

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Беркут Антонина Анатольевна

**Молекулярные основы взаимодействия нейротоксинов
паукообразных с потенциал-чувствительными натриевыми
каналами**

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в лаборатории молекулярных инструментов для нейробиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук».

Научный руководитель – *Василевский Александр Александрович, кандидат химических наук*

Официальные оппоненты – *Жоров Борис Соломонович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник (консультант) Института эволюционной физиологии и биохимии имени И.М. Сеченова РАН*

Максимов Георгий Владимирович, доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Шалыгин Алексей Вадимович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории ионных каналов клеточных мембран Института цитологии РАН

Защита состоится __ декабря 2019 года в __ ч на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр.24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Москва, Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/244534795/>.

Автореферат разослан « » октября 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Уже более 60 лет потенциал-чувствительные натриевые каналы (Na_v)¹ привлекают интерес научного сообщества. Они играют ключевую роль в проведении сигнала в электровозбудимых клетках и, как следствие, выполняют ряд важных физиологических функций: обеспечивают сокращение скелетных мышц, биение сердца, ощущение боли, осязание, секрецию гормонов и многое другое. Поэтому мутации, приводящие к неправильному функционированию Na_v , являются причиной ряда серьезных заболеваний (каналопатий): синдрома удлиненного интервала QT, синдрома Бругада, различных болевых расстройств, синдрома Драве.

Na_v образованы из нескольких субъединиц: основной α -субъединицы и одной или нескольких вспомогательных β -субъединиц (Рисунок 1). α -Субъединица состоит из четырех гомологичных повторов, в каждый из которых входят шесть трансмембранных сегментов. 5 и 6 сегменты (S5–S6) всех повторов составляют единый поровый домен (ПД), который обеспечивает селективное проведение ионов натрия. В свою очередь, первые четыре трансмембранных сегмента (S1–S4) каждого повтора образуют потенциал-чувствительный домен (ПЧД), который отвечает за способность канала реагировать на изменение мембранного потенциала.

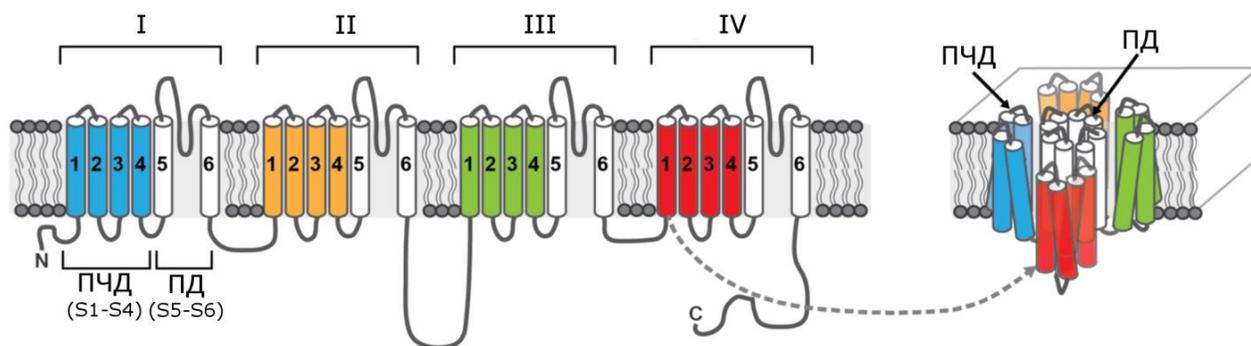


Рисунок 1. Организация α -субъединицы Na_v . ПЧД – потенциал-чувствительный домен, ПД – поровый домен.

Важная роль Na_v в различных патологических процессах во многом определила интерес ученых к лигандам этих каналов. Так, в настоящее время из яда многих ядовитых животных (пауков, скорпионов, конусов и других) выделено большое число соединений, способных действовать на Na_v . Они различаются по структуре, по характеру воздействия на канал, по селективности. Некоторые лиганды Na_v избирательно действуют на каналы представителей разных таксонов, например, млекопитающих или насекомых. Тем более удивительно, что они способны различить

¹ Принятые сокращения: Na_v – потенциал-чувствительные натриевые каналы; МГП – молекулярный гидрофобный потенциал; ПД – поровый домен; ПЧД – потенциал-чувствительный домен.

конкретные изоформы Na_v , которых у человека в настоящее время известно девять. Кроме того, структурно родственные токсины способны по-разному действовать на Na_v : физически блокировать пору канала, облегчать или затруднять активацию, ингибировать инактивацию. Поэтому выявление факторов, определяющих механизм действия и селективность лигандов Na_v , является важным для разработки лекарств и биопестицидов.

Таким образом, изучение структурных особенностей и молекулярных механизмов действия лигандов Na_v служит актуальной научной задачей. С фундаментальной точки зрения решение этой задачи позволит использовать такие соединения как молекулярные инструменты изучения Na_v . С прикладной точки зрения создание селективных лигандов позволит разработать лекарственные препараты с минимумом побочных эффектов, а информация о механизме и характере их действия даст возможность использовать эти лиганды для тонкой подстройки работы канала в случае каналопатий.

Объекты исследования

Объектами исследования являются две группы нейротоксинов паукообразных:

- 1) α -токсины скорпионов, ингибирующие инактивацию Na_v , которые связываются с ПЧД-IV Na_v и классифицируются на основании своей таксономической селективности (млекотоксины, инсектотоксины, α -подобные токсины);
- 2) токсины пауков, ингибирующие активацию Na_v , которые связываются с мембранами и ПЧД-II Na_v (мембрано-опосредованный механизм действия).

Цель и задачи исследования

Целью данной работы являлось определение ключевых структурных особенностей токсинов паукообразных и механизма их действия на потенциал-чувствительные натриевые каналы.

В соответствии с целью были поставлены следующие задачи:

- Выявить структурные особенности нейротоксинов паукообразных (α -токсинов скорпионов и ингибиторов активации Na_v из пауков), определяющие их селективность в отношении Na_v млекопитающих и насекомых.
- Изучить молекулярный механизм действия токсинов паукообразных, модифицирующих активацию и/или инактивацию Na_v .
- Спроектировать и путем направленного мутагенеза получить производные α -токсинов скорпионов, специфично действующие на Na_v млекопитающих или насекомых.

Научная новизна и практическая значимость работы

Выявлены ключевые структурные особенности α -токсинов скорпионов, определяющие их селективность и механизм действия. Показано, что селективность действия α -токсинов скорпионов в отношении Na_v насекомых и млекопитающих зависит от свойств их молекулярной поверхности. Выделен особый фрагмент, названный «модулем специфичности», свойства которого определяют таксономическую селективность α -токсинов скорпионов: у млекотоксинов модуль специфичности более гидрофилен и подвижен, чем у инсектотоксинов. Путем изменения свойств молекулярной поверхности на основе α -подобного токсина получены селективные лиганды Na_v млекопитающих и насекомых.

Исследован молекулярный механизм действия уникального ингибитора активации Na_v из яда паука *Heriades melloteei*, токсина Hm-3. Выявлены аминокислотные остатки Hm-3, ответственные за взаимодействие токсина с мембраной и каналом. Показан мембрано-опосредованный механизм действия токсина.

Выделен новый рецепторный сайт Na_v , локализованный в ПЧД-I Na_v . Hm-3 является первым селективным лигандом Na_v , воздействующим на данный сайт.

Выдвинута и подтверждена гипотеза о том, что ингибиторы активации Na_v способны подавлять aberrантные токи, возникающие в мутантных Na_v и проходящие через ПЧД канала (ω -токи).

Информация о структурно-функциональных особенностях α -токсинов скорпионов и ингибиторов активации Na_v из пауков, а также их механизме действия, может найти применение в сельском хозяйстве при разработке биопестицидов, а также в фармацевтике при создании лекарств от ряда орфанных заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. Показана модульная организация α -токсинов скорпионов, ингибиторов инактивации Na_v . Селективность действия α -токсинов скорпионов в отношении Na_v насекомых или млекопитающих определяют физико-химические свойства модуля специфичности, такие как подвижность и гидрофильность поверхности.
2. Получены производные α -токсина скорпиона *Mesobuthus eupeus* ВеМ9, характеризующиеся высокой избирательностью действия в отношении Na_v насекомых и/или млекопитающих.
3. Исследован механизм действия Hm-3, уникального ингибитора активации Na_v из яда паука *Heriades melloteei*. Токсин связывается с липидной мембраной и ПЧД повтора I, препятствуя активации каналов.
4. Hm-3 ингибирует aberrантные ω -токи, возникающие в Na_v с мутациями в ПЧД-I.

Личный вклад автора

Личный вклад заключался в анализе данных литературы, участии в проведении экспериментов, получении и анализе экспериментальных данных, а также подготовке научных публикаций.

Апробация работы и научные публикации

Работа прошла апробацию на открытом семинаре отдела молекулярной нейробиологии ИБХ РАН, а также на открытом семинаре кафедры биофизики МГУ имени М.В. Ломоносова. Результаты работы изложены в 6 статьях, опубликованных в рецензируемых научных журналах, и представлены на 8 научных конференциях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 120 страницах, содержит 30 рисунков и 15 таблиц, имеет традиционную структуру и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, выводы и список литературы, включающий 353 источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты и обсуждение

Изучение структурно-функциональных особенностей α -токсинов скорпионов

Изучение динамических свойств молекулярной поверхности α -токсинов скорпионов

Для выявления физико-химических свойств α -токсинов скорпионов, ответственных за селективность их действия в отношении млекопитающих и насекомых, была составлена база данных α -токсинов с известным профилем специфичности. Анализ литературы позволил выявить 27 таких токсинов (Рисунок 2): 8 млекотоксинов, 6 инсектотоксинов и 13 α -подобных токсинов, воздействующих на обе группы животных. Для полипептидов, пространственная структура которых была неизвестна, в сотрудничестве с лабораторией моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН были построены молекулярные модели по гомологии с изученными токсинами.

В сотрудничестве с той же лабораторией был проведен анализ подвижности молекул α -токсинов различных групп с помощью ковариантного анализа траекторий молекулярной динамики в ячейке с явно заданным растворителем и необходимыми противоионами. Расчет проводили в программе GROMACS и использовали силовое поле Gromos 96 (45a3) и SPC-модель (single point charge model) для молекул растворителя. Для каждого полипептида расчет длился 60 нс: за первые 20 нс происходила полная релаксация системы, а следующие 40 нс использовали для анализа

нормальных мод. Этот анализ позволил выявить в структуре токсинов три области, движущиеся относительно независимо друг от друга, а именно: 1) петлю, содержащую остатки 8–12 (RT-петлю; далее везде нумерация по аминокислотной последовательности токсина Aah2), и C-концевую область (остатки 56–64); 2) $\beta 2$ – $\beta 3$ петлю (остатки 39–43); и 3) остальную часть молекулы (ее «сердцевину»). На основе анализа их подвижности мы смогли заключить, что структура α -токсинов скорпионов состоит из двух динамических модулей: «модуля специфичности» и «сердцевинного модуля».

Групповой анализ конформационной подвижности позволил выявить характерные свойства различных групп α -токсинов скорпионов. Мы обнаружили, что млекотоксины имеют наиболее конформационно гибкие модули специфичности, в частности, их RT-петля имеет самую высокую амплитуду движения по сравнению с другими группами α -токсинов (Рисунок 3).

Сравнение аминокислотных последовательностей α -токсинов скорпионов позволило выявить аминокислотные остатки, по-видимому, определяющие высокую подвижность RT-петли млекотоксинов: в позициях 4 и 17 (по обе стороны от RT-петли) у млекотоксинов, как правило, расположены остатки глицина, играющие роль «шарниров», в то время как у инсекто- и α -подобных токсинов здесь находятся более объемные остатки аланина, валина или фенилаланина.

Таким образом, было показано, что α -токсины скорпионов состоят из двух динамических модулей, соответствующих сердцевинному модулю и модулю специфичности, подвижность которого убывает в ряду: млекотоксины, α -подобные токсины, инсектотоксины. При этом подвижность RT-петли, входящей в модуль специфичности, определяют два остатка глицина, фланкирующие эту петлю.

Таким образом, модуль специфичности млекотоксинов более гидрофильный, чем модуль специфичности токсинов, активных в отношении насекомых, что, как будет показано далее, играет важную роль в распознавании определенных Na_v .

Использование анализа подвижности и гидрофильности модуля специфичности для предсказания селективности α -токсинов скорпионов

Стандартным подходом для предсказания селективности α -токсинов скорпионов является анализ их аминокислотных последовательностей. Для трех α -токсинов скорпионов (BeM9, MeuNaTx-1, MeuNaTx-2), которые не вошли в выборку предыдущих этапов, был использован анализ конформационной подвижности и гидрофильности их поверхности (параметры, которые мы изучали на предыдущих этапах) для определения их селективности.

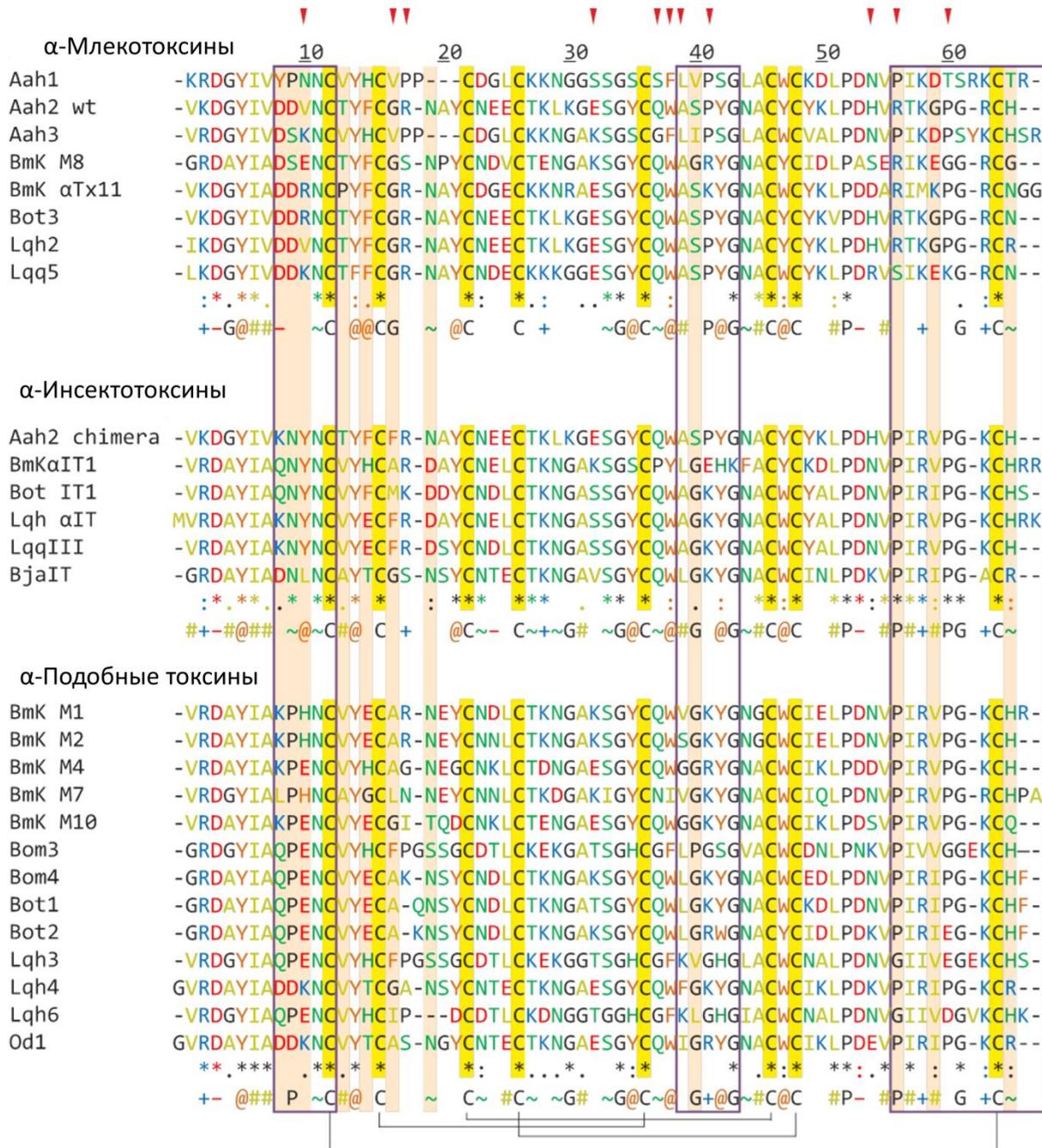


Рисунок 2. Сравнение аминокислотных последовательностей α-токсинов скорпионов. Остатки, образующие модуль специфичности, заключены в вертикальные прямоугольники. Остатки окрашены в зависимости от их свойств: отрицательно заряженные («-»; D и E), положительно заряженные («+»; K и R), полярные незаряженные («~»; H, N, Q, S и T), гидрофобные ароматические («@»; F, W и Y), гидрофобные алифатические («#»; A, I, L, M и V) и **остатки пулицестина**. Под каждой группой приведена «консенсусная» последовательность, в которой соответствующий знак ставится при встречаемости у $\geq 75\%$ в пределах данной группы. Остатки, консервативные в пределах одной группы, но отличающиеся между группами, показаны на персиковом фоне. Остатки, подверженные, согласно работам Жу¹ и Вайнбергера², положительному отбору, отмечены красными стрелочками над последовательностями.

¹ Zhu S., Bosmans F., Tytgat J. (2004) Adaptive evolution of scorpion sodium channel toxins. J. Mol. Evol. 58, 145–153

² Weinberger H., Moran Y., Gordon D., Turkov M., Kahn R., Gurevitz M. (2010) Positions under positive selection. Key for selectivity and potency of scorpion α-toxins. Mol. Biol. Evol. 27, 1025–1034

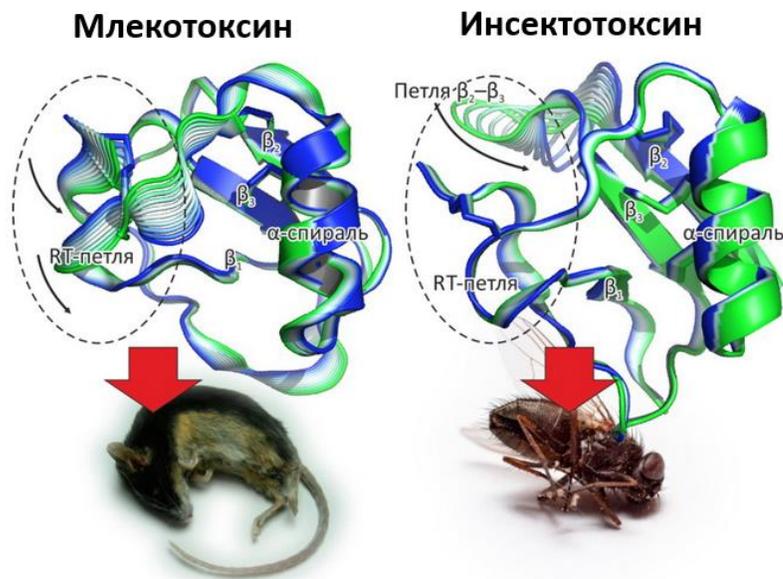


Рисунок 3. Различная подвижность модулей специфичности (обозначены пунктирными овалами) млеко- и инсектотоксинов. Показаны изменения конформации молекул токсинов вдоль первой (самой низкочастотной) моды, полученной из ковариантного анализа траекторий молекулярной динамики для типичных млекотоксина и инсектотоксина. Изображены две «экстремальные» структуры, характерные для данной моды и показанные зеленым и синим, и несколько промежуточных сгенерированных структур.

В результате анализа мы предположили, что все три токсина являются α -подобными токсинами, что затем подтвердилось экспериментально. Анализ же аминокислотных последовательностей этих токсинов ошибочно относил один из них к млекотоксинам.

Таким образом, было показано, что проведение комплексного анализа гидрофобных свойств и подвижности модуля специфичности α -токсинов скорпионов является эффективным способом предсказания таксономической селективности этих молекул.

Создание инсекто- и млекоселективного α -токсинов на основе α -подобного токсина

Информацию о различных свойствах модулей специфичности разных групп α -токсинов скорпионов мы затем попытались использовать для создания соединений с заданным профилем селективности. Для этого на основании α -подобного токсина ВеМ9 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* были сконструированы 13 его производных (Таблица 1).

Путем замен мы модифицировали подвижность и гидрофобность модуля специфичности, «пересаживали» модули специфичности из селективных молекул, а также на основании данных других научных коллективов изменяли конкретные аминокислотные остатки, считающиеся ключевыми для селективности.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности ВеМ9 и его производных. Красным цветом обозначены шарнирные глицины, а также замена на F или D в сердцевинном модуле, лиловым – замены для увеличения гидрофобности модуля специфичности, синим – для увеличения его гидрофильности, малиновым – замены R и K в М9.7 и М9.8, зеленым – замены в вариабельных позициях α -токсинов, оранжевым – случайная замена К8Е. Модуль специфичности выделен серыми прямоугольниками.

	1	10	20	30	40	50	60
ВеМ9	ARDA	YIAKPHNCVY	YECYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ILGKYGNACWC	IQLPD	NVPIRIPGKCH
М9.1	ARDA	GYIAKPHNCVY	YECGNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ILGKYGNACWC	IQLPD	NVPIRIPGKCH
М9.2	ARDA	YIAKPHNCVY	YECYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	Q	GKYGNACWC	IQLPD
М9.3	ARDA	GYIAKPHNCVY	YECGNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	Q	GKYGNACWC	IQLPD
М9.4	ARDA	YIAKPHNCVY	YECYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ILGKYGNACWC	IQLPD	NVPIRIPGKCH
М9.5	ARDA	GYIAKPHNCVY	YECGNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ASP	YGNACWC	IQLPD
М9.6	ARDA	YIAKPHNCVY	YECYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ILGKYGNACWC	IQLPD	NVPIRIPGKCH
М9.7	ARDA	YIAKPHNCVY	YECYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ILGKYGNACWC	IQLPD	NVPIRIPGKCH
М9.8	ARDA	YIAKPHNCVY	YECYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ILGKYGNACWC	IQLPD	NVPIRIPGKCH
М9.9	ARDA	YIAKPHNCVY	YECYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ILGKYGNACWC	IQLPD	NVPIRIPGKCH
М9.10	ARDA	GYIAKPHNCVY	YECGNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	WASP	YGNACWC	IQLPD
М9.11	ARDA	YIAKPHNCVY	YECYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ILGKYGNACWC	IQLPD	NVPIRIPGKCH
М9.12	ARDA	YIAKPHNCVY	YECYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ILGKYGNACWC	IQLPD	NVPIRIPGKCH
М9.13	ARDA	YIAKPHNCVY	YECGNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ILGKYGNACWC	IQLPD	NVPIRIPGKCH

Токсин ВеМ9 и его производные получали в бактериальной системе экспрессии и затем исследовали их активность электрофизиологически с помощью метода двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих гены Na_v (Таблица 2). Эти эксперименты проводили в сотрудничестве с лабораторией токсикологии и фармакологии Католического университета Лёвена. Из 13 производных ВеМ9 два достигли поставленной цели: мутант М9.13 оказался инсектоселективным, в то время как М9.10 наоборот стал селективно действовать на каналы млекопитающих.

Для получения млекоселективного производного М9.10 понадобился комплексный подход, включающий пересадку модуля специфичности из классического млекотоксина Aah2, введение шарнирных глицинов, а также замену всех остатков, консервативных в млекотоксинах или подверженных положительному отбору, на соответствующие из Aah2. Необходимость использования такого многофакторного подхода говорит о том, что помимо модуля специфичности, отдельные остатки из сердцевинного модуля также важны для таксономической селективности α -токсинов скорпионов.

Для получения инсектоселективного производного М9.13 оказалось достаточным введения всего двух замен: К8Е и Y17G. Аналогичные аминокислоты содержатся в составе классического инсектотоксина VjaIT (Рисунок 2), что говорит о ключевой роли этих двух остатков в инсектоселективности α -токсинов скорпионов.

Таблица 2. Активность производных ВеМ9 на Na_v , экспрессированных в ооцитах *X. laevis*. «Н/а» обозначает «не активен при концентрации 1 мкМ»; числа обозначают эффективность действия токсина в концентрации 1 мкМ: отношение величины тока через 30 мс (5 мс для $Na_v1.5$) после тестового импульса при добавлении токсина к максимальной амплитуде тока после импульса без добавления токсина. Относительная погрешность приведенных величин $\leq 5\%$. Оранжевым цветом обозначен мутант, специфичный к млекопитающим, голубым – к насекомым. $Na_v1.2, 1.4-1.6$ – изоформы каналов млекопитающих, $BgNa_v1$ – канал таракана *Blattella germanica*.

	$Na_v1.2$	$Na_v1.4$	$Na_v1.5$	$Na_v1.6$	$BgNa_v1$
M9	н/а	0,23	0,46	0,6	1,93
M9.1	н/а	0,04	н/а	0,17	0,62
M9.2	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а
M9.3	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а
M9.4	н/а	0,25	0,48	0,46	2,04
M9.5	н/а	н/а	н/а	н/а	н/а
M9.6	н/а	0,36	0,16	0,33	1,02
M9.7	н/а	0,23	0,36	0,16	1,29
M9.8	н/а	0,09	0,13	0,03	1,48
M9.9	н/а	0,13	0,52	0,36	2,01
M9.10	0,27	0,07	н/а	0,21	н/а
M9.11	н/а	0,24	0,33	0,41	1,73
M9.12	н/а	н/а	0,05	0,16	1,16
M9.13	н/а	н/а	н/а	0,01	0,56

Уточнение сайта связывания α -токсинов скорпионов с Na_v

Выявленные различия между α -токсинами с различной таксономической селективностью подсказали, что и сайты их связывания будут различаться по своим физико-химическим свойствам. Мы оценили гидрофобность внеклеточных петель S1–S2, S3–S4, S5–P и P–S6 различных каналов: Na_v семи видов насекомых и семи изоформ Na_v трех видов млекопитающих (мыши, крысы и человека; Рисунок 4А).

Оказалось, что ПЧД-IV отличается консервативностью и не различается по гидрофобности у каналов насекомых и млекопитающих. В свою очередь, петли повторов I и III более вариабельны, особенно S5–S6, которые значительно более гидрофобны в каналах насекомых.

Полученные нами данные о гидрофобных свойствах α -токсинов и петель Na_v хорошо согласуются с результатами биохимических экспериментов, демонстрирующих, что сайт связывания α -токсинов расположен в участках S1–S2 и S3–S4 повтора IV и поровых петлях повтора I. Наиболее вероятным кажется взаимодействие гидрофобного ПЧД-IV с консервативным сердцевинным модулем α -токсинов скорпионов. При этом большая гидрофильность модуля специфичности млекотоксинов может быть обусловлена тем, что Na_v млекопитающих, по сравнению с каналами насекомых, имеют более гидрофильные петли S5–S6 повтора I.

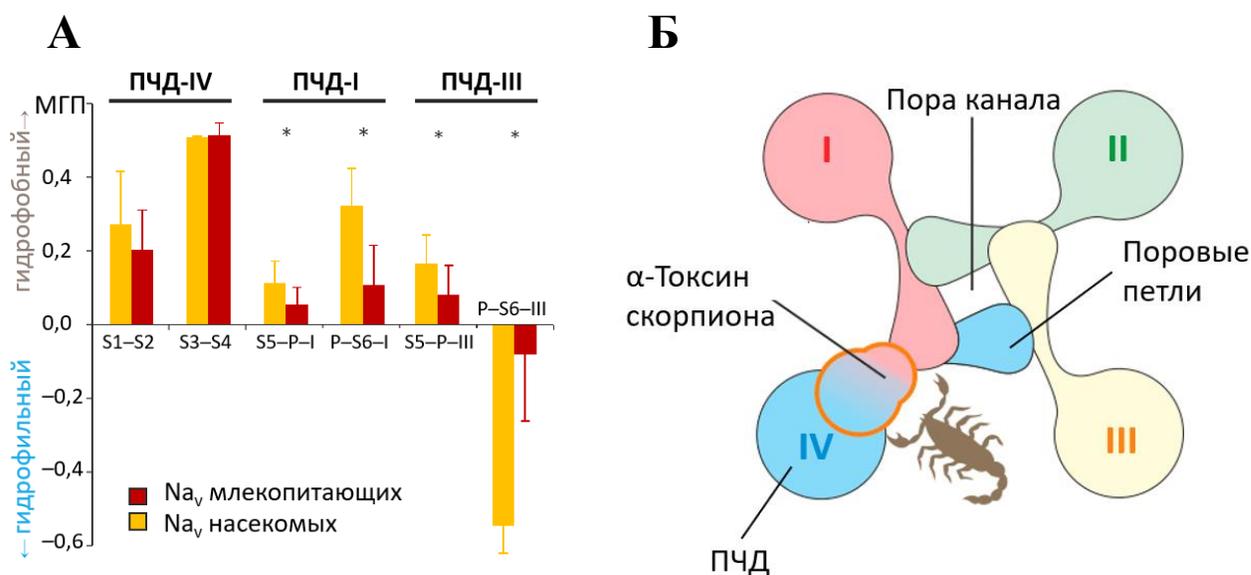


Рисунок 4. А. Средняя гидрофобность внеклеточных петель Na_v . Звездочкой отмечены петли, существенно отличающиеся между группами ($p < 0,05$). Б. Модель связывания α -токсина скорпиона с Na_v .

Таким образом, можно построить модель связывания α -токсинов скорпионов с Na_v , согласно которой молекула токсина динамически взаимодействует сразу с двумя гомологичными повторами канала (Рисунок 4Б): более статичный сердцевинный модуль токсина взаимодействует с консервативным гидрофобным ПЧД-IV, а более подвижный и гидрофильный модуль специфичности – с переменными и более гидрофильными петлями ПД повтора I.

Изучение структурно-функциональных особенностей ингибиторов активации Na_v

Структурные особенности Hm-3

Для проведения полноценных структурных и функциональных исследований Hm-3 из яда паука *H. mellotei*, являющегося ингибитором активации Na_v , токсин и его ^{15}N -меченое производное получали в бактериальной системе экспрессии. Исследование пространственной структуры Hm-3 в водной среде было проведено сотрудниками лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения при pH 5,2 и температуре 35°C. Было показано, что в пространстве Hm-3 образует β -шпильку, сформированную двумя β -тяжами C23–S26 и L31–C34, соединенными поворотом в 3_{10} -спиральной конформации (Рисунок 5А). Стоит отметить, что эта β -шпилька выступает из «глобулярного ядра», стабилизированного тремя дисульфидными связями в топологии так называемого цистинового узла (C2–C18, C9–C23, C17–C34; Рисунок 5Б), характерного для токсинов пауков типа укладки.

Анализ свойств поверхности Hm-3 выявил его амфифильную природу: гидрофобный кластер на поверхности молекулы, образованный W11, F12, W16, Y25, I27, L31, окружен короной заряженных групп, включающей в себя E8, E15, K24, K28, R29, K32 и N-концевую аминогруппу (Рисунок 5В). Амфифильность молекулярной поверхности также характерна и для других ингибиторов активации Na_v , что делает это свойство их общей чертой.

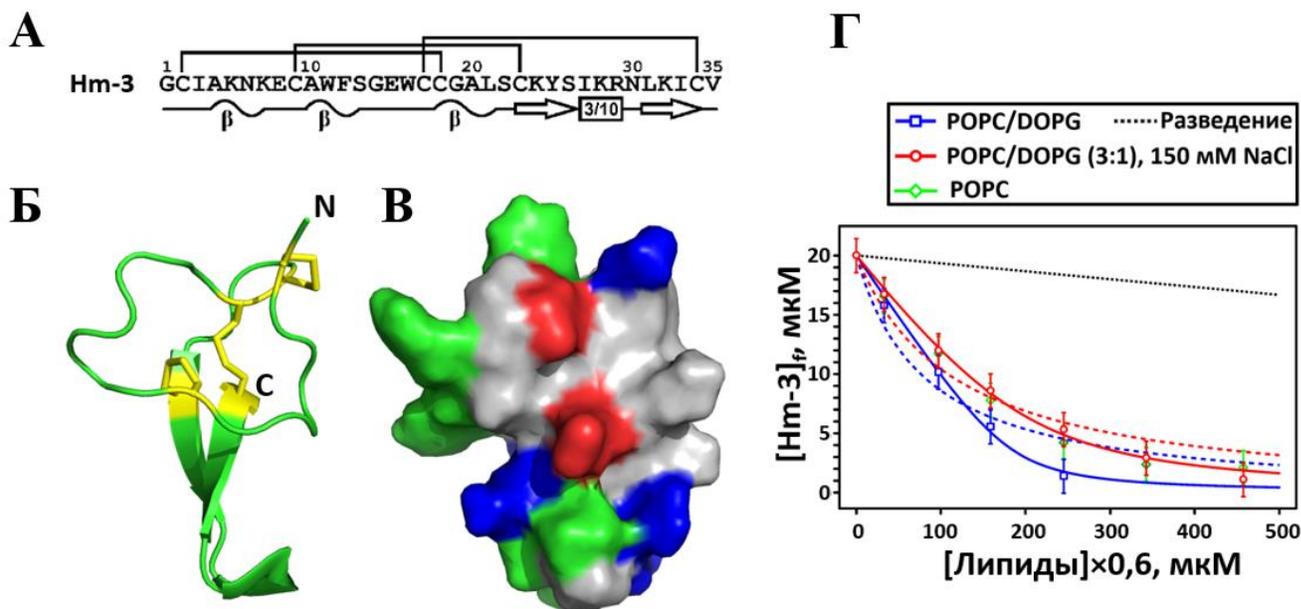


Рисунок 5. А. Аминокислотная последовательность Hm-3. Под последовательностью указаны элементы вторичной структуры токсина: β -тяжи показаны стрелками, 3_{10} -спираль – прямоугольником, β -повороты – волнистыми линиями. Б. Ленточное представление пространственной структуры Hm-3. Дисульфидные связи показаны желтым. В. Молекулярная поверхность Hm-3. Гидрофобные, положительно заряженные и отрицательно заряженные остатки окрашены в зеленый, синий и красный цвета, соответственно. Г. Изотермы связывания Hm-3 с липидными везикулами, состоящими из фосфатидилхолина (POPC) или смеси фосфатидилхолина с фосфатидилглицерином (POPC/DOPG, 3:1), аппроксимированные уравнением равновесного распределения (пунктирные линии) и уравнением Ленгмюра. $[Hm-3]_f$ – концентрация свободного токсина, $[Липиды] \times 0,6$ – концентрация липидов во внешнем монослое везикул.

Электрофизиологическая характеристика Hm-3

Активность токсина Hm-3 была протестирована с помощью метода двухэлектродной фиксации потенциала на ооцитах лягушки *X. laevis*, экспрессирующих гены Na_v . Вначале исследовали активность токсина в концентрации 1 мкМ (Рисунок 6А), а затем были построены кривые зависимости доза–ответ (Рисунок 6Б). Эти эксперименты проводили в сотрудничестве с лабораторией токсикологии и фармакологии Католического университета Лёвена. Для всех Na_v , в отношении которых Hm-3 проявлял активность, наблюдался сдвиг вольтамперной характеристики вправо, то есть канал открывался при более положительных значениях потенциала, – характерное

свойство ингибиторов активации Na_v . Более того, действие Hm-3 на Na_v оказалось потенциал-зависимым (Рисунок 6В): эффективность действия токсина зависит от приложенного напряжения.

Однако, характер влияния Hm-3 на активацию $DmNa_v1$, Na_v насекомых, и $Na_v1.4$, мышечной изоформы Na_v млекопитающих, оказался различен (Рисунок 7): токсин приводил к значительному смещению нормированной кривой активации $DmNa_v1$, но практически не влиял на кривую активации $Na_v1.4$. Обратимость связывания токсина в результате приложения деполяризующих предимпульсов (Рисунок 8) и различная кинетика восстановления токов через $DmNa_v1$ и $Na_v1.4$ указывают на различное сродство Hm-3 к этим двум изоформам Na_v и позволяют объяснить различный характер действия Hm-3. В случае $Na_v1.4$ в основном активируются те каналы, которые не связаны с токсином, что выражается в значительном уменьшении натриевого тока и отсутствии сдвига активационной кривой, а в случае с $DmNa_v1$ происходит активация как свободных каналов, так и тех, которые связаны с токсином, что приводит к более выраженному сдвигу активационной кривой.

Таким образом, электрофизиологическая характеристика Hm-3 позволяет отнести этот токсин в группу ингибиторов активации Na_v и объяснить различный характер действия токсина на $DmNa_v1$ и $Na_v1.4$ за счет различного сродства токсина к этим каналам.

Взаимодействие Hm-3 с липидными мембранами

Совместно с группой структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН было показано, что Hm-3 способен связываться как с катионными, так и с анионными липосомами при ионной силе раствора, близкой к физиологической (150 мМ NaCl) (Рисунок 5Г). Понижение содержания соли приводило к незначительному ухудшению связывания, что указывает на ключевую роль гидрофобных остатков во взаимодействии Hm-3 с липидами.

Далее с помощью ЯМР-спектроскопии путем титрования Hm-3 мицеллами и анализа выраженных изменений в спектрах было показано, что в связывании Hm-3 с липидной мембраной ключевую роль играют участок A10–C17 (AWFSGEWC) и центральная часть β -спиральной, аминокислотные остатки которых (W11, F12, W16, Y25, I27, L31) формируют гидрофобный кластер на поверхности токсина.

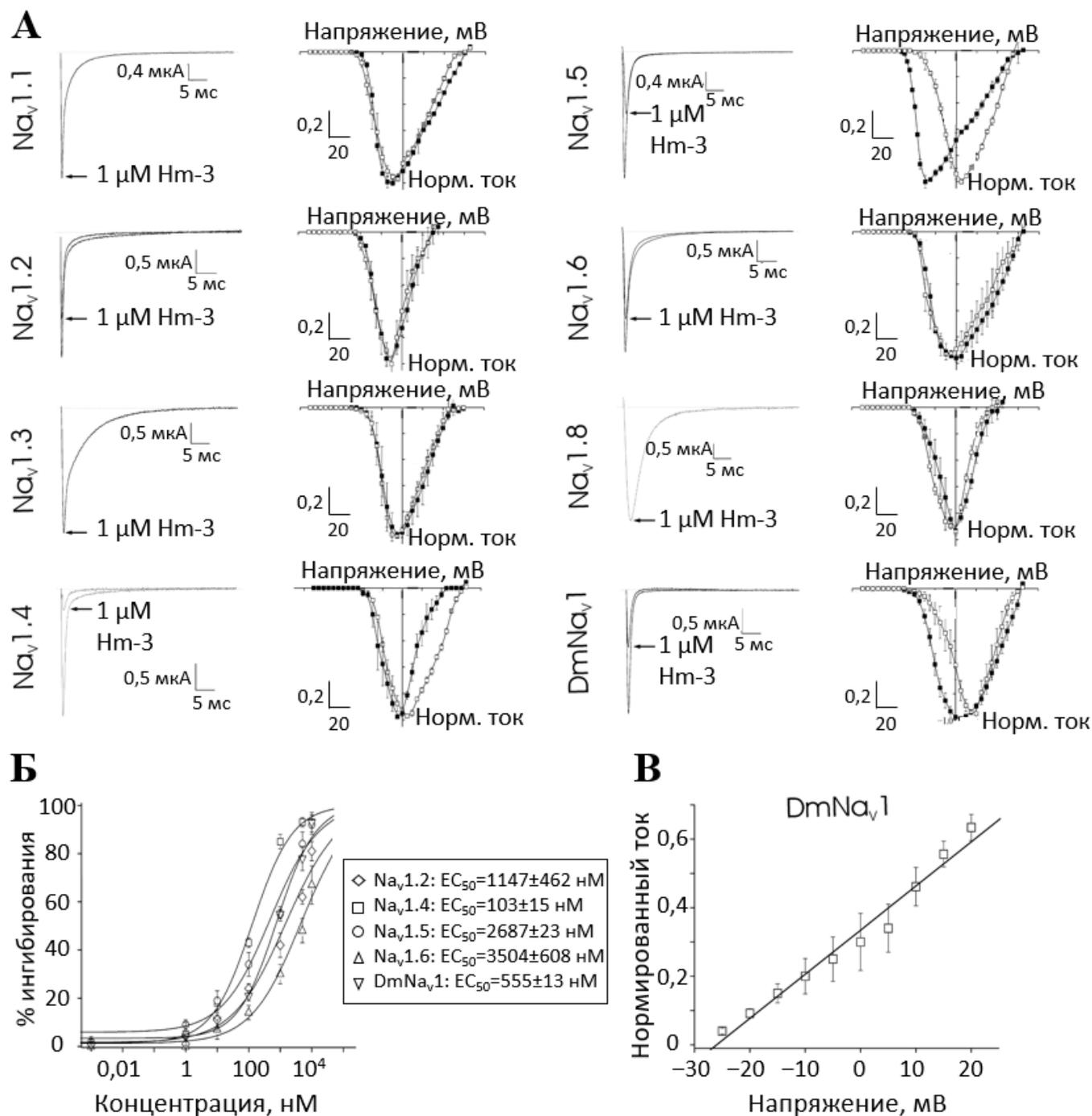


Рисунок 6. А. Эффекты Hm-3 на различные Na_v. Слева представлены записи токов в контроле и при приложении 1 мкМ Hm-3 (показано стрелочкой). Справа представлены нормализованные вольтамперные характеристики для быстрой компоненты тока в контроле (•) и в присутствии 1 мкМ Hm-3 (○). Na_v1.1–1.6, 1.8 – изоформы каналов млекопитающих, DmNa_v1 – канал мухи *Drosophila melanogaster*. Б. Кривые доза-ответ для Hm-3 в отношении каналов, чувствительных к токсину. Во вставке приведены значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀). В. Потенциал-зависимость действия Hm-3 на DmNa_v1.

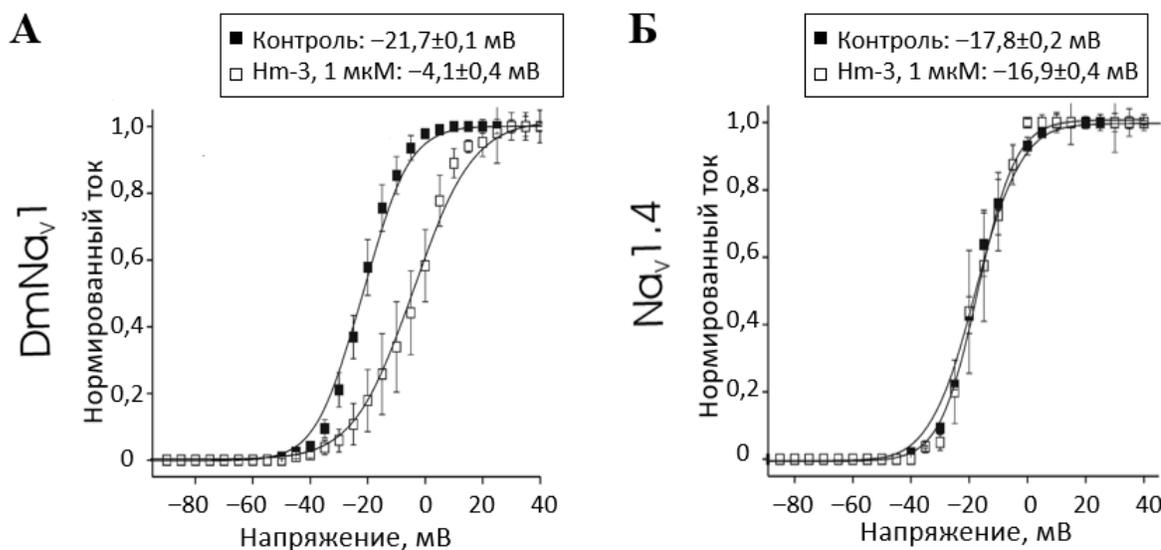


Рисунок 7. Влияние Hm-3 на свойства токов через каналы $Na_v1.4$ и $DmNa_v1$. Кривые активации для $DmNa_v1$ (А) и $Na_v1.4$ (Б) показаны для контрольных измерений (■) и после аппликации 1 мкМ Hm-3 (□). Вверху приведены значения напряжения, при которых достигается полумаксимальная активация ($V_{1/2}$).

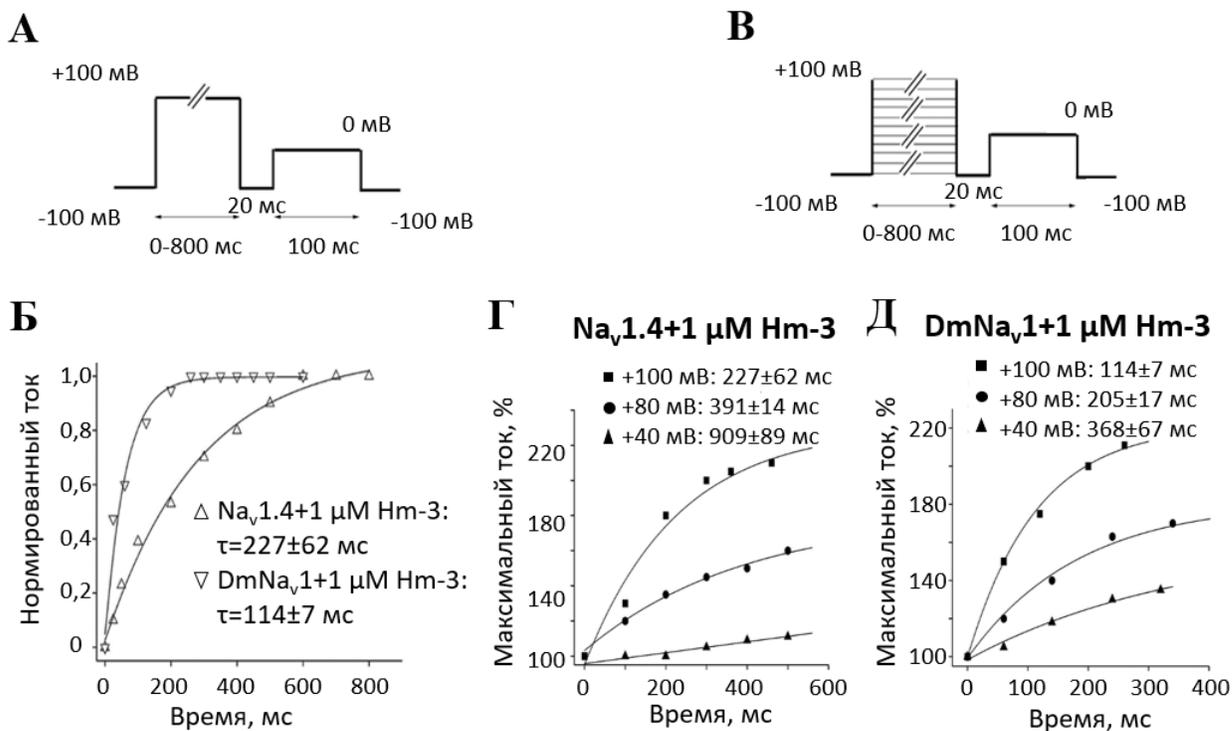


Рисунок 8. Потенциал-зависимость обратимости ингибирования Na_v , вызванного взаимодействием с Hm-3. А и В. Последовательность приложения разности потенциалов к мембране ооцитов *X. laevis* в экспериментах. Б. Увеличение амплитуды тока натрия в ответ на увеличение длительности предимпульса. τ – значения длительности предимпульса, при котором ток восстанавливался на 50%. Г и Д. Зависимость обратимости ингибирования канала от величины и длительности предимпульса. Сверху указаны значения длительности предимпульса, при которых ток восстанавливался на 50%.

Взаимодействие Hm-3 с Na_v

В настоящее время основным сайтом связывания ингибиторов активации с Na_v считается рецепторный сайт 4, образованный преимущественно петлями S1–S2 и S3–S4 повтора II. Тем не менее, некоторые работы показывают, что связывание возможно и с S3–S4 петлями других повторов. Совместно с отделом физиологии Университета Джонса Хопкинса мы проанализировали способность Hm-3 взаимодействовать с S3–S4 петлями различных повторов Na_v1.4. Оказалось, что в концентрации 1,5 мкМ Hm-3 связывается только с S3–S4 повтора I (Рисунок 9). Это означает, что в отличие от общепринятых представлений, основной сайт связывания Hm-3 находится в ПЧД-I, а не ПЧД-II, и мы можем вести речь о новом сайте связывания ингибиторов активации Na_v.

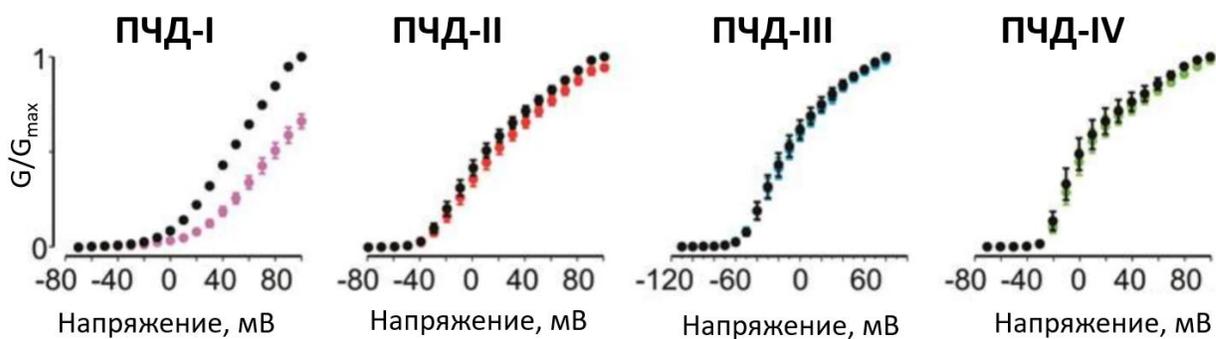


Рисунок 9. Относительная проводимость каналов K_v2.1, в которые были пересажены петли различных повторов Na_v1.4, в контроле (черные кружочки) и при аппликации 1,5 мкМ Hm-3 (цветные кружочки).

Далее совместно с группой структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН с помощью ЯМР-спектроскопии мы проанализировали связывание Hm-3 с ПЧД-I Na_v1.4: токсин связывается с внешней половиной спирали S3 ПЧД-I (S3b, остатки S199–T207) и С-концом петли S3–S4 (остатки L212–I215). В свою очередь, токсин взаимодействует с каналом с помощью β-шпильки и остатков W11–F12, погруженных в мембрану.

С помощью метода молекулярного моделирования с учетом ограничений по данным ЯМР было показано, что комплекс токсин–канал стабилизируется, по-видимому, за счет формирования:

- солевых мостиков между остатками K24 и K28 токсина и E208 и D211 канала;
- π-стэкинг и ван-дер-ваальсовых взаимодействий между остатками W11 токсина и остатками F198, I201, M202 и Y205 канала, Y25 токсина и M202, M203 и L206 канала, I27 токсина и L206 и I215 канала;
- гидрофобного взаимодействия между I33 и V35 токсина и F209 канала.

Полученные данные согласуются с предполагаемым механизмом действия ингибиторов активации Na_v , а именно мембрано-опосредованным захватом сенсора потенциала: Hm-3, по-видимому, связывается с липидной мембраной и далее дрейфует до встречи с каналом, с которым взаимодействует с помощью β -шпильки и нескольких остатков, лежащих в мембране. Отличие же заключается в том, что Hm-3 взаимодействует с ПЧД-I, в то время как основным сайтом для других ингибиторов активации Na_v является ПЧД-II.

Ингибиторы активации Na_v – потенциальные лекарства от гипокалиемического периодического паралича

Известно, что многие заболевания обусловлены нарушением работы ионных каналов (каналопатии), что вызвано наличием мутаций в генах этих каналов. Такое редкое мышечное расстройство, как гипокалиемический периодический паралич, возникает в результате мутаций в гене мышечной изоформы $Na_v1.4$, которые приводят к возникновению дополнительных токов через ПЧД, так называемых ω -токов (Рисунок 10). Поскольку сайт связывания ингибиторов активации Na_v лежит в ПЧД, мы предположили, что эти соединения могут обладать способностью ингибировать ω -токи.

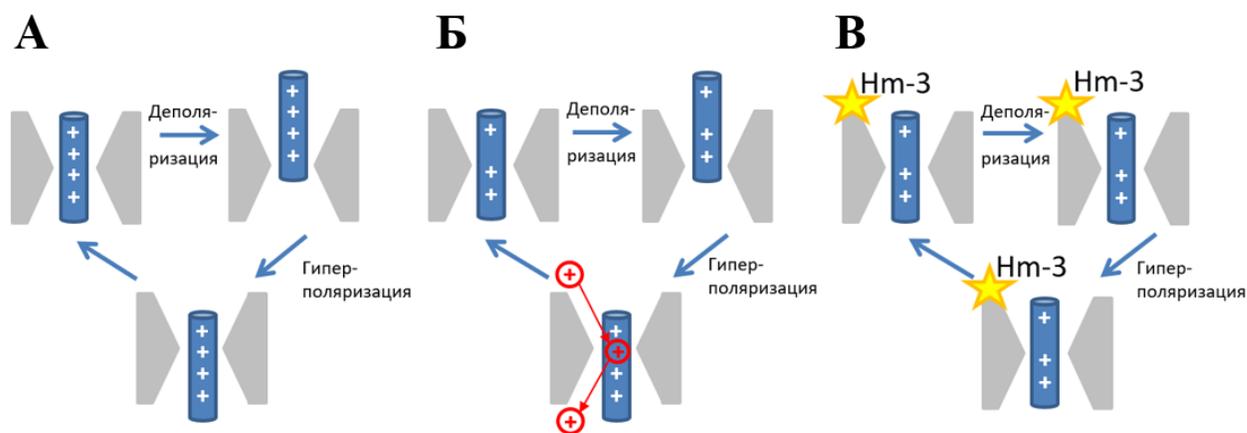


Рисунок 10. А. Схематическое изображение функционирования ПЧД Na_v . Б. Предположительный механизм возникновения ω -токов через ПЧД Na_v . В. Ингибирование ω -токов ингибиторами активации каналов.

Совместно с Центром нервномышечных расстройств Университетского колледжа Лондона мы провели ряд электрофизиологических экспериментов по способности токсина Hm-3 ингибировать ω -токи через $Na_v1.4$ с мутациями, характерными для гипокалиемического периодического паралича: R219G, R222W, R222G, R225G (ПЧД-I); R672G (ПЧД-II); R1132Q (ПЧД-III).

Оказалось, что Hm-3 способен ингибировать ω -токи только через те мутантные каналы, в которых мутация находилась во втором или третьем положительно заряженном остатке ПЧД-I, причем в

концентрации 10 мкМ Nm-3 блокировал $Na_v1.4$ -R222W на $67\pm5\%$ и $Na_v1.4$ -R222G на $64\pm5\%$ при -80 мВ (Рисунок 11). Эти результаты подтверждают предыдущие данные, свидетельствующие о том, что именно ПЧД-I является сайтом связывания Nm-3. Кроме того, они позволяют предположить, что Nm-3 может стать прототипом лекарственного препарата для лечения гипокалиемического периодического паралича при мутациях в ПЧД-I.

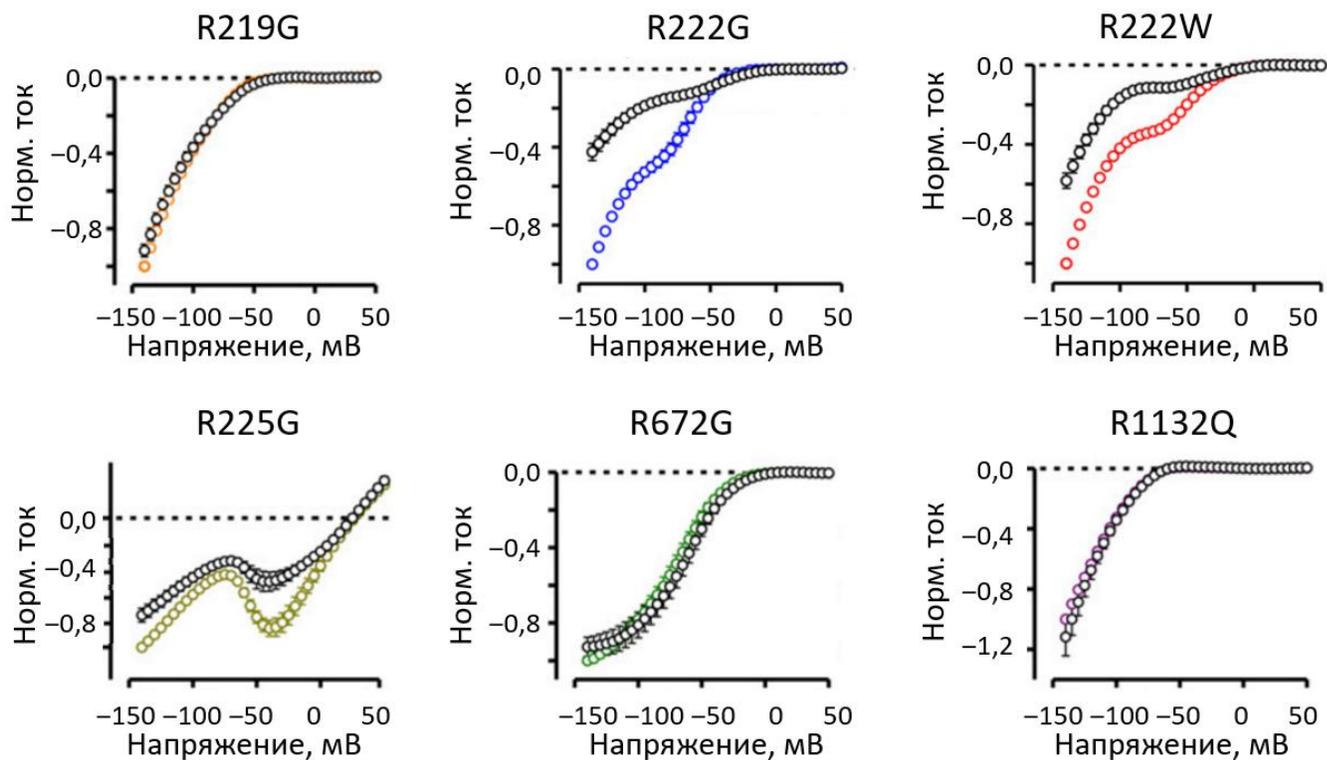


Рисунок 11. ω -Токи через $Na_v1.4$ с мутациями в сенсорах потенциала в контроле (цветные кружочки) и при приложении 10 мкМ Nm-3 (черные кружочки). Ток через ПД блокирован 1 мкМ тетродотоксином. Для увеличения амплитуды ω -токов эксперимент проводили с использованием гуанидина в омывающем растворе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что модульное строение α -токсинов скорпионов соответствует доменной организации Na_v . В структуре α -токсинов скорпионов выделены два модуля: сердцевинный и модуль специфичности. Оказалось, что свойства модуля специфичности α -токсинов скорпионов, а именно конформационная подвижность и гидрофильность поверхности, определяют их селективность в отношении Na_v млекопитающих и насекомых. Сердцевинный модуль отвечает в целом за распознавание Na_v и связывание с ПЧД повтора IV, а модуль специфичности – за селективность взаимодействия токсинов с внеклеточными петлями ПД повтора I (Рисунок 4Б). Более того, свойства модулей специфичности α -токсинов скорпионов, селективных в отношении определенных Na_v , соответствуют свойствам петель ПД изоформ каналов, в отношении которых они проявляют активность.

Стоит отметить, что существующую классификацию α -токсинов скорпионов, основанную на летальности их действия в отношении насекомых и млекопитающих, целесообразно дополнить активностью токсинов в отношении их молекулярных мишеней, конкретных изоформ Na_v .

Информация о модульном строении α -токсинов скорпионов и различиях свойств модулей будет использована для дизайна и получения селективных молекул. В рамках данной работы показаны подходы по получению полипептидов, селективных в отношении Na_v насекомых и млекопитающих.

Изучен первый селективный лиганд Na_v , действующий на ПЧД-I Na_v – токсин паука Hm-3. Показано, что он взаимодействует с каналом за счет мембрано-опосредованного механизма: сначала связывается с липидной мембраной, а затем с ПЧД-I канала, фиксируя его в неактивированном состоянии.

С использованием ингибитора активации Na_v из яда паука впервые показана возможность подавлять дополнительные токи, возникающие в ПЧД Na_v при определенных мутациях в их генах и лежащие в основе ряда мышечных расстройств. Это наблюдение будет использовано для создания лекарственных препаратов от гипокалиемического периодического паралича.

Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на природу селективности α -токсинов скорпионов и ингибиторов активации Na_v из пауков в отношении различных изоформ Na_v и в очередной раз подтверждают возможность использования токсинов для изучения структурно-функциональных особенностей ионных каналов.

ВЫВОДЫ

1. В структуре α -токсинов скорпионов выделены два модуля: сердцевинный и модуль специфичности. Показано, что свойства модуля специфичности (конформационная подвижность и гидрофильность поверхности) определяют селективность действия токсинов в отношении потенциал-чувствительных натриевых каналов млекопитающих и насекомых. Модуль специфичности млекотоксинов более гидрофильный и подвижный, чем у токсинов, селективных в отношении насекомых.

2. Предложена модель связывания α -токсинов скорпионов с их мишенями – потенциал-чувствительными натриевыми каналами, подразумевающая взаимодействие сердцевинного модуля с потенциал-чувствительным доменом повтора IV, а модуля специфичности – с внеклеточными петлями порового домена в повторе I.

3. С помощью комплекса методов спектроскопии ядерного магнитного резонанса и электрофизиологии исследован механизм действия ингибитора активации натриевых каналов Nm-3 из яда паука *Heriades melloteei*: токсин сначала связывается с липидной мембраной, а затем – с потенциал-чувствительным доменом канала, фиксируя его в неактивированном состоянии. Показано селективное воздействие Nm-3 на потенциал-чувствительный домен I каналов $Na_v1.4$. Выявлены аминокислотные остатки, отвечающие за его связывание с липидной мембраной и потенциал-чувствительным доменом каналов.

4. Показано, что Nm-3 ингибирует ω -токи через потенциал-чувствительные натриевые каналы $Na_v1.4$ с мутациями, обнаруженными у больных гипокалиемическим периодическим параличом.

5. Методом направленного мутагенеза получены производные неселективного α -подобного токсина ВеМ9 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*, одно из которых является селективным инсектотоксином, а другое приобрело специфичность в отношении натриевых каналов млекопитающих. Предложенный подход можно использовать для получения α -токсинов скорпионов, селективных в отношении определенных изоформ потенциал-чувствительных натриевых каналов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные публикации Беркут Антонины Анатольевны по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.02 – биофизика

1. Myshkin MY, Männikkö R, Krumkacheva OA, Kulbatskii DS, Chugunov AO, Berkut AA, Paramonov AS, Shulepko MA, Fedin MV, Hanna MG, Kullmann DM, Bagryanskaya EG, Arseniev AS, Kirpichnikov MP, Lyukmanova EN, Vassilevski AA, Shenkarev ZO. (2019) Cell-free expression of sodium channel domains for pharmacology studies. Noncanonical spider toxin binding site in the second voltage-sensing domain of human Nav1.4 channel. *Front Pharmacol*, eCollection 2019. **IF 3.854**

2. Kuldyshev NA, Mineev KS, Berkut AA, Peigneur S, Arseniev AS, Tytgat J, Grishin EV, Vassilevski AA. (2018) Refined structure of BeM9 reveals arginine hand, an overlooked structural motif in scorpion toxins affecting sodium channels. *Proteins* 86(10), pp1117–1122. **IF 2.501**

3. Männikkö R, Shenkarev ZO, Thor MG, Berkut AA, Myshkin MY, Paramonov AS, Kulbatskii DS, Kuzmin DA, Sampedro Castañeda M, King L, Wilson ER, Lyukmanova EN, Kirpichnikov MP, Schorge S, Bosmans F, Hanna MG, Kullmann DM, Vassilevski AA. (2018) Spider toxin inhibits gating pore currents underlying periodic paralysis. *PNAS* 115(17), pp4495–4500. **IF 9.580**

4. Kuldyshev NA, Berkut AA, Peigneur S, Tytgat J, Grishin EV, Vassilevski AA. (2017) Design of sodium channel ligands with defined selectivity – a case study in scorpion alpha-toxins. *FEBS Lett* 591(20), pp3414–3420. **IF 2.675**

5. Berkut AA, Peigneur S, Myshkin MY, Paramonov AS, Lyukmanova EN, Arseniev AS, Grishin EV, Tytgat J, Shenkarev ZO & Vassilevski AA. (2015) Structure of membrane-active toxin from crab spider *Heriades melloteei* suggests parallel evolution of sodium channel gating modifiers in Araneomorphae and Mygalomorphae. *J Biol Chem* 290(1), pp492–504. **IF 4.106**

6. Chugunov AO, Koromyslova AD, Berkut AA, Peigneur S, Tytgat J, Polyansky AA, Pentkovsky VM, Vassilevski AA, Grishin EV & Efremov RG. (2013) Modular organization of alpha-toxins from scorpion venom mirrors domain structure of their targets, sodium channels. *J Biol Chem* 288(26), pp19014–19027. **IF 4.106**

Тезисы конференций:

1. Устинов Н.Б., Беркут А.А., Василевский А.А. Изучение нейротоксина ВеМ9 из яда скорпиона *Mesobuthus eurpeus*. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых

ученых «Ломоносов-2013», секция «Биология» (Москва, 8-13 апреля 2013); Тезисы докладов, стр. 54-55.

2. Мышкин М.Ю., Люкманова Е.Н., Парамонов А.С., Шулепко М.А., Кульбацкий Д.С., Беркут А.А., Василевский А.А., Шенкарев З.О., Кирпичников М.П., Арсеньев А.С. Исследование пространственной структуры потенциал-чувствительного домена из 2-й псевдосубъединицы канала $Na_v1.4$ человека. XXVI Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 10-14 февраля 2014); Тезисы докладов и стендовых сообщений, стр. 32.

3. Мышкин М.Ю., Парамонов А.С., Шенкарев З.О., Кульбацкий Д.С., Люкманова Е.Н., Беркут А.А., Василевский А.А., Арсеньев А.С. Исследование пространственной структуры и мембранной активности токсина Nm-3 из яда паука *Heriades melloteei*. Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014», секция «Биология» (Москва, 7-11 апреля 2014); Тезисы докладов, стр. 59-60.

4. Berkut A.A., Myshkin M.Yu., Peigneur S., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Tytgat J., Arseniev A.S., Grishin E.V., Vassilevski A.A. Structure and function of a sodium channel gating modifier from the crab spider *Heriades melloteei*. 39th FEBS Congress (Paris, France, 30 August-4 September 2014); FEBS J 281, suppl. 1, p. 382.

5. Berkut A.A., Peigneur S., Myshkin M.Yu., Paramonov A.S., Shenkarev, Z.O., Tytgat J., Grishin E.V., Vassilevski A.A. Parallel evolution of sodium channel activation inhibitors in Araneomorphae and Mygalomorphae? The 18th World Congress of the International Society on Toxinology (Oxford, UK, 25-30 September 2015); Abstracts book, p. 119.

6. Кульдюшев Н.А., Беркут А.А., Василевский А.А. Изменение специфичности α -подобного токсина ВеМ9. 58-я научная конференция МФТИ с международным участием, (Москва–Долгопрудный–Жуковский, 23-28 ноября 2015); Программа конференции, стр. 90.

7. Кульдюшев Н.А., Беркут А.А., Гришин Е.В., Василевский А.А. Факторы, влияющие на специфичность токсина ВеМ9 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*. XXVIII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», (Москва, 8-11 февраля 2016); Сборник тезисов, стр. 53.

8. Кульдюшев Н.А., Беркут А.А. Изменение специфичности α -подобного токсина скорпиона ВеМ9. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», секция «Биология» (Москва, 11-15 апреля 2016); Тезисы докладов, стр. 84.