 2015. Vol. 24. P. 517–524.
13. Whicher J.R., MacKinnon R. Structure of the voltage-gated K⁺ channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism. // Science. 2016. Vol. 353, № 6300. P. 664–669.
14. Wang W., MacKinnon R. Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-à-go-go - Related K⁺ Channel hERG // Cell. 2017. Vol. 169, № 3. P. 422–430.e10.
15. Hite R.K. et al. Cryo-electron microscopy structure of the Slo2.2 Na⁺-activated K⁺ channel // Nature. 2015. Vol. 527, № 7577. P. 198–203.
16. Tao X., Hite R.K., MacKinnon R. Cryo-EM structure of the open high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel // Nature. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 541, № 7635. P. 46–51.
17. Lee C.-H., MacKinnon R. Activation mechanism of a human SK-calmodulin channel complex elucidated by cryo-EM structures // Science (80-.). 2018. Vol. 360, № 6388. P. 508–513.

18. Lee C.-H., MacKinnon R. Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel // *Cell*. Cell Press, 2017. Vol. 168, № 1–2. P. 111–120.e11.
19. James Z.M. et al. CryoEM structure of a prokaryotic cyclic nucleotide-gated ion channel. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2017. Vol. 114, № 17. P. 4430–4435.
20. Barros F. et al. New Structures and Gating of Voltage-Dependent Potassium (Kv) Channels and Their Relatives: A Multi-Domain and Dynamic Question. // *Int. J. Mol. Sci. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI)*, 2019. Vol. 20, № 2.
21. Housley D.M. et al. Scorpion toxin peptide action at the ion channel subunit level // *Neuropharmacology*. 2017. Vol. 127. P. 46–78.
22. Israel M.R. et al. Toxins as tools: Fingerprinting neuronal pharmacology. // *Neurosci. Lett.* 2018. Vol. 679. P. 4–14.
23. Dutertre S., Lewis R.J. Use of venom peptides to probe ion channel structure and function. // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285, № 18. P. 13315–13320.
24. Grizel A. V, Glukhov G.S., Sokolova O.S. Mechanisms of Activation of Voltage-Gated Potassium Channels // *Acta Naturae*. 2014. Vol. 6, № 23. P. 10–26.
25. Novoseletsky V.N. et al. Modeling the structure of complexes of voltage-gated potassium channels with peptide blockers: methods and results // *Acta Naturae*. 2016. Vol. 8. P. in press.
26. Tian C. et al. Potassium channels: Structures, diseases, and modulators // *Chem. Biol. Drug Des.* 2014. Vol. 83, № 9. P. 1–26.
27. Huang X., Jan L.Y. Targeting potassium channels in cancer // *J. Cell Biol.* 2014. Vol. 206, № 2. P. 151–162.
28. 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.
29. Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives. // *Nature*. 2002. Vol. 419, № 6902. P. 35–42.
30. Pal S.K. et al. Apoptotic surface delivery of K⁺ channels. // *Cell Death Differ.* 2006. Vol. 13, № 4. P. 661–667.
31. Deutsch C., Chen L.Q. Heterologous expression of specific K⁺ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993. Vol. 90, № 21. P. 10036–10040.
32. Kim S.-J. et al. Pancreatic β -cell prosurvival effects of the incretin hormones involve post-translational modification of Kv2.1 delayed rectifier channels. // *Cell Death Differ.* 2012. Vol. 19, № 2. P. 333–344.
33. MacDonald P.E. et al. Inhibition of Kv2.1 voltage-dependent K⁺ channels in pancreatic beta-cells enhances glucose-dependent insulin secretion. // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 47. P. 44938–44945.
34. Yan L. et al. Expression of voltage-gated potassium channels in human and rhesus pancreatic islets. // *Diabetes. Society for Neuroscience*, 2004. Vol. 53, № 3. P. 597–607.
35. Papazian D.M. et al. Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. // *Science*. 1987. Vol. 237, № 4816. P. 749–753.
36. Mouhat S. et al. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels // *Curr*

- Pharm Des. 2008. Vol. 14, № 24. P. 2503–2518.
37. Szabó I. et al. Mitochondrial potassium channel Kv1.3 mediates Bax-induced apoptosis in lymphocytes. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 39. P. 14861–14866.
 38. Felipe A. et al. Targeting the voltage-dependent K(+) channels Kv1.3 and Kv1.5 as tumor biomarkers for cancer detection and prevention. // *Curr. Med. Chem.* 2012. Vol. 19, № 5. P. 661–674.
 39. Birnbaum S.G. et al. Structure and Function of Kv4-Family Transient Potassium Channels // *Physiol. Rev.* 2004. Vol. 84, № 3. P. 803–833.
 40. Buckingham S.D. et al. Structure and function of two-pore-domain K⁺ channels: contributions from genetic model organisms. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2005. Vol. 26, № 7. P. 361–367.
 41. Norris A.J., Foeger N.C., Nerbonne J.M. Neuronal voltage-gated K⁺ (Kv) channels function in macromolecular complexes // *Neurosci. Lett.* Elsevier Ireland Ltd, 2010. Vol. 486, № 2. P. 73–77.
 42. Maljevic S. et al. KV7 channelopathies // *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 2010. Vol. 460, № 2. P. 277–288.
 43. Hemmerlein B. et al. Overexpression of Eag1 potassium channels in clinical tumours. // *Mol. Cancer.* 2006. Vol. 5. P. 41.
 44. Patt S. et al. Expression of ether à go-go potassium channels in human gliomas. // *Neurosci. Lett.* 2004. Vol. 368, № 3. P. 249–253.
 45. Afeli S.A.Y., Malysz J., Petkov G. V. Molecular expression and pharmacological evidence for a functional role of kv7 channel subtypes in Guinea pig urinary bladder smooth muscle. // *PLoS One. Public Library of Science*, 2013. Vol. 8, № 9. P. e75875.
 46. Mello de Queiroz F. et al. Ether à go-go potassium channel expression in soft tissue sarcoma patients. // *Mol. Cancer.* 2006. Vol. 5. P. 42.
 47. Ding X.-W. et al. Aberrant expression of Eag1 potassium channels in gastric cancer patients and cell lines. // *Med. Oncol.* 2007. Vol. 24, № 3. P. 345–350.
 48. Ding X.-W. et al. Aberrant expression of ether à go-go potassium channel in colorectal cancer patients and cell lines. // *World J. Gastroenterol.* 2007. Vol. 13, № 8. P. 1257–1261.
 49. Ousingsawat J. et al. Expression of voltage-gated potassium channels in human and mouse colonic carcinoma. // *Clin. Cancer Res.* 2007. Vol. 13, № 3. P. 824–831.
 50. Glassmeier G. et al. Inhibition of HERG1 K⁺ channel protein expression decreases cell proliferation of human small cell lung cancer cells. // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 2012. Vol. 463, № 2. P. 365–376.
 51. Staudacher I. et al. HERG K⁺ channel-dependent apoptosis and cell cycle arrest in human glioblastoma cells. // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 2. P. e88164.
 52. Rao V.R. et al. Voltage-gated ion channels in cancer cell proliferation // *Cancers (Basel).* 2015. Vol. 7, № 2. P. 849–875.
 53. Gómez-Varela D. et al. Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67, № 15. P. 7343–7349.
 54. Hartung F., Stühmer W., Pardo L.A. Tumor cell-selective apoptosis induction through targeting of K(V)10.1 via bifunctional TRAIL antibody. // *Mol. Cancer.* 2011. Vol. 10. P. 109.

55. Asher V. et al. Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer. // *World J. Surg. Oncol.* 2010. Vol. 8. P. 113.
56. Weber C. et al. Silencing the activity and proliferative properties of the human EagI Potassium Channel by RNA Interference. // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 19. P. 13030–13037.
57. Hugnot J. et al. Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. // *EMBO J.* 1996. Vol. 15, № 13. P. 3322–3331.
58. Ottschytsch N. et al. Obligatory heterotetramerization of three previously uncharacterized Kv channel alpha-subunits identified in the human genome. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. Vol. 99, № 12. P. 7986–7991.
59. Å Y.S. et al. Molecular cloning and characterization of Kv6.3 , a novel modulatory subunit for voltage-gated K⁺ channel Kv2.1 1 // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 512, № 1–3. P. 230–234.
60. Chen R., Chung S.H. Computational studies of venom peptides targeting potassium channels // *Toxins (Basel).* 2015. Vol. 7, № 12. P. 5194–5211.
61. Meir A. et al. Ion Channels in Presynaptic Nerve Terminals and Control of Transmitter Release // *Physiol Rev.* 1999. Vol. 79, № 3. P. 1019–1088.
62. Kuo M.M.C. et al. Prokaryotic K⁺ channels: From crystal structures to diversity // *FEMS Microbiol. Rev.* 2005. Vol. 29, № 5. P. 961–985.
63. Long S.B., Campbell E.B., Mackinnon R. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel // *Science (80-.).* 2005. Vol. 309, № 5736. P. 897–903.
64. Doyle D. a et al. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. // *Science.* 1998. Vol. 280, № 5360. P. 69–77.
65. Chen X. et al. Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010. Vol. 107, № 25. P. 11352–11357.
66. Ling J., Yingliang W. Molecular mechanism of the sea anemone toxin ShK recognizing the Kv1.3 channel explored by docking and molecular dynamic simulations // *J. Chem. Inf. Model.* 2007. Vol. 47. P. 1967–1972.
67. Jiang Y. et al. X-ray structure of a voltage-dependent K⁺ channel // *Nature.* 2003. Vol. 423, № May. P. 33–41.
68. Visan V. et al. Mapping of maurotoxin binding sites on hKv1. 2, hKv1. 3, and hIKCa1 channels // *Mol. Pharmacol.* 2004. Vol. 66, № 5. P. 1103–1112.
69. 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. P. 1142–1154.
70. Khabiri M. et al. Charybdotoxin unbinding from the mKv1.3 potassium channel: A combined computational and experimental study // *J. Phys. Chem. B.* 2011. Vol. 115. P. 11490–11500.
71. Chen R. et al. Modeling the binding of three toxins to the voltage-gated potassium channel (Kv1.3) // *Biophys. J. Biophysical Society*, 2011. Vol. 101, № 11. P. 2652–2660.
72. Chen R., Chung S.-H. Molecular dynamics simulations of scorpion toxin recognition by the Ca(2+)-activated potassium channel KCa3.1. // *Biophys. J. Biophysical Society*, 2013. Vol. 105, № 8. P. 1829–1837.

73. Chen R., Chung S.-H. Binding modes of two scorpion toxins to the voltage-gated potassium channel kv1.3 revealed from molecular dynamics. // *Toxins (Basel)*. 2014. Vol. 6. P. 2149–2161.
74. Long S.B. et al. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. // *Nature*. 2007. Vol. 450, № 7168. P. 376–382.
75. Rashid M.H., Kuyucak S. Affinity and selectivity of ShK toxin for the Kv1 potassium channels from free energy simulations // *J. Phys. Chem. B*. 2012. Vol. 116, № 16. P. 4812–4822.
76. Pennington M.W. et al. A C-terminally amidated analogue of ShK is a potent and selective blocker of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 // *FEBS Lett.* Federation of European Biochemical Societies, 2012. Vol. 586, № 22. P. 3996–4001.
77. Chen R., Chung S.H. Engineering a potent and specific blocker of voltage-gated potassium channel Kv1.3, a target for autoimmune diseases // *Biochemistry*. 2012. Vol. 51. P. 1976–1982.
78. Rashid M.H. et al. A potent and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel: Prediction from free-energy simulations and experimental confirmation // *PLoS One*. 2013. Vol. 8, № 11.
79. Rashid M.H. et al. A potent and Kv1.3-selective analogue of the scorpion toxin HsTx1 as a potential therapeutic for autoimmune diseases. // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 4509.
80. Rashid H. et al. Free Energy Simulations of Binding of HsTx1 Toxin to Kv1 Potassium Channels: The Basis of Kv1 . 3 / Kv1 . 1 Selectivity Free Energy Simulations of Binding of HsTx1 Toxin to Kv1 Potassium // *J. Phys. Chem. B*. 2014. Vol. 116, № 16. P. 4812–4822.
81. Matthies D. et al. Single-particle cryo-EM structure of a voltage-activated potassium channel in lipid nanodiscs. // *Elife*. 2018. Vol. 7.
82. Tao X. et al. A gating charge transfer center in voltage sensors. // *Science*. 2010. Vol. 328, № 5974. P. 67–73.
83. Pau V. et al. Crystal structure of an inactivated mutant mammalian voltage-gated K⁺ channel. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. Vol. 24, № 10. P. 857–865.
84. Yu L. et al. Nuclear magnetic resonance structural studies of a potassium channel-charybdotoxin complex // *Biochemistry*. 2005. Vol. 44, № 48. P. 15834–15841.
85. Chen P.C., Kuyucak S. Mechanism and energetics of charybdotoxin unbinding from a potassium channel from molecular dynamics simulations // *Biophys. J. Biophysical Society*, 2009. Vol. 96, № 7. P. 2577–2588.
86. Chen P.-C., Kuyucak S. Accurate determination of the binding free energy for KcsA-charybdotoxin complex from the potential of mean force calculations with restraints. // *Biophys. J. Biophysical Society*, 2011. Vol. 100, № 10. P. 2466–2474.
87. Banerjee A. et al. Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K⁺ channel // *Elife*. 2013. Vol. 2. P. e00594.
88. Kohl B. et al. Toxicon Solid phase synthesis , NMR structure determination of a - KTx3 . 8 , its in silico docking to Kv1 . x potassium channels , and electrophysiological analysis provide insights into toxin-channel selectivity // *Toxicon*. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 101. P. 70–78.
89. Miller C. How ion channel proteins work // *Neuromodulation: The Biochemical Control of Neuronal Excitability* / ed. Kaczmarek L.K., Levitan I. Oxford University Press Inc.: New York, NY, USA, 1987. P. 39–63.

90. Sigworth F.J. Voltage gating of ion channels // Q. Rev. Biophys. 1994. Vol. 27, № 01. P. 1.
91. Bezanilla F. The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels.
92. Cui J. Voltage-Dependent Gating: Novel Insights from KCNQ1 Channels // Biophys. J. 2016. Vol. 110, № 1. P. 14–25.
93. Jensen M.O. et al. Mechanism of Voltage Gating in Potassium Channels // Science (80-.). 2012. Vol. 336, № 6078. P. 229–233.
94. Mannuzzu L.M., Moronne M.M., Isacoff E.Y. Direct Physical Measure of Conformational // Science (80-.). 1996. Vol. 4. P. 2–5.
95. Schoppa N. et al. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels // Science (80-.). 1992. Vol. 255, № 5052. P. 1712–1715.
96. Zagotta W.N., Hoshi T., Aldrich R.W. Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation. // J. Gen. Physiol. 1994. Vol. 103, № 2. P. 321–362.
97. Wang H. et al. Structural basis for modulation of Kv4 K⁺ channels by auxiliary KChIP subunits. // Nat. Neurosci. 2007. Vol. 10, № 1. P. 32–39.
98. Höllerer-Beitz G. et al. N-terminal deletions of rKv1.4 channels affect the voltage dependence of channel availability // Pflugers Arch. Eur. J. Physiol. 1999. Vol. 438, № 2. P. 141–146.
99. Sacco T., De Luca A., Tempia F. Properties and expression of Kv3 channels in cerebellar Purkinje cells // Mol. Cell. Neurosci. 2006. Vol. 33, № 2. P. 170–179.
100. Hoshi T., Zagotta W.N., Aldrich R.W. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation // Science (80-.). 1990. Vol. 250, № 4980. P. 533–538.
101. Zagotta W.N., Hoshi T., Aldrich R.W. Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB. // Science. 1990. Vol. 250, № 4980. P. 568–571.
102. Kurata H.T., Fedida D. A structural interpretation of voltage-gated potassium channel inactivation // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2006. Vol. 92, № 2. P. 185–208.
103. Cordero-Morales J.F. et al. Molecular driving forces determining potassium channel slow inactivation. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2007. Vol. 14, № 11. P. 1062–1069.
104. Mackinnon R. Potassium Channels and the Atomic Basis // Biosci. Rep. 2004. Vol. 24, № 2. P. 214–235.
105. Parsegian V.A. Ion-membrane interactions as structural forces. // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1975. Vol. 264. P. 161–171.
106. Morais-Cabral J.H., Zhou Y., MacKinnon R. Energetic optimization of ion conduction rate by the K⁺ selectivity filter. // Nature. 2001. Vol. 414, № 6859. P. 37–42.
107. Maljevic S., Wuttke T. V, Lerche H. Nervous system Kv7 disorders: breakdown of a subthreshold brake // J Physiol. 2008. Vol. 586, № 7. P. 1791–1801.
108. Miceli F. et al. Molecular pharmacology and therapeutic potential of neuronal Kv7-modulating drugs // Curr. Opin. Pharmacol. 2008. Vol. 8, № 1. P. 65–74.
109. Castle N. a. Pharmacological modulation of voltage-gated potassium channels as a therapeutic strategy. // Expert Opin. Ther. Pat. 2010. Vol. 20. P. 1471–1503.
110. Leung Y.M. Voltage-gated K⁺ channel modulators as neuroprotective agents // Life Sci. Elsevier Inc., 2010. Vol. 86, № 21–22. P. 775–780.
111. 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.
112. Koshy S. et al. Blocking Kv1.3 channels inhibits Th2 lymphocyte function and treats a rat model of asthma // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289. P. 12623–12632.
 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. Wulff H. et al. The voltage-gated Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS. 2003. Vol. 111, № 11. P. 1703–1713.
 115. Rangaraju S. et al. A systems pharmacology-based approach to identify novel Kv1.3 channel-dependent mechanisms in microglial activation // *J. Neuroinflammation.* 2017. Vol. 14, № 1. P. 128.
 116. Norton R.S., Pennington M.W., Beeton C. CHAPTER 10. Case Study 2: Transforming a Toxin into a Therapeutic: the Sea Anemone Potassium Channel Blocker ShK Toxin for Treatment of Autoimmune Diseases // *RSC Drug Discovery Series.* 2015. Vol. 2015, № 42. P. 255–274.
 117. Hagiwara S., Miyazaki S., Rosenthal N. Potassium Current and the Effect of Cesium on this Current during Anomalous Rectification of the Egg Cell Membrane of a Starfish // *J Gen Physiol.* 1976. Vol. 67, № 6. P. 621–638.
 118. Robertson D., Steinberg M. Potassium channel modulators: scientific applications and therapeutic promise // *J Med Chem.* 1990. Vol. 33, № 6. P. 1529–1541.
 119. Moczydlowski E., Lucchesi K., Ravindran A. An emerging pharmacology of peptide toxins targeted against potassium channels. // *J Membr Biol.* 1988. Vol. 105, № 2. P. 95–111.
 120. Gómez-Varela D. et al. Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity. // *Cancer Res.* 2007. Vol. 67, № 15. P. 7343–7350.
 121. Mackinnon R., Miller C. Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor // *Science (80-.).* 1989. Vol. 245, № 4924. P. 1382–1385.
 122. Swartz K.J. Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels // *Toxicon.* 2007. Vol. 49, № 2. P. 213–230.
 123. Swartz K.J., Mackinnon R. Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites // *Neuron.* 1997. Vol. 18, № 4. P. 665–673.
 124. Mouhat S. et al. Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels. // *Curr. Pharm. Des.* 2008. Vol. 14, № 24. P. 2503–2518.
 125. Bontems F. et al. Analysis of side-chain organization on a refined model of charybdotoxin: structural and functional implications. // *Biochemistry.* 1992. Vol. 31, № 34. P. 7756–7764.
 126. Renisio J.G. et al. Solution structure of potassium channel-inhibiting scorpion toxin Lq2 // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1999. Vol. 34, № 4. P. 417–426.
 127. Dauplais M. et al. Determination of the three-dimensional solution structure of noxiustoxin: analysis of structural differences with related short-chain scorpion toxins. // *Biochemistry.* 1995. Vol. 34, № 51. P. 16563–16573.
 128. Johnson B.A., Stevens S.P., Williamson J.M. Determination of the three-dimensional structure of margatoxin by ¹H, ¹³C, ¹⁵N triple-resonance nuclear

- magnetic resonance spectroscopy. // *Biochemistry*. 1994. Vol. 33, № 50. P. 15061–15070.
129. Pragl B. et al. Synthesis, characterization, and application of Cy-dye- and Alexa-dye-labeled hongotoxin1 analogues. The first high affinity fluorescence probes for voltage-gated K⁺ channels // *Bioconjug. Chem.* 2002. Vol. 13, № 3. P. 416–425.
 130. Lange A. et al. A concept for rapid protein-structure determination by solid-state NMR spectroscopy. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005. Vol. 44, № 14. P. 2089–2092.
 131. Krezel A. et al. Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: Caliper for probing channel geometry // *Protein Sci. a Publ. Protein Soc.* 1995. Vol. 4, № 8. P. 1478–1489.
 132. Jaravine V.A. et al. Three-Dimensional Structure of Toxin OSK1 from *Orthochirus scrobiculosus* Scorpion Venom // *Biochemistry*. 1997. Vol. 36, № 6. P. 1223–1232.
 133. Carrega L. et al. The impact of the fourth disulfide bridge in scorpion toxins of the alpha-KTx6 subfamily. // *Proteins*. 2005. Vol. 61, № 4. P. 1010–1023.
 134. Blanc E. et al. Solution structure of maurotoxin, a scorpion toxin from *Scorpio maurus*, with high affinity for voltage-gated potassium channels // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1997. Vol. 29, № 3. P. 321–333.
 135. Savarin P. et al. Structural and functional consequences of the presence of a fourth disulfide bridge in the scorpion short toxins: solution structure of the potassium channel inhibitor HsTX1. // *Protein Sci.* 1999. Vol. 8, № 12. P. 2672–2685.
 136. Guijarro J.I. et al. Solution structure of Pi4, a short four-disulfide-bridged scorpion toxin specific of potassium channels. // *Protein Sci.* 2003. Vol. 12, № 9. P. 1844–1854.
 137. Wu G. et al. Solution structure of BmP01 from the venom of scorpion *Buthus martensii* Karsch. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. Vol. 276. P. 1148–1154.
 138. Mouhat S. et al. Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. // *Biochem. J.* 2004. Vol. 378. P. 717–726.
 139. Gurrola G.B. et al. Structure, function, and chemical synthesis of *Vaejovis mexicanus* peptide 24: A novel potent blocker of Kv1.3 potassium channels of human T lymphocytes // *Biochemistry*. 2012. Vol. 51. P. 4049–4061.
 140. Faraldo-Gómez J.D. et al. Mechanism of Intracellular Block of the KcsA K⁺ Channel by Tetrabutylammonium: Insights from X-ray Crystallography, Electrophysiology and Replica-exchange Molecular Dynamics Simulations // *J. Mol. Biol.* 2007. Vol. 365, № 3. P. 649–662.
 141. Rossokhin A. et al. Interaction of d-Tubocurarine with Potassium Channels: Molecular Modeling and Ligand Binding // *Mol. Pharmacol.* 2006. Vol. 69, № 4. P. 1356–1365.
 142. Zhorov B.S., Tikhonov D.B. Ligand action on sodium, potassium, and calcium channels: role of permeant ions. // *Trends Pharmacol. Sci. Elsevier*, 2013. Vol. 34, № 3. P. 154–161.
 143. Lange W. et al. Refinement of the Binding Site and Mode of Action of the Anticonvulsant Retigabine on KCNQ K⁺ Channels // *Mol. Pharmacol.* 2009. Vol. 75, № 2. P. 272–280.
 144. Waldegger S. et al. Effect of Verapamil Enantiomers and Metabolites on Cardiac K⁺ Channels Expressed in *Xenopus*

- Oocytes // *Cell. Physiol. Biochem.* 1999. Vol. 9, № 2. P. 81–89.
145. 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, № 1. P. 5.
 146. Sánchez-Chapula J.A. et al. Molecular Determinants of Voltage-dependent Human Ether-a-Go-Go Related Gene (HERG) K⁺ Channel Block // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 26. P. 23587–23595.
 147. Wuttke T. V. The New Anticonvulsant Retigabine Favors Voltage-Dependent Opening of the Kv7.2 (KCNQ2) Channel by Binding to Its Activation Gate // *Mol. Pharmacol.* 2005. Vol. 67, № 4. P. 1009–1017.
 148. Lee H.C., Wang J.M., Swartz K.J. Interaction between extracellular Hanatoxin and the resting conformation of the voltage-sensor paddle in Kv channels. // *Neuron.* 2003. Vol. 40, № 3. P. 527–536.
 149. Middleton R.E. et al. Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. // *Biochemistry.* 2002. Vol. 41, № 50. P. 14734–14747.
 150. Takeuchi K. et al. Solution structure of omega-grammotoxin SIA, a gating modifier of P/Q and N-type Ca(2+) channel. // *J. Mol. Biol.* 2002. Vol. 321, № 3. P. 517–526.
 151. Xu C.-Q. et al. Turret and pore block of K⁺ channels: what is the difference? // *Trends Pharmacol. Sci.* 2003. Vol. 24, № 9. P. 446–448.
 152. Korolkova Y. V, Tseng G.-N., Grishin E. V. Unique interaction of scorpion toxins with the hERG channel. // *J. Mol. Recognit.* 2004. Vol. 17, № 3. P. 209–217.
 153. Bartok A., Panyi G., Varga Z. Potassium Channel Blocking Peptide Toxins from Scorpion Venom // *Scorpion Venoms*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. P. 493–527.
 154. 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.
 155. Zhou Q. et al. Blockage of voltage-gated K⁺ channels inhibits adhesion and proliferation of hepatocarcinoma cells. // *Int. J. Mol. Med.* 2003. Vol. 11, № 2. P. 261–266.
 156. Ouadid-Ahidouch H. et al. KV1.1 K⁺ Channels Identification in Human Breast Carcinoma Cells: Involvement in Cell Proliferation // *Biochem. Biophys. Res. Commun. Academic Press*, 2000. Vol. 278, № 2. P. 272–277.
 157. Abdul M., Santo A., Hoosein N. Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. // *Anticancer Res.* 2003. Vol. 23, № 4. P. 3347–3351.
 158. Fraser S.P. et al. Predominant expression of Kv1.3 voltage-gated K⁺ channel subunit in rat prostate cancer cell lines: electrophysiological, pharmacological and molecular characterisation. // *Pflugers Arch.* 2003. Vol. 446, № 5. P. 559–571.
 159. 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.
 160. Suzuki T., Takimoto K. Selective expression of HERG and Kv2 channels influences proliferation of uterine cancer cells. // *Int. J. Oncol.* 2004. Vol. 25, № 1. P. 153–159.
 161. Chang K.-W. et al. The increase of voltage-gated potassium channel Kv3.4 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma. // *J. Oral Pathol. Med.* 2003. Vol. 32, № 10. P. 606–611.
 162. Meyer R., Heinemann S.H. Characterization of an eag-like potassium channel in

- human neuroblastoma cells. // *J. Physiol.* 1998. Vol. 508 (Pt 1). P. 49–56.
163. Bianchi L. et al. hERG encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? // *Cancer Res.* 1998. Vol. 58, № 4. P. 815–822.
 164. Cherubini A. et al. HERG potassium channels are more frequently expressed in human endometrial cancer as compared to non-cancerous endometrium. // *Br. J. Cancer.* 2000. Vol. 83, № 12. P. 1722–1729.
 165. Smith G.A.M. et al. Functional up-regulation of HERG K⁺ channels in neoplastic hematopoietic cells. // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 21. P. 18528–18534.
 166. Pillozzi S. et al. HERG potassium channels are constitutively expressed in primary human acute myeloid leukemias and regulate cell proliferation of normal and leukemic hemopoietic progenitors. // *Leukemia.* 2002. Vol. 16, № 9. P. 1791–1798.
 167. 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.
 168. Shen B. et al. Treating autoimmune disorders with venom-derived peptides // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2017. Vol. 17, № 9. P. 1065–1075.
 169. Leanza L. et al. Targeting a mitochondrial potassium channel to fight cancer // *Cell Calcium.* 2015. Vol. 58, № 1. P. 131–138.
 170. Kuyucak S., Norton R.S. Computational approaches for designing potent and selective analogs of peptide toxins as novel therapeutics. // *Future Med. Chem.* 2014. Vol. 6, № 15. P. 1645–1658.
 171. Krasznai Z. Ion channels in T cells: from molecular pharmacology to therapy. // *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz).* Vol. 53, № 2. P. 127–135.
 172. Zhao Y. et al. Toxins Targeting the KV1.3 Channel: Potential Immunomodulators for Autoimmune Diseases // *Toxins (Basel).* 2015. Vol. 7, № 5. P. 1749–1764.
 173. Kuzmenkov A.I., Grishin E. V, Vassilevski A.A. Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins. // *Biochem. (Mosc).* . 2015. Vol. 80, № 13. P. 1764–1799.
 174. Luna-Ramírez K. et al. Structure, molecular modeling, and function of the novel potassium channel blocker urotoxin isolated from the venom of the Australian scorpion *Urodacus yaschenkoi*. // *Mol. Pharmacol.* 2014. Vol. 86, № 1. P. 28–41.
 175. Bhuyan R., Seal A. Molecular dynamics of Kv1.3 ion channel and structural basis of its inhibition by scorpion toxin-OSK1 derivatives // *Biophys. Chem. Elsevier B.V.*, 2015. Vol. 203. P. 1–11.
 176. Bartok A. et al. Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K⁺ channels // *Toxicon. Elsevier Ltd*, 2014. Vol. 87. P. 6–16.
 177. Abbas N. et al. A new Kaliotoxin selective towards Kv1.3 and Kv1.2 but not Kv1.1 channels expressed in oocytes // *Biochem. Biophys. Res. Commun. Elsevier Inc.*, 2008. Vol. 376, № 3. P. 525–530.
 178. Nikouee A. et al. Charybdotoxin and margatoxin acting on the human voltage-gated potassium channel hKv1.3 and its H399N mutant: an experimental and computational comparison. // *J. Phys. Chem. B.* 2012. Vol. 116, № 17. P. 5132–5140.
 179. Naganuma M. et al. Chronic multifocal demyelinating neuropathy associated with central nervous system demyelination // *Muscle Nerve.* 1991. Vol. 14, № 10. P. 953–959.
 180. Pérez-Verdaguer M. et al. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is a promising

- multitherapeutic target against human pathologies. // *Expert Opin. Ther. Targets*. 2016. Vol. 20, № 5. P. 577–591.
181. Varga Z. et al. Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells. // *Mol. Pharmacol*. 2012. Vol. 82, № 3. P. 372–382.
 182. Jaimes-Hoy L. et al. The Kv1.3 channel blocker Vm24 enhances muscle glucose transporter 4 mobilization but does not reduce body-weight gain in diet-induced obese male rats // *Life Sci*. 2017. Vol. 181. P. 23–30.
 183. Upadhyay S.K. et al. Selective Kv1.3 channel blocker as therapeutic for obesity and insulin resistance // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2013. Vol. 110, № 24. P. E2239–E2248.
 184. Quintero-Hernández V. et al. Scorpion venom components that affect ion-channels function. // *Toxicon*. NIH Public Access, 2013. Vol. 76. P. 328–342.
 185. Rodríguez De La Vega R.C., Possani L.D. Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels // *Toxicon*. 2004. Vol. 43. P. 865–875.
 186. Martins J.C. et al. Solution conformation of leiurotoxin I (scyllatoxin) by 1H nuclear magnetic resonance. Resonance assignment and secondary structure. // *FEBS Lett*. 1990. Vol. 260, № 2. P. 249–253.
 187. Gao B. et al. Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cystine knot fold // *Biosci. Rep*. 2013. Vol. 33, № 3. P. 513–527.
 188. Chen Z.-Y. et al. Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family. // *J. Biol. Chem*. 2012. Vol. 287, № 17. P. 13813–13821.
 189. Srinivasan K.N. et al. kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity. // *J. Biol. Chem*. 2002. Vol. 277, № 33. P. 30040–30047.
 190. Saucedo A.L. et al. New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing. // *J. Biol. Chem*. 2012. Vol. 287, № 15. P. 12321–12330.
 191. Novoseletsky V.N. et al. Modeling of the Binding of Peptide Blockers to Voltage-Gated Potassium Channels: Approaches and Evidence. // *Acta Naturae*. 2016. Vol. 8, № 2. P. 35–46.
 192. Tytgat J. et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. // *Trends Pharmacol. Sci*. 1999. Vol. 20, № 11. P. 444–447.
 193. Corona M. et al. A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*. // *FEBS Lett*. 2002. Vol. 532, № 1–2. P. 121–126.
 194. Yu M. et al. Peptide toxins and small-molecule blockers of BK channels. 2016. P. 56–66.
 195. Bontems F. et al. Three-dimensional structure of natural charybdotoxin in aqueous solution by 1H-NMR. Charybdotoxin possesses a structural motif found in other scorpion toxins. // *Eur. J. Biochem*. 1991. Vol. 196, № 1. P. 19–28.
 196. Tytgat J. et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α -KTx molecular subfamilies // *Trends Pharmacol. Sci*. 1999. Vol. 20, № November. P. 444–447.
 197. Romi-Lebrun R. et al. Characterization of four toxins from *Buthus martensi* scorpion

- venom, which act on apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} channels. // *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol. 245. P. 457–464.
198. Zhu S. et al. Molecular diversity and functional evolution of scorpion potassium channel toxins. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2011. Vol. 10, № 2. P. M110.002832.
 199. Lucian K. Ross. *Leiurus quinquestriatus* (Ehrenberg, 1828) // *The Scorpion Files.* 2008.
 200. Soroceanu L. et al. Use of chlorotoxin for targeting of primary brain tumors. // *Cancer Res.* 1998. Vol. 58, № 21. P. 4871–4879.
 201. Johnson D.G. et al. Inhibition of insulin release by scorpion toxin in rat pancreatic islets. // *Diabetes.* 1976. Vol. 25, № 3. P. 198–201.
 202. Ali S.A. et al. Structure-activity relationship of a highly selective peptidyl inhibitor of $\text{Kv}1.3$ voltage-gated K^{+} -channel from scorpion (*B. sindicus*) venom // *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2014. Vol. 20, № 1. P. 19–32.
 203. Takacs Z. et al. A designer ligand specific for $\text{Kv}1.3$ channels from a scorpion neurotoxin-based library. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106, № 52. P. 22211–22216.
 204. Grissmer S. et al. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K^{+} channels, types $\text{Kv}1.1$, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. // *Mol. Pharmacol.* 1994. Vol. 45, № 6. P. 1227–1234.
 205. Chandy K.G. et al. K^{+} channels as targets for specific immunomodulation // *Trends Pharmacol. Sci.* 2004. Vol. 25, № 5. P. 280–289.
 206. Koschak A. et al. Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom. // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 5. P. 2639–2644.
 207. Jouirou B. et al. Cobatoxin 1 from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K^{+} channels. // *Biochem. J.* 2004. Vol. 377. P. 37–49.
 208. Selisko B. et al. Cobatoxins 1 and 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann constitute a subfamily of potassium-channel-blocking scorpion toxins. // *Eur. J. Biochem.* 1998. Vol. 254, № 3. P. 468–479.
 209. Hendrixson B. Buthid scorpions of Saudi Arabia, with notes on other families (Scorpiones: Buthidae, Liochelidae, Scorpionidae). 2006. P. 33–120.
 210. Mouhat S. et al. K^{+} channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. // *Biochem. J.* 2005. Vol. 385. P. 95–104.
 211. Sadeghian H. Transient ophthalmoplegia following envenomation by the scorpion *Mesobuthus eupeus* // *Neurology.* 2003. Vol. 60, № 2. P. 346–347.
 212. Ozkan O., Carhan A. The neutralizing capacity of *Androctonus crassicauda* antivenom against *Mesobuthus eupeus* scorpion venom // *Toxicon.* 2008. Vol. 52. P. 375–379.
 213. Kuzmenkov A.I.A. et al. Variability of Potassium Channel Blockers in *Mesobuthus eupeus* Scorpion Venom with Focus on $\text{Kv}1.1$: AN INTEGRATED TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC STUDY. // *J. Biol. Chem.* 2015. Vol. 290, № 19. P. 12195–12209.
 214. Dai L. et al. Genomic organization of three novel toxins from the scorpion *Buthus martensi* Karsch that are active on potassium channels. // *Biochem. J.* 2000. Vol. 346, № 3. P. 805–809.

215. 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.
216. Diego-García E. et al. Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of β -KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. Vol. 65, № 1. P. 187–200.
217. Zhu S. et al. MeuTXK β 1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity // *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. Elsevier B.V., 2010. Vol. 1804, № 4. P. 872–883.
218. Regaya I. et al. Evidence for domain-specific recognition of SK and Kv channels by MTX and HsTx1 scorpion toxins. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 53. P. 55690–55696.
219. Fajloun Z. et al. Chemical synthesis and characterization of pi1, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* active on K⁺ channels // *Eur. J. Biochem.* 2000. Vol. 267. P. 5149–5155.
220. M'Barek S. et al. Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion toxin from *Pandinus imperator* that acts on K⁺ channels // *Eur. J. Biochem.* 2003. Vol. 270, № 17. P. 3583–3592.
221. Rashid H., Kuyucak S. Free Energy Simulations of Binding of HsTx1 Toxin to Kv1 Potassium Channels: The Basis of Kv1 . 3 / Kv1 . 1 Selectivity Free Energy Simulations of Binding of HsTx1 Toxin to Kv1 Potassium. 2014.
222. Chen R., Chung S.H. Structural Basis of the Selective Block of Kv1.2 by Maurotoxin from Computer Simulations // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 10. P. 1–8.
223. Bontems F. et al. Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. // *Science*. 1991. Vol. 254, № 5037. P. 1521–1523.
224. Zhou Y. et al. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel–Fab complex at 2.0 Å resolution // *Nature*. 2001. Vol. 414, № 6859. P. 43–48.
225. Nishida M. et al. Crystal structure of a Kir3.1-prokaryotic Kir channel chimera. // *EMBO J.* 2007. Vol. 26, № 17. P. 4005–4015.
226. Zhou Y., MacKinnon R. The occupancy of ions in the K⁺ selectivity filter: charge balance and coupling of ion binding to a protein conformational change underlie high conduction rates. // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 333, № 5. P. 965–975.
227. Giorgetti A., Carloni P. Molecular modeling of ion channels: Structural predictions // *Current Opinion in Chemical Biology*. 2003. Vol. 7, № 1. P. 150–156.
228. Cavasotto C.N., Phatak S.S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications // *Drug Discovery Today*. 2009. Vol. 14, № 13–14. P. 676–683.
229. Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. // *J. Mol. Biol.* 1990. Vol. 215, № 3. P. 403–410.
230. Pearson W.R. Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA. // *Methods Enzymol.* 1990. Vol. 183. P. 63–98.
231. Larkin M.A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0 // *Bioinformatics*. 2007. Vol. 23, № 21. P. 2947–2948.
232. Sali, A, Blundell T. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. // *J. Mol. Biol.* 1993. Vol. 234, № 3. P. 779–815.
233. Guex N., Peitsch M.C., Schwede T. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server // *Nucleic Acids Res.* 2003. Vol. 31, № 13. P. 3381–3385.

234. Baker D., Sali A. Protein structure prediction and structural genomics. // *Science*. 2001. Vol. 294, № 5540. P. 93–96.
235. Zachariae U. et al. The Molecular Mechanism of Toxin-Induced Conformational Changes in a Potassium Channel: Relation to C-Type Inactivation // *Structure*. 2008. Vol. 16, № May. P. 747–754.
236. 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.
237. 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. P. 2379–2389.
238. Delano W.L. The PyMOL Molecular Graphics System [Electronic resource]. 2002. P. <http://www.pymol.org>.
239. van der Crujisen E. a W. et al. Importance of lipid-pore loop interface for potassium channel structure and function. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110, № 32. P. 13008–13013.
240. Warnecke A. et al. PyTMs: a useful PyMOL plugin for modeling common post-translational modifications. // *BMC Bioinformatics*. 2014. Vol. 15, № 1. P. 370.
241. Vriend G. WHAT IF – a molecular modeling and drug design program // *J. Mol. Graph.* 1990. Vol. 8, № 1. P. 52–56.
242. Humphrey, W, Dalke, A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics // *J. Mol. Graph.* 1996. Vol. 14, № 1. P. 27–28.
243. Yang Y. et al. Multistate Structural Modeling and Voltage-Clamp Analysis of Epilepsy / Autism Mutation Kv10.2 – R327H Demonstrate the Role of This Residue in Stabilizing the Channel Closed State. 2013. Vol. 33, № 42. P. 16586–16593.
244. Turchenkov D.A., Bystrov V.S. Conductance Simulation of the Purinergic P2X 2 , P2X 4 , and P2X 7 Ionic Channels Using a Combined Brownian Dynamics and Molecular Dynamics Approach // *J. Phys. Chem. B*. 2014. Vol. 118, № 31. P. 9119–9127.
245. Kurczynska, M, Kotulska M. Ion Move Brownian Dynamics (IMBD)--simulations of ion transport // *Acta Bioeng Biomech*. 2014. Vol. 16, № 4. P. 107–116.
246. Cui M. et al. Brownian Dynamics Simulations of Interaction Between Scorpion Toxin Lq2 and Potassium Ion Channel. 2001. Vol. 80, № January.
247. 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.
248. Gordon D., Chen R., Chung S.-H. Computational methods of studying the binding of toxins from venomous animals to biological ion channels: theory and applications. // *Physiol. Rev*. 2013. Vol. 93. P. 767–802.
249. Chung S.-H., Kuyucak S. Ion channels: recent progress and prospects. // *Eur. Biophys. J*. 2002. Vol. 31, № 4. P. 283–293.
250. Song Y. et al. Energetic and Dynamic Analysis of Transport of Na⁺ and K⁺ through a Cyclic Peptide Nanotube in Water and in Lipid Bilayers. // *J. Phys. Chem. B*. 2016. Vol. 120, № 46. P. 11912–11922.
251. Jakobsson E., Chiu S.W. Stochastic theory of ion movement in channels with single-ion occupancy. Application to sodium permeation of gramicidin channels. // *Biophys. J*. 1987. Vol. 52, № 1. P. 33–45.

252. Chiu S.W., Novotny J.A., Jakobsson E. The nature of ion and water barrier crossings in a simulated ion channel. // *Biophys. J.* 1993. Vol. 64, № 1. P. 98–109.
253. Veresov V.G. A stochastic simulation of direct ion passage through a sodium channel. // *Membr. Cell Biol.* 1997. Vol. 11, № 1. P. 101–113.
254. Boronovsky S.E., Seraya I.P., Nartsissov Y.R. Brownian dynamic model of the glycine receptor chloride channel: effect of the position of charged amino acids on ion membrane currents. // *Syst. Biol. (Stevenage)*. 2006. Vol. 153, № 5. P. 394–397.
255. Taylor R.D., Jewsbury P.J., Essex J.W. A review of protein-small molecule docking methods // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 2002. Vol. 16, № 3. P. 151–166.
256. Pentelute B.L. et al. Total chemical synthesis and X-ray structure of kalitoxin by racemic protein crystallography // *Chem. Commun.* 2010. Vol. 46, № 43. P. 8174–8176.
257. Andrusier N. et al. Principles of flexible protein-protein docking // *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2008. Vol. 73, № 2. P. 271–289.
258. Bonvin A.M. Flexible protein–protein docking // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006. Vol. 16, № 2. P. 194–200.
259. Gray J.J. High-resolution protein–protein docking // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2006. Vol. 16, № 2. P. 183–193.
260. Morris G.M. et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function // *J. Comput. Chem.* 1998. Vol. 19, № 14. P. 1639–1662.
261. Gray J.J. et al. Protein-protein docking with simultaneous optimization of rigid-body displacement and side-chain conformations // *J. Mol. Biol.* 2003. Vol. 331, № 1. P. 281–299.
262. Palma P.N. et al. BiGGER: a new (soft) docking algorithm for predicting protein interactions. // *Proteins*. 2000. Vol. 39, № 4. P. 372–384.
263. Dominguez C., Boelens R., Bonvin A.M.J.J. HADDOCK: A protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125, № 7. P. 1731–1737.
264. Pierce B.G. et al. ZDOCK server: interactive docking prediction of protein–protein complexes and symmetric multimers // *Bioinformatics*. 2014. P. btu097.
265. Mouhat S. et al. The “functional” dyad of scorpion toxin Pil is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels. // *Biochem. J.* 2004. Vol. 377. P. 25–36.
266. Chen P.C., Kuyucak S. Developing a comparative docking protocol for the prediction of peptide selectivity profiles: Investigation of potassium channel toxins // *Toxins (Basel)*. 2012. Vol. 4. P. 110–138.
267. Пырков Т.В. et al. Молекулярный докинг: роль невалентных взаимодействий в образовании комплексов белков с нуклеотидами и пептидами // *Биоорг. химия*. 2010. Vol. 36, № 4. P. 482–492.
268. Zhong H., Tran L.M., Stang J.L. Induced-fit docking studies of the active and inactive states of protein tyrosine kinases. // *J. Mol. Graph. Model.* 2009. Vol. 28, № 4. P. 336–346.
269. Wu B. et al. Mapping the Interaction Anatomy of BmP02 on Kv1.3 Channel // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6, № 1. P. 29431.
270. Dantas D. et al. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: cDNA cloning, homology

- modeling, dynamic simulations and docking // Biochem. Biophys. Res. Commun. Elsevier Inc., 2013. Vol. 430, № 1. P. 113–118.
271. Freire M.C.L.C. et al. Molecular basis of Tityus stigmurus alpha toxin and potassium channel Kv1.2 interactions // J. Mol. Graph. Model. 2019. Vol. 87. P. 197–203.
 272. Shiau Y.-S. et al. Structural Basis of Binding and Inhibition of Novel Tarantula Toxins in Mammalian Voltage-Dependent Potassium Channels // Chem. Res. Toxicol. 2003. Vol. 16, № 10. P. 1217–1225.
 273. Peretz A. et al. Targeting the voltage sensor of Kv7.2 voltage-gated K⁺ channels with a new gating-modifier // Proc. Natl. Acad. Sci. 2010. Vol. 107, № 35. P. 15637–15642.
 274. Comeau S.R. et al. ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. // Bioinformatics. 2004. Vol. 20, № 1. P. 45–50.
 275. Liao Q. et al. Novel Kunitz-like Peptides Discovered in the Zoanthid *Palythoa caribaeorum* through Transcriptome Sequencing // J. Proteome Res. 2018. Vol. 17, № 2. P. 891–902.
 276. Burger C. et al. Time-resolved nuclear dynamics in bound and dissociating acetylene. // Struct. Dyn. (Melville, N.Y.). American Institute of Physics, 2018. Vol. 5, № 4. P. 044302.
 277. Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C. An overview of the Amber biomolecular simulation package // Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 2013. Vol. 3, № 2. P. 198–210.
 278. Brooks B.R. et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations // J. Comput. Chem. 1983. Vol. 4, № 2. P. 187–217.
 279. Pronk S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. 2013. Vol. 29, № 7. P. 845–854.
 280. Phillips J.C. et al. Scalable molecular dynamics with NAMD. // J. Comput. Chem. 2005. Vol. 26, № 16. P. 1781–1802.
 281. Orozco M. A theoretical view of protein dynamics. // Chem. Soc. Rev. 2014. Vol. 43, № 14. P. 5051–5066.
 282. Tang X., Koenig P.H., Larson R.G. Molecular dynamics simulations of sodium dodecyl sulfate micelles in water-the effect of the force field. // J. Phys. Chem. B. 2014. Vol. 118, № 14. P. 3864–3880.
 283. Brooks, BR, Brooks, CL 3rd, Mackerell, AD Jr, Nilsson, L, Petrella, RJ, Roux, B, Won, Y, Archontis, G, Bartels, C, Boresch, S, Caflisch, A, Caves, L, Cui, Q, Dinner, AR, Feig, M, Fischer, S, Gao, J, Hodoscek, M, Im, W, Kuczera, K, Lazaridis, T, Ma, J, Ovc M. CHARMM: the biomolecular simulation program // J. Comput. Chem. 2009. Vol. 30, № 10. P. 1545–1614.
 284. Best R.B. et al. Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 Dihedral Angles // J. Chem. Theory Comput. 2012. Vol. 8, № 9. P. 3257–3273.
 285. Bemporad D. et al. Vstx1, a modifier of Kv channel gating, localizes to the interfacial region of lipid bilayers. // Biochemistry. 2006. Vol. 45, № 39. P. 1844–55.
 286. Eriksson M. a L., Roux B. Modeling the Structure of Agitoxin in Complex with the Shaker K⁺ Channel: A Computational Approach Based on Experimental Distance // Biophys. J. 2002. Vol. 83, № 5. P. 2595–2609.
 287. Wu Y. et al. Simulation of the interaction between ScyTx and small conductance

- calcium-activated potassium channel by docking and MM-PBSA. // *Biophys. J.* 2004. Vol. 87, № 1. P. 105–112.
288. Almeida D.D. et al. Molecular approaches for structural characterization of a new potassium channel blocker from *Tityus stigmurus* venom: cDNA cloning, homology modeling, dynamic simulations and docking. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. Vol. 430, № 1. P. 113–118.
 289. Rutkai G., Kristóf T. Dynamic Monte Carlo simulation in mixtures. // *J. Chem. Phys.* 2010. Vol. 132, № 10. P. 104107.
 290. Harrison R.L. Introduction To Monte Carlo Simulation. // *AIP Conf. Proc. NIH Public Access*, 2010. Vol. 1204. P. 17–21.
 291. Earl D.J., Deem M.W. Monte Carlo Simulations // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 2008. Vol. 443. P. 25–36.
 292. Hwang H., Schatz G.C., Ratner M.A. Kinetic lattice grand canonical Monte Carlo simulation for ion current calculations in a model ion channel system. // *J. Chem. Phys.* 2007. Vol. 127, № 2. P. 024706.
 293. Csányi E. et al. Current and selectivity in a model sodium channel under physiological conditions: Dynamic Monte Carlo simulations. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. Vol. 1818, № 3. P. 592–600.
 294. Boda D., Henderson D., Gillespie D. The role of solvation in the binding selectivity of the L-type calcium channel. // *J. Chem. Phys.* 2013. Vol. 139, № 5. P. 055103.
 295. Andreucci D. et al. Monte Carlo study of gating and selection in potassium channels. // *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.* 2011. Vol. 84, № 2 Pt 1. P. 021920.
 296. 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.
 297. Gobbi M. et al. Monte Carlo method for predicting of cardiac toxicity: hERG blocker compounds // *Toxicol. Lett.* 2016. Vol. 250–251. P. 42–46.
 298. Miloshevsky G. V., Jordan P.C. Open-State Conformation of the KcsA K⁺ Channel: Monte Carlo Normal Mode Following Simulations // *Structure.* 2007. Vol. 15, № 12. P. 1654–1662.
 299. 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, № 1. P. 5.
 300. Mohamadi F. et al. MacroModel - an Integrated Software System for Modeling Organic and Bioorganic Molecules Using Molecular Mechanics // *J. Comput. Chem.* 1990. Vol. 11, № 4. P. 440–467.
 301. Knight J.L., Brooks C.L. λ -Dynamics free energy simulation methods // *J. Comput. Chem.* 2009. Vol. 30, № 11. P. 1692–1700.
 302. Torrie G.M., Valleau J.P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling // *J. Comput. Phys.* 1977. Vol. 23, № 2. P. 187–199.
 303. Kumari R., Kumar R., Lynn A. G-mmpbsa -A GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations // *J. Chem. Inf. Model.* 2014. Vol. 54, № 7. P. 1951–1962.
 304. Han S. et al. Structural basis of a potent peptide inhibitor designed for Kv1.3 channel, a therapeutic target of autoimmune disease // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. P. 19058–19065.
 305. Shen W. et al. Kv1.2-containing K⁺ channels regulate subthreshold excitability of

- striatal medium spiny neurons. // J. Neurophysiol. 2004. Vol. 91, № September 2003. P. 1337–1349.
306. Jin L., Wu Y. Molecular mechanism of δ -dendrotoxin-potassium channel recognition explored by docking and molecular dynamic simulations // J. Mol. Recognit. 2011. Vol. 24, № 1. P. 101–107.
 307. Hidalgo P., Mackinnon R. Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor // Science (80-.). 1995. Vol. 268, № 5208. P. 307–310.
 308. Yi H. et al. Molecular basis of inhibitory peptide maurotoxin recognizing Kv1.2 channel explored by ZDOCK and molecular dynamic simulations // Proteins Struct. Funct. Genet. 2008. Vol. 70, № 3. P. 844–854.
 309. Yin S.J. et al. Different residues in channel turret determining the selectivity of ADWX-1 inhibitor peptide between Kv1.1 and Kv1.3 channels // J. Proteome Res. 2008. Vol. 7. P. 4890–4897.
 310. 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.
 311. Chernova M.N. et al. Distribution in rat brain of binding sites of kalitoxin, a blocker of Kv1.1 and Kv1.3 alpha-subunits. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1999. Vol. 291, № 3. P. 943–952.
 312. Shakkottai V. et al. Design and Characterization of a Highly Selective Peptide Inhibitor of the Small Conductance Calcium-activated K⁺ Channel, SkCa2 // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 46. P. 43145–43151.
 313. Chandy K.G. et al. Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants. // Toxicon. 2001. Vol. 39, № 9. P. 1269–1276.
 314. 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.
 315. 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.
 316. Huys I., Tytgat J. Evidence for a function-specific mutation in the neurotoxin, parabutoxin 3. // Eur. J. Neurosci. 2003. Vol. 17, № 9. P. 1786–1792.
 317. 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.
 318. Cui M. et al. Brownian Dynamics Simulations of the Recognition of the Scorpion Toxin P05 with the Small-conductance Calcium-activated Potassium Channels // J Mol Biol. 2002. Vol. 318, № 2. P. 417–428.
 319. Kästner J. Umbrella sampling // Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 2011. Vol. 1, № 6. P. 932–942.
 320. Lemkul J.A. Umbrella Sampling. GROMACS Tutorial [Electronic resource] // <http://bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/gmx-tutorials/umbrella/index.html>.
 321. Nekrasova O. V et al. Complexes of Peptide Blockers with Kv1.6 Pore Domain: Molecular Modeling and Studies with KcsA-Kv1.6 Channel. // J. Neuroimmune Pharmacol. 2016.
 322. 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.
323. Novoseletsky V.N. et al. Modeling of the Binding of Peptide Blockers to Voltage-Gated Potassium Channels: Approaches and Evidence. // *Acta Naturae*. 2016. Vol. 8, № 2. P. 35–46.
 324. Gonzalez C. et al. K⁺ channels: Function-structural overview // *Compr. Physiol*. 2012. Vol. 2, № 3. P. 2087–2149.
 325. Rashid M.H., Kuyucak S. Free energy simulations of binding of HsTx1 toxin to Kv1 potassium channels: the basis of Kv1.3/Kv1.1 selectivity. // *J. Phys. Chem. B*. 2014. Vol. 118, № 3. P. 707–716.
 326. Volyntseva A.D. et al. Molecular modeling of interactions of agitoxin 2 with Kv1.3 voltage-gated potassium channel // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull*. 2017. Vol. 72, № 1. P. 25–29.
 327. Rashid M.H., Mahdavi S., Kuyucak S. Computational Studies of Marine Toxins Targeting Ion Channels. 2013. P. 848–869.
 328. Xiang Z. Advances in homology protein structure modeling. // *Curr. Protein Pept. Sci. NIH Public Access*, 2006. Vol. 7, № 3. P. 217–227.
 329. Webb B. et al. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER // *Current Protocols in Bioinformatics*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016. P. 5.6.1-5.6.37.
 330. Gao Y., Garcia M.L. Interaction of Agitoxin2, Charybdotoxin, and Iberitoxin with Potassium Channels: Selectivity between Voltage- Gated and Maxi-K Channels // *Proteins*. 2003. Vol. 52, № 2. P. 146–154.
 331. Rashid M.H., Kuyucak S. Affinity and selectivity of ShK toxin for the Kv1 potassium channels from free energy simulations. // *J. Phys. Chem. B*. 2012. Vol. 116, № 16. P. 4812–4822.
 332. Wang X. et al. Mesomartoxin , a new Kv 1.2-selective scorpion toxin interacting with the channel selectivity filter // *Biochem. Pharmacol. Elsevier Inc.*, 2015. Vol. 93, № 2. P. 232–239.
 333. 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.
 334. Kohl B. et al. Solid phase synthesis, NMR structure determination of α -KTx3.8, its in silico docking to Kv1.x potassium channels, and electrophysiological analysis provide insights into toxin-channel selectivity. // *Toxicon*. 2015. Vol. 101. P. 70–78.
 335. MacKinnon R. et al. Structural Conservation in Prokaryotic and Eukaryotic Potassium Channels // *Science* (80-.). 1998. Vol. 280, № 5360. P. 106–109.
 336. Aiyar J. et al. Topology of the Pore-Region of a K⁺ Channel Revealed by the NMR-Derived Structures of Scorpion Toxins // *Neuron*. 1995. Vol. 15, № 5. P. 1169–1181.
 337. Ranganathan R., Lewis J.H., Mackinnon R. Spatial Localization of the K⁺ Channel Selectivity Filter by Mutant Cycle – Based Structure Analysis // *Neuron*. 1996. Vol. 16, № 1. P. 131–139.
 338. Naranjo D., Miller C. A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a Shaker K⁺ channel // *Neuron*. 1996. Vol. 16. P. 123–130.
 339. Aiyar J. et al. The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule // *J. Biol. Chem*. 1996. Vol. 271. P. 31013–31016.
 340. Lipkind G.M., Fozzard H. a. A model of scorpion toxin binding to voltage-gated K⁺

- channels // J. Membr. Biol. 1997. Vol. 158, № 3. P. 187–196.
341. Gross A., Mackinnon R. Agitoxin Footprinting the Shaker Potassium Channel Pore // Neuron. 1996. Vol. 16. P. 399–406.
342. Rashid M.H., Kuyucak S. Free energy simulations of binding of HsTx1 toxin to Kv1 potassium channels: the basis of Kv1.3/Kv1.1 selectivity. // J. Phys. Chem. B. 2014. Vol. 118, № 3. P. 707–716.
343. Gilquin B. et al. Structure of the BgK-Kv1.1 complex based on distance restraints identified by double mutant cycles. Molecular basis for convergent evolution of Kv1 channel blockers. // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 40. P. 37406–37413.
344. Eriksson M.A.L., Roux B. Modeling the structure of agitoxin in complex with the Shaker K⁺ channel: a computational approach based on experimental distance restraints extracted from thermodynamic mutant cycles. // Biophys. J. 2002. Vol. 83, № 5. P. 2595–2609.