

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Беркут Антонина Анатольевна

**Молекулярные основы взаимодействия компонентов яда
паукообразных с потенциал-чувствительными натриевыми каналами**

03.01.02 – биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.х.н. Василевский А.А.

Москва – 2019

Оглавление

Общая характеристика работы.....	6
Актуальность работы	6
Объекты исследования.....	7
Цель и задачи исследования.....	7
Научная новизна и практическая значимость работы	7
Личный вклад автора	8
Апробация работы.....	8
Публикации.....	Error! Bookmark not defined.
Глава 1. Обзор литературы.....	10
Потенциал-чувствительные натриевые каналы.....	10
Структурная организация Na_v	12
α -Субъединица.....	13
Потенциал-чувствительный домен и инактивационная петля.....	13
Поровый домен и селективный фильтр.....	14
β -Субъединица.....	15
Цикл работы Na_v	17
Активация натриевого канала	18
Инактивация натриевого канала	18
Быстрая инактивация	19
Медленная инактивация	20
Заболевания, связанные с нарушением работы Na_v	21
Болевые синдромы	21
Эпилепсия	23
Рак.....	23
Заболевания сердца.....	24
Нервно-мышечные расстройства.....	26
Миотонии	27
Периодические параличи.....	29
Лиганды Na_v	31
Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 1	31
Гетероциклические молекулы.....	31

μ-Конотоксины	33
Другие пептидные блокаторы	34
Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 2	34
Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 3	35
α-Токсины скорпионов	35
Общая информация и классификация α-токсинов скорпионов	36
Структурные особенности, определяющие селективность α-токсинов скорпионов	38
О связывании α-токсинов скорпионов с Na _v	39
Токсины актиний.....	40
Другие лиганды	40
Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 4	40
β-Токсины скорпионов	41
Токсины пауков, облегчающие активацию и/или ингибирующие инактивацию Na _v	42
Токсины, ингибирующие активацию Na _v	42
Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 5	44
Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 6	45
Лиганды, взаимодействующие с рецепторным сайтом 7	45
Лиганды, взаимодействующие с рецепторным сайтом 8	46
Недостатки существующей классификации рецепторных сайтов Na _v	47
Глава 2. Материалы и методы	48
Материалы	48
Оборудование и расходные материалы.....	48
Реактивы.....	48
Наборы реактивов	49
Бактериальные штаммы.....	49
Растворы.....	49
Программное обеспечение	50
Методы	50
Полимеразная цепная реакция	50
Выделение и очистка ДНК из ПЦР-смеси	51
Синтез гена, кодирующего целевой продукт.....	51
Рестрикция плазмиды pET-32 и синтетического гена	53

Электрофорез в агарозном геле	53
Выделение ДНК из агарозного геля	53
Лигирование синтетического гена и линейаризованной плазмиды рЕТ-32	54
Трансформация клеток <i>E. coli</i> методом теплового шока.....	54
Трансформация клеток <i>E. coli</i> методом электропорации	55
Отбор трансформантов, несущих целевой ген	55
Выделение плазмидной ДНК	55
Секвенирование ДНК.....	56
Контролируемая экспрессия гена химерного белка.....	56
Ультразвуковая дезинтеграция клеток.....	56
Аффинная хроматография.....	56
УФ-спектрометрия	56
Гидролиз гибридного белка BrCN.....	57
Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография	57
Масс-спектрометрия	58
Экспрессия генов ионных каналов	58
Электрофизиологические исследования	58
Построение моделей пространственной структуры токсинов.....	60
Расчеты молекулярной динамики для α -токсинов скорпионов	61
Расчеты молекулярного гидрофобного потенциала	62
Картирование гидрофобных свойств поверхности молекул α -токсинов.....	63
Оценка гидрофобных характеристик внеклеточных петель Na _v	63
Связывание с липидными везикулами	64
Глава 3. Результаты исследования и их обсуждение	65
Изучение структурно-функциональных особенностей α -токсинов скорпионов	66
Анализ молекулярных поверхностей α -токсинов скорпионов для выявления основ их таксономической селективности	66
Модульное строение α -токсинов скорпионов	66
Создание базы данных последовательностей α -токсинов скорпионов.....	66
Различная подвижность модуля специфичности у разных групп α -токсинов скорпионов	69
Связь гидрофильности модуля специфичности с селективностью α -токсинов скорпионов	72
Использование анализа гидрофильности поверхности для предсказания селективности α -токсинов скорпионов.....	73

Создание инсекто- и млекоселективного α -токсинов на основе α -подобного токсина.....	75
Выбор объекта мутагенеза.....	75
Дизайн производных ВеМ9 с заданными свойствами.....	76
Получение ВеМ9 и его производных	78
Тестирование активности производных ВеМ9.....	80
Неудачные попытки изменения селективности ВеМ9	80
Изменение физико-химических свойств поверхности α -токсинов скорпионов	80
Пересадка модулей специфичности	81
Внесение точечных аминокислотных замен.....	82
Млекоселективное производное М9.10.....	83
Инсектоселективное производное М9.13.....	83
Уточнение сайта связывания α -токсинов скорпионов	84
Изучение структурно-функциональных особенностей ингибиторов активации Na_v	86
Изучение структурных и функциональных особенностей токсина Нм-3	86
Выбор объекта исследования	86
Получение рекомбинантного токсина Нм-3 и исследование его пространственной структуры	86
Электрофизиологическая характеристика Нм-3	90
Активность Нм-3 в отношении ионных каналов	90
Особенности действия Нм-3 на Na_v	92
Анализ взаимодействия Нм-3 с липидными мембранами	95
Анализ взаимодействия Нм-3 с Na_v	96
Ингибиторы активации Na_v – потенциальные лекарства от гипокалиемического периодического паралича	98
Промежуточное заключение	99
Выводы	100
Благодарности	101
Список сокращений.....	102
Список литературы	103

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Уже более 60 лет потенциал-чувствительные натриевые каналы (Na_v) привлекают интерес научного сообщества. Дело в том, что эти интегральные мембранные белки 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 потенциал-чувствительных натриевых каналов, являются причиной ряда серьезных заболеваний, так называемых каналопатий, например, синдрома удлиненного интервала QT, синдрома Бругада, различных болевых расстройств, синдрома Драве.

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 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

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 российских и международных научных конференциях в виде стендовых и устных докладов: Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2013», XXVI Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Международной научной конференции студентов, аспирантов и

молодых ученых «Ломоносов-2014», 39th FEBS Congress, 18th World Congress of the International Society on Toxinology, 58-й научной конференции МФТИ, XXVIII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016».

Список публикаций по теме диссертации

Основные публикации 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. Kuldyushev 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. Kuldyushev 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**

Глава 1. Обзор литературы

Потенциал-чувствительные натриевые каналы

Потенциал-чувствительные натриевые каналы (Na_v) – интегральные мембранные белки, ответственные за селективный перенос ионов натрия через клеточную мембрану в ответ на изменение мембранного потенциала. 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.

У млекопитающих в настоящее время выделяют два подсемейства Na_v (Рисунок 1): Na_v1 и Na_v2 (также обозначается Na_x , NaG). В то время как первое семейство изучено достаточно хорошо, данные о втором весьма скудны. Так, предполагается, что хотя Na_v2 и относится к семейству Na_v , представители этого подсемейства не способны чувствовать изменение мембранного потенциала: они открываются в ответ на повышение внеклеточной концентрации натрия (до ~150 мМ при норме 135–145 мМ у млекопитающих). Эти каналы экспрессируются в глиальных клетках некоторых участков головного мозга, а также в сердце и матке. Считается, что они участвуют в поддержании солевого баланса, а нокаут соответствующего гена у мышей приводит к гипернатриемии.

В подсемействе Na_v1 в настоящее время выделяют 9 типов (изоформ) каналов, $Na_v1.1$ – $Na_v1.9$ [5], последовательности которых похожи и содержат более 50% идентичных аминокислотных остатков (а.о.). Экспрессия различных изоформ регулируется в процессе онтогенеза и является клеточно- и тканеспецифичной [6, 7]. В основном Na_v экспрессируются в электровозбудимых клетках (Таблица 1): $Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ – в центральной нервной системе, $Na_v1.4$ – в скелетных мышцах, $Na_v1.5$ характерен для сердца, $Na_v1.6$

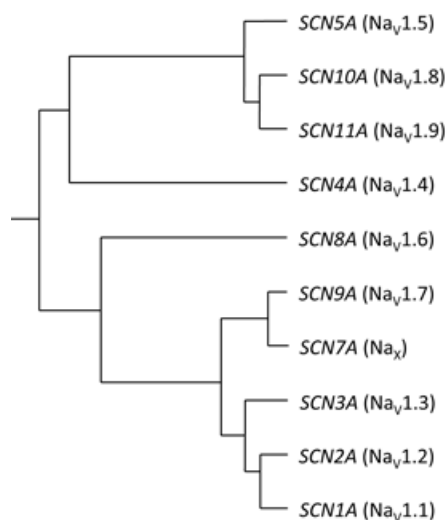


Рисунок 1. Филогенетическое родство Na_v , определенное на основании сходства аминокислотных последовательностей их α -субъединиц. Адаптировано из <http://egosumdaniel.blogspot.ru/2012/02/exercise-in-open-science-evolution-of.html>.

обнаруживается и в центральной, и в периферической нервной системе, а $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ и $Na_v1.9$ – почти исключительно только в периферической нервной системе. Основная физиологическая роль

Таблица 1. Изоформы Na_v человека. ЦНС – центральная нервная система, ПНС – периферическая нервная система. В столбце «ТТХ» указана полумаксимальная доза ингибирования каналов тетродотоксином (IC_{50}) в нМ.

Изоформа	Ген	Локализация	ТТХ
$Na_v1.1$	<i>SCN1A</i>	ЦНС, ПНС	10
$Na_v1.2$	<i>SCN2A</i>	ЦНС	10
$Na_v1.3$	<i>SCN3A</i>	ЦНС (эмбриональная)	2–15
$Na_v1.4$	<i>SCN4A</i>	Скелетная мускулатура	5
$Na_v1.5$	<i>SCN5A</i>	Сердечная мускулатура	2 000
$Na_v1.6$	<i>SCN8A</i>	ЦНС, ПНС	1
$Na_v1.7$	<i>SCN9A</i>	ПНС	4
$Na_v1.8$	<i>SCN10A</i>	ПНС	>50 000
$Na_v1.9$	<i>SCN11A</i>	ПНС	1 000
Na_v2 (Na_x)	<i>SCN6A</i> (<i>SCN7A</i>)	ЦНС, сердце, гладкая мускулатура	–

каналов Na_v1 – деполяризация электровозбудимых мембран в начальной фазе потенциала действия. Во время открытия натриевые каналы пропускают ионы натрия внутрь клетки, делая мембранный потенциал более положительным. В нервных клетках деполяризация одного аксонального участка приводит к передаче потенциала действия следующему участку и, как следствие, распространению сигнала. В скелетных и сердечных мышечных клетках деполяризация, вызванная притоком натрия в клетку, активирует кальциевый сигнальный каскад, который вызывает сокращение мышц. Такое сокращение скелетных мышечных клеток является причиной движения тела, а сокращение сердечных клеток используется для прокачивания крови.

В последние годы поступает всё больше данных, что помимо нейронов, миоцитов и кардиомиоцитов Na_v экспрессируются и играют важную функциональную роль в клетках, которые

традиционно не считаются электровозбудимыми (Таблица 2). При этом каналы обнаруживаются не только в клеточных мембранах, но и в мембранах внутриклеточных органелл и участвуют в фагоцитозе, клеточном движении, высвобождении биологически активных молекул, регулировании работы Na^+/K^+ -АТФазы и многом другом.

Таблица 2. Na_v в «неэлектровозбудимых» клетках. Адаптировано из [8].

Тип клеток	Изоформы Na_v
Астроциты	$\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$
Опухолевые клетки	$\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.7$
Дендроциты	$\text{Na}_v1.7$
Эндотелиальные клетки	$\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$
Фибробласты	$\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$, $\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.7$
Кератиноциты	$\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.8$
Инсулярные β -клетки	$\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$
Макрофаги	$\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.6$
Микроглия	$\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.9$
Клетки Мюллера	$\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.9$
Одонтобласты	$\text{Na}_v1.2$
Остеобласты	$\text{Na}_v1.2$
Эритроциты	$\text{Na}_v1.4$, $\text{Na}_v1.7$
Шванновские клетки	$\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.3$
Т-Лимфоциты	$\text{Na}_v1.5$

Структурная организация Na_v

За последние несколько лет наши знания о структурной организации Na_v значительно шагнули вперед. Так, были установлены пространственные структуры ряда бактериальных Na_v [9-17], химер бактериальных и эукариотических каналов [18, 19], а также каналов эукариот [20-26], в том числе с различными лигандами [18-21, 23, 24]. Несмотря на явные недостатки известных структур (статичность кристаллических структур, выраженные структурные отличия между про- и эукариотическими каналами, низкое разрешение структуры эукариотических каналов), эти данные позволили значительно продвинуться в понимании структурной организации Na_v .

Na_v состоят из нескольких субъединиц, количество которых варьирует в зависимости от таксономической принадлежности животного, а также от изоформы канала в пределах одного вида. Во всех известных к настоящему времени случаях основную функциональную нагрузку несет так называемая α -субъединица, в то время как β -субъединицы являются дополнительными и выполняют регуляторную функцию в работе канала, влияя на кинетику его работы, модулируя его потенциал-чувствительность [27], а также обеспечивают правильное созревание и сортировку α -субъединицы [28].

α -Субъединица

α -Субъединица натриевого канала является основной и содержит в себе все необходимые для его правильного функционирования структуры (Рисунок 2): пору, через которую катионы проникают через мембрану; потенциал-чувствительный домен (ПЧД), обеспечивающий открытие поры в ответ на деполяризацию мембраны; инактивационную петлю, участвующую в процессе быстрой инактивации; а также селективный фильтр, ответственный за избирательное пропускание ионов Na^+ [6].

Полипептидная цепь α -субъединицы насчитывает около 2000 а.о. (~260 кДа) и состоит из четырех гомологичных повторов (псевдосубъединиц) (I–IV), каждый из которых, в свою очередь, образован шестью трансмембранными α -спиральными сегментами (S1–S6) [29]. N- и C-концевые участки цепи, как и соединяющие гомологичные повторы линкеры, погружены в цитоплазму, в то время как внеклеточные участки полипептидной цепи в значительной степени гликозилированы.

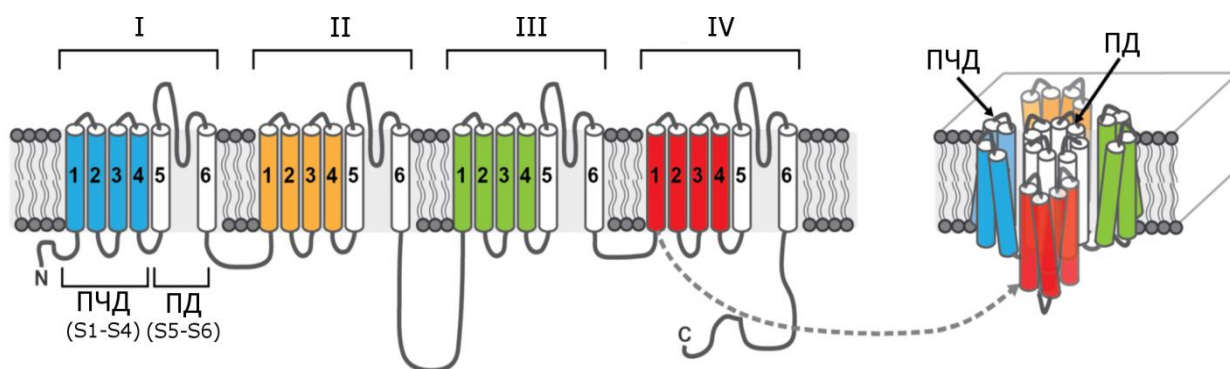


Рисунок 2. Организация α -субъединицы Na_v . ПЧД – потенциал-чувствительный домен, ПД – поровый домен. Адаптировано из [30].

Потенциал-чувствительный домен и инактивационная петля

Na_v1 каналы характеризуются зависимостью активации (перехода из закрытого в открытое состояние) и инактивации (перехода из открытого в инактивированное состояние) от мембранного

потенциала [31], что обеспечивается наличием в их структуре так называемых ПЧД и инактивационных петель. ПЧД образован трансмембранными сегментами S1–S4 каждой псевдосубъединицы, тем не менее, функцию «сенсора потенциала» выполняют главным образом сегменты S4, содержащие в каждом третьем положении положительно заряженный а.о. [32]. В ответ на деполяризацию сегменты S4 перемещаются относительно других структурных элементов канала во внеклеточную сторону, что через линкеры S4–S5 «ощущается» поровым доменом (ПД) и приводит к открытию поры [33].

В свою очередь, инактивационная петля (инактивационные ворота), расположенная между псевдосубъединицами III и IV, срабатывает при высоких значениях потенциала, перекрывая ток ионов Na^+ [34]. Эта петля состоит из ~50 а.о. и в основном является неупорядоченной, хотя примерно в середине содержит α -спираль, к которой с ее N-конца примыкают два поворота полипептидной цепи, второй из которых содержит триаду гидрофобных а.о. IFM (изолейцин, фенилаланин, метионин) [35]. Эта триада является ключевой для быстрой инактивации; фланкирующие ее остатки глицина играют роль «молекулярных шарниров», увеличивая ее конформационную подвижность и тем самым облегчая процесс ее перемещения в направлении поры [36–38]. Стоит отметить, что недавние работы по изучению пространственной структуры Na_v [26] подтверждают такое устройство инактивационных ворот и предполагают аллостерический механизм быстрой инактивации (подробнее в разделе «Цикл работы Na_v »).

Согласованное функционирование ПЧД и инактивационной петли определяет цикл работы натриевого канала, который будет рассмотрен ниже. Стоит отметить, что каждый домен в разной степени задействован в активации и инактивации, что подтверждается неэквивалентностью замен гомологичных остатков в ПЧД-I–IV [39–41].

Поровый домен и селективный фильтр

ПД формируется в центре белка и образуется сегментами S5 и S6 каждого из повторов, а также петлями между ними, так называемыми P-петлями [6]. P-Петли обладают значительной конформационной подвижностью и тем самым обуславливают структурную асимметрию ПД. Так, известно, что P-петля повтора I является наиболее выступающей, P-петля повтора IV расположена глубже всех в мембране, а P-петли повторов II и III занимают промежуточные положения [42].

Селективный фильтр натриевого канала отвечает за избирательное пропускание ионов Na^+ . Он состоит из двух поровых колец – внутреннего и внешнего, образованных пространственно сближенными а.о. разных псевдосубъединиц [25]. Внешнее кольцо селективного фильтра

образовано отрицательно заряженными а.о., имитирующими гидратную оболочку катиона Na^+ (EE(M/D/N)D-мотив). Дополнительное увеличение селективности обеспечивает внутреннее кольцо селективного фильтра (ДЕКА-мотив), локализованное в непосредственной близости от внешнего, причем основную функциональную нагрузку несет именно оно. Каждый а.о. ДЕКА-мотива принадлежит Р-петле одного из повторов I–IV. В отсутствие катиона между карбоксилатом глутаминовой кислоты и аминогруппой лизина образуется ионная связь, и лишь сильные щелочные металлы (Na^+ , Li^+) могут конкурировать с аминогруппой, смещая лизин в поперечном направлении к аланину. При прохождении селективного фильтра частично гидратированный ион натрия взаимодействует с двумя кислородами карбоксильной группы глутаминовой кислоты. Во время этого процесса а.о. ДЕКА-мотива смещаются для образования водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий [43].

Интересно, что ДЕКА-мотив присутствует у всех натриевых каналов млекопитающих [29], хотя и не все остатки, входящие в его состав, являются необходимыми. Так, замена аспарагиновой кислоты на аланин (АЕКА) сохраняет селективность канала: отношение проницаемостей K^+ и Na^+ равно 0,03, как и в немутированном канале. Комбинация аспарагиновой кислоты и лизина (ДАКА) дает небольшое ухудшение селективности натриевого канала (отношение проницаемостей K^+ и Na^+ равно 0,09) [44]. При этом остаток лизина является незаменимым: именно он обеспечивает непроницаемость для Ca^{2+} и других двухвалентных катионов [43], а его замена на аргинин (ДЕРА) приводит к неселективному каналу (отношение проницаемостей для K^+ и Na^+ равно 0,9) [44]. Таким образом, для избирательного пропускания ионов Na^+ необходимым является наличие в селективном фильтре лизина и хотя бы одного карбоксилата. Помимо наличия, важна также и их локализация: перемещение лизина в повтор II, а глутаминовой кислоты в повтор III (DKEA) уменьшает селективность в 4 раза [45].

β -Субъединица

β -Субъединицы Na_v часто называют вспомогательными, основываясь на том факте, что экспрессии только α -субъединицы достаточно для получения функционального канала [28]. Тем не менее, растущее число данных говорит о том, что в живых организмах неправильная экспрессия β -субъединиц часто приводит к различным патологиям. По-видимому, это связано с важной ролью β -субъединиц в созревании и сортировке α -субъединиц, а также их участием в межклеточных взаимодействиях, направленной локализации и кластеризации натриевых каналов.

В настоящее время у млекопитающих известно 4 гена (*SCN1B–SCN4B*), кодирующие 5 β -субъединиц: $\beta 1$, $\beta 1B$, $\beta 2$, $\beta 3$ и $\beta 4$, которые по сходству последовательностей и структур можно разбить на две группы: $\beta 1$ - $\beta 1B$ - $\beta 3$ и $\beta 2$ - $\beta 4$. Показано, что в зависимости от группы β -субъединицы по-разному ассоциируются с α -субъединицей. Так, $\beta 2$ - и $\beta 4$ -субъединицы имеют локализованный в N-концевом участке дополнительный остаток цистеина (C26 и C58 соответственно), способный к образованию дисульфидной связи с остатком цистеина α -субъединицы, в то время как для $\beta 1$ - и $\beta 3$ -субъединиц реализуется нековалентное связывание с α -субъединицей [46-48]. Стоит отметить, что подобно α -субъединицам, экспрессия β -субъединиц является тканеспецифичной (Таблица 3).

Таблица 3. Типы β -субъединиц Na_v . ЦНС – центральная нервная система, ПНС – периферическая нервная система.

Тип	Ген	Локализация
$\beta 1$	<i>SCN1B</i>	Во всех тканях, в которых встречаются Na_v
$\beta 1B$	<i>SCN1B</i>	ЦНС, ПНС
$\beta 2$	<i>SCN2B</i>	ЦНС, ПНС, глия, сердечная мускулатура
$\beta 3$	<i>SCN3B</i>	ЦНС, ПНС, надпочечники, почки
$\beta 4$	<i>SCN4B</i>	ЦНС, ПНС, глия, скелетная и сердечная мускулатура

β -Субъединицы обладают относительно небольшими размерами по сравнению с α -субъединицами и насчитывают ~220 а.о. (~35 кДа). Они состоят из сильно гликозилированного N-концевого внеклеточного домена, одиночного α -спирального трансмембранного сегмента и небольшого C-концевого цитоплазматического участка [4].

Структура N-концевого внеклеточного домена $\beta 3$ - и $\beta 4$ -субъединиц была установлена с помощью кристаллографии с разрешением 2,5 и 1,7 Å соответственно. Несмотря на невысокое сходство последовательностей (~40%), их пространственные укладки достаточно похожи (Рисунок 3). В пространстве N-концевой внеклеточный домен β -субъединиц натриевых каналов формирует иммуноглобулиновый тип укладки, который представляет собой β -сэндвич, сформированный двумя антипараллельными β -слоями. За стабильность такой укладки отвечают дисульфидные связи (одна для группы $\beta 2$ - $\beta 4$ и две для группы $\beta 1$ - $\beta 1B$ - $\beta 3$), а также гидрофобные взаимодействия.

Предполагается, что внеклеточный домен выступает в качестве молекулы клеточной адгезии, участвуя за счет связывания с матричными белками в процессах клеточной миграции [28]. Кроме того, для $\beta 3$ -субъединицы показано, что она способна образовывать тримеры и тем самым обеспечивать кластеризацию натриевых каналов [49].

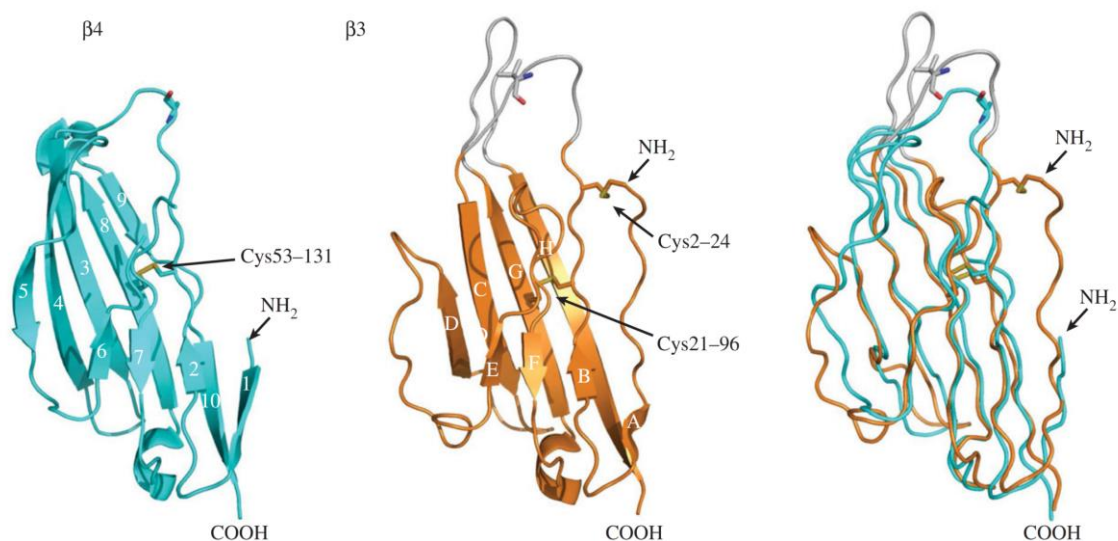


Рисунок 3. Структуры внеклеточных доменов $\beta 4$ - и $\beta 3$ -субъединиц натриевых каналов, а также их сравнение. Адаптировано из [50].

В свою очередь, цитоплазматический домен по большей степени неупорядочен. Он ассоциирован с белками цитоскелета при посредстве анкирина, что может играть немаловажную роль в процессах агрегации клеток, а также способствовать правильной локализации натриевого канала в мембране [51, 52].

Цикл работы Na_v

Во время генерации потенциала действия Na_v может находиться в одном из трех основных состояний: закрытом (состояние покоя), открытом и инактивированном [53] (Рисунок 4). Переход из закрытого в открытое состояние называется активацией, из открытого в инактивированное – инактивацией, из инактивированного в закрытое – регенерацией. Рассмотрим каждый из этих процессов в деталях.



Рисунок 4. Цикл работы Na_v.

Активация натриевого канала

Несмотря на значительные успехи в изучении пространственной структуры Na_v [25, 26], точный механизм активации канала не до конца понятен. В настоящее время считается, что для активации Na_v необходима активация сенсоров потенциала сразу трех псевдосубъединиц I–III (Рисунок 5). При этом IVS4 с некоторой задержкой также переходит в активированное состояние. Движение сенсоров потенциала порождает так называемый воротный ток [54]. При этом через мембрану двигаются ~12 элементарных зарядов [55], причем в ответ на деполяризацию два внешних воротных заряда сенсора выходят из толщи мембраны и достигают внеклеточного пространства (смещение спирали составляет ~5 Å); с внутриклеточной стороны заряды не выходят из мембраны [56, 57].

Для активации сенсоров потенциала общепринятой является так называемая модель спирального винта [29]. Согласно этой модели, при закрытой канальной поре положение сегментов S4 в трансмембранном положении стабилизировано образованием ионных пар между положительно заряженными остатками аргинина и лизина в сенсорах потенциала и отрицательно заряженными а.о. других трансмембранных сегментов канала (S2 и S3) [58, 59]. При деполяризации кулоновские силы вызывают сдвиг сегментов S4 по спиральной траектории в направлении внешней стороны мембраны, что вызывает смещение S4–S5 линкера, расположенного параллельно внутриклеточной поверхности мембраны [1]. Это, в свою очередь, провоцирует изгибание и скручивание S5 и S6 сегментов, что и приводит к открытию поры.

Инактивация натриевого канала

В настоящее время выделяют два типа инактивации Na_v: быструю и медленную. Быстрая инактивация натриевых каналов происходит в течение 1–2 мс и является нормальным этапом в работе канала. Регенерация каналов при этом занимает ~30 мс. В свою очередь, медленная инактивация каналов служит скорее защитной реакцией: она возникает в результате длительного возбуждения, продолжающегося от секунд до минут, или действия повторяющегося стимула, и

регулирует возбудимость нейронов и миоцитов. В результате восстановление канала занимает гораздо больше времени (наблюдается степенная зависимость) [60].

Быстрая инактивация

В настоящее время считается, что из всех псевдосубъединиц именно IV является ключевой для быстрой инактивации Na_v [61-63]. Переходя в активированное состояние со скоростью примерно в 5 раз меньшей по сравнению с другими сенсорами потенциала [62], IVS4 вызывает конформационные перестройки, которые приводят к обнажению сайта связывания инактивационных ворот. Последние, в свою очередь, физически перекрывают поток ионов. Недавние структурные работы [25, 26] также говорят в пользу такой модели инактивации Na_v .

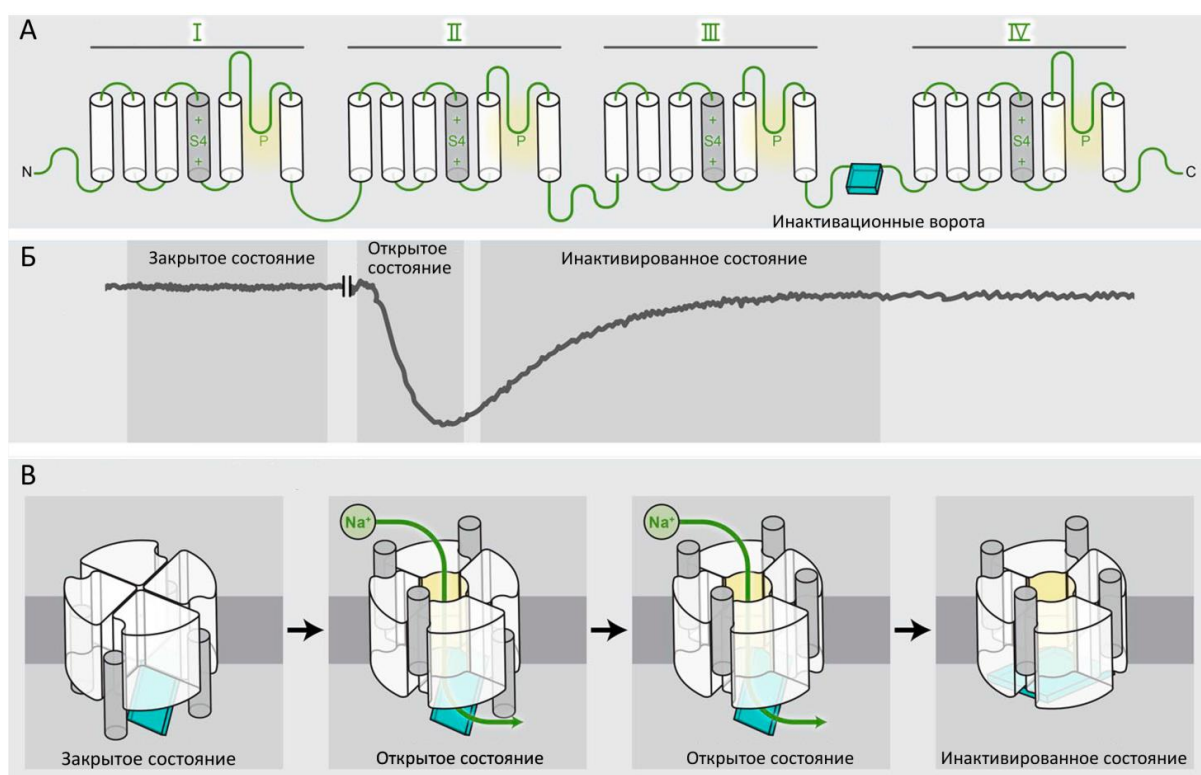


Рисунок 5. А – организация α -субъединицы Na_v . Б – схематическое изображение мембранного тока, проходящего через Na_v и возникающего в ответ на деполяризующий импульс. Момент подачи импульса указан символом \parallel . В – модель работы Na_v . Адаптировано из [64].

Напомним, что инактивационными воротами служит петля между псевдосубъединицами III и IV, содержащая в своем составе IFM-триаду, причем остаток фенилаланина является ключевым [37]: во время инактивации за счет гидрофобных взаимодействий он связывается с другим важным участком канала (между III S4–S5 и IV S6) [26] и фиксирует ворота в закрытом состоянии. Кроме того, с помощью ЯМР было показано, что в растворе F1489 экспонирован, то есть находится в необычной

для гидрофобного остатка позиции. В противоположность этому, метионин IFM-мотива спрятан в «ядре» инактивационной петли и взаимодействует с двумя остатками тирозина α -спирали. Такое гидрофобное взаимодействие стабилизирует укладку петли и вынуждает фенилаланин находиться в «выступающей» позиции.

Стоит отметить, что в процесс инактивации вовлечены не только а.о., расположенные в петле, соединяющей III и IV повторы. Эксперименты с использованием сканирующего мутагенеза выявили остатки, расположенные в трансмембранных сегментах IS6 [65] и IVS6 [66], а также внутриклеточных петлях III_{S4}–S5 [67] и IV_{S4}–S5 [68], которые также вовлечены в процесс инактивации. Однако, к таким данным стоит относиться с осторожностью, так как подобные мутации могут в первую очередь влиять на процесс активации, лишь опосредованно приводя к изменению в процессе инактивации.

Медленная инактивация

Несмотря на то, что механизм медленной активации изучается более 50 лет, он остается не до конца ясен. По-видимому, длительное возбуждение приводит к значительным структурным перестройкам канала, в результате которых нарушается структура поры и/или ПЧД, а канал оказывается в непроводящем состоянии [13].

Известно, что в процесс медленной инактивации вовлечены многие участки канала [69]. Так, мутагенез позволил выявить несколько остатков рядом с селективным фильтром, вовлеченных в процесс медленной инактивации: W402 [70, 71], V787 [72], F1236 [73] и V1583 [74] (по нумерации изоформы rNav1.4). Кроме того, мутации во внешнем кольце селективного фильтра (EE(M/D)D-мотиве) значительно замедляли медленную инактивацию [75]. Наконец, остатки с внутренней стороны поры также оказались важны для этого процесса – это L689 [76], I693 [77], T704 [78, 79], R1158 [80], M1592 [77]. В пользу вовлеченности в медленную инактивацию поры говорит также тот факт, что уменьшение внеклеточной концентрации ионов Na^+ , как и действие тетродотоксина (ТТХ), блокирующего пору канала, приводит к замедлению медленной инактивации [81-83].

Нарушения в процессе быстрой инактивации, создаваемые мутациями в инактивационных воротах, также приводили к изменениям в процессе медленной инактивации, причем и IFM-мотив, и другие остатки вносили свой вклад [84-86]. Важными для медленной инактивации оказались и ПЧД: нейтрализация зарядов во всех четырех доменах показала, что каждый из них содержит как минимум один а.о., мутация которого приводит к значительному сдвигу зависимости медленной инактивации от напряжения [87]. Кроме того, было показано, что все домены оказываются в

активированном состоянии в процессе медленной инактивации, хотя время перехода в это состояние существенно различается [81, 82]. Наконец, в настоящее время считается, что β -субъединицы не играют принципиальной роли в процессе медленной инактивации [88, 89].

Таким образом, в настоящее время не известен конкретный структурный элемент Na_v , который отвечает за медленную инактивацию, напротив, в этот процесс вовлечены многие участки канала, такие как пора, ПЧД, внеклеточные и внутриклеточные петли [69], что, по-видимому, связано со сложной кинетикой медленной инактивации.

Заболевания, связанные с нарушением работы Na_v

Мутации в генах, кодирующих α - и β -субъединицы Na_v , могут приводить к нарушению работы каналов или их гипер- или гипоекспрессии. В результате генерируются аномальные нервные импульсы, что приводит к неверному функционированию различных систем организма и развитию ряда заболеваний, называемых каналопатиями. Так, уже давно известна роль Na_v в различных нервно-мышечных и сердечных заболеваниях. Недавние генетические исследования расширили понимание роли натриевых каналов в таких заболеваниях, как мигрень [90], рассеянный склероз [91], сахарный диабет [92], кашель [93], аутизм [94, 95], рак [96] и многие другие [97] (Таблица 4). Коротко рассмотрим некоторые из названных заболеваний, остановившись чуть подробнее на мышечных каналопатиях.

Болевые синдромы

Большое число ионных каналов и рецепторов принимают участие в восприятии и передаче болевых сигналов [98], в частности, была показана важная роль $Na_v1.3$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, и $Na_v1.9$ в этом процессе.

Мутации в генах *SCN9A*, *SCN10A* и *SCN11A*, кодирующих $Na_v1.7$, $Na_v1.8$ и $Na_v1.9$ соответственно, могут приводить к неверной активации и/или инактивации каналов и, как следствие, к повышенной возбудимости нейронов спинальных ганглиев [99]. Такое нарушение функции каналов является причиной ряда болевых симптомов, в частности, эритромелалгии и невропатии мелких волокон.

Мутации, приводящие к экспрессии нефункциональных каналов в случае с $Na_v1.7$ и $Na_v1.9$, являются причиной врожденного отсутствия чувствительности к боли [100, 101]. Любопытно, что мыши с нокаутом по гену *SCN9A* отказываются от еды и умирают от голода, что, по-видимому, связано с потерей обоняния [102]. Более того, люди с гомозиготной ноль-мутацией в гене *SCN9A* неспособны чувствовать запах [103]. В свою очередь, нокаут гена *SCN11A* не приводит к потере обоняния, но характеризуется незначительной мышечной слабостью [100].

Таблица 4. Заболевания, связанные с нарушением работы Na_v . Адаптировано из [2].

Ткань	Изоформы Na_v	Заболевания, связанные с нарушением работы Na_v
ЦНС	$Na_v1.1$, $Na_v1.2$, $Na_v1.3$, $Na_v1.6$	Эпилепсия, мигрень, аутизм, атаксия
Сетчатка	$Na_v1.8$, $Na_v1.9$	Нарушение зрительного восприятия
Нейросенсорные обонятельные клетки	$Na_v1.7$	Потеря обоняния
Сенсорные нейроны, иннервирующие дыхательные пути	$Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$	Кашель
Сердечная мускулатура	$Na_v1.5$, $Na_v1.8$	Синдром Бругада, синдром удлиненного интервала QT, аритмии, фибрилляции и др.
β -Клетки поджелудочной железы	$Na_v1.7$	Сахарный диабет
Скелетная мускулатура	$Na_v1.4$	Периодический паралич, миотония
Кожа	$Na_v1.7$, $Na_v1.8$	Болевые синдромы, врожденная нечувствительность к боли, нейропатический зуд
Нейроны задних корешков спинного мозга	$Na_v1.6$, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$	Болевые синдромы, врожденная нечувствительность к боли, нейропатический зуд
Опухолевые клетки	$Na_v1.1$ – $Na_v1.9$ и β -субъединицы	Различные типа рака, в том числе рак яичников, простаты, груди, кишечника, меланома, лимфома, мелкоклеточный рак легких

Нокаут гена *SCN10A* у грызунов дал основания полагать, что $Na_v1.8$ вовлечен в восприятие воспалительной и нейропатической боли, в частности, нейропатической боли у больных сахарным диабетом [104, 105]. Так, повышение уровня глюкозы во время гипергликемии вызывает повышенное образование метилглиоксаля, который индуцирует посттрансляционные модификации $Na_v1.8$ и приводит к повышенной возбудимости сенсорных нейронов. В результате этого повышается электрическая возбудимость ноцицептивных нейронов [106].

На сегодняшний день не известны моногенные «болевые» заболевания, связанные с мутациями в гене *SCN3A*, кодирующем $Na_v1.3$. Тем не менее, исследования показывают, что у грызунов, подвергшихся аксотомии и последующему нейрональному воспалению, увеличивается число

транскриптов *SCN3A* в сенсорных нейронах, что позволяет предположить роль $Na_v1.3$ в рецепции боли [107].

Эпилепсия

Каналы $Na_v1.1$ и $Na_v1.2$ экспрессируются в интернейронах, в которых происходит синтез и высвобождение гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), основного тормозного нейромедиатора в головном мозге. Важнейшей функцией интернейронов является регулирование нейронной возбудимости и синхронизация нейронной активности. Мутации $Na_v1.1$ и $Na_v1.2$, приводящие к частичной или полной потере функции каналов, снижают возбудимость тормозных нейронов и приводят к нейронной гипервозбудимости и нескольким формам эпилепсии. Известно более 20 мутаций $Na_v1.1$, которые вовлечены в генерализованную эпилепсию с фебрильными судорогами плюс. Кроме того, более 600 мутаций $Na_v1.1$ связывают с синдромом Драве, тяжелой миоклонической эпилепсией младенчества. По сравнению с мутациями в $Na_v1.1$, последствия мутаций в $Na_v1.2$ гораздо менее существенны: они являются причиной доброкачественных семейных судорог новорожденных – эпилептического синдрома, который легко контролируется с помощью лекарств и проходит обычно к 1 году [108].

Рак

За последние пару десятилетий было показано, что для опухолевых клеток зачастую характерна чрезмерная или недостаточная экспрессия генов различных ионных каналов, в том числе и Na_v . Было установлено, что ионные каналы участвуют в регуляции ряда биологических процессов в клетках, в частности, пролиферации клеток, устойчивости к апоптозу, адгезии клеток, их подвижности и инвазивности [109, 110]. Уровень экспрессии Na_v коррелирует с уровнем инвазивности и метастатическим потенциалом нескольких типов рака [111]. Так, избыточная экспрессия $Na_v1.5$ ассоциирована с сильным метастазированием при раке груди [112], а $Na_v1.1$ – при раке яичников [113] (Таблица 5). Кроме того, как и в случае с α -субъединицами, уровень экспрессии различных β -субъединиц также может быть нарушен при раке [114].

Было показано, что ряд ингибиторов Na_v , а конкретно ТТХ, ранолазин, рилузол, лидокаин, фенитоин, карбамазепин, способны блокировать метастазирование раковых клеток *in vitro* [115, 116]. Хотя едва ли получится использовать Na_v как фармакологическую мишень для лечения рака из-за их распространенности в организме человека, они могут служить биомаркерами при диагностике [117].

Таблица 5. Роль Na_v в опухолевых заболеваниях. Адаптировано из [111].

Белок	Разновидность рака
α-Субъединица	
$Na_v1.1$	Рак яичников
$Na_v1.2$	Рак шейки матки, яичников, простаты, мезотелиома
$Na_v1.3$	Рак яичников, простаты, мелкоклеточный рак легких
$Na_v1.4$	Рак шейки матки, яичников, простаты
$Na_v1.5$	Рак груди, кишечника, яичников, лимфома, нейробластома, мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легких
$Na_v1.6$	Рак груди, шейки матки, простаты, лимфома, мезотелиома, меланома, мелкоклеточный и немелкоклеточный рак легких
$Na_v1.7$	Рак груди, шейки матки, яичников, простаты, лимфома, мезотелиома, немелкоклеточный рак легких
$Na_v1.8$	–
$Na_v1.9$	Лимфома, мелкоклеточный рак легких
β-Субъединица	
$\beta1$	Рак груди, шейки матки, простаты, немелкоклеточный рак легких
$\beta2$	Рак груди, шейки матки, простаты, немелкоклеточный рак легких
$\beta3$	Рак простаты, немелкоклеточный рак легких
$\beta4$	Рак груди, шейки матки, простаты, немелкоклеточный рак легких

Заболевания сердца

Na_v в сердце отвечают за формирование восходящей фазы потенциала действия и, как следствие, за сокращение сердечной мышцы. При этом конкретная изоформа натриевых каналов, $Na_v1.5$, в основном экспрессируется в сердце. Поэтому не удивительно, что мутации в гене *SCN5A*, кодирующем $Na_v1.5$, часто приводят к нарушению работы натриевого канала, в частности, и сердца в целом. В настоящее время считается, что более 450 генетических вариантов *SCN5A* приводят или потенциально могут привести к заболеваниям сердца, причем эти мутации обнаружены почти во всех доменах и петлях, кроме N-концевого участка [118].

Мутации в $Na_v1.5$ могут привести к различного рода нарушениям: к нарушению проводимости канала, его воротных механизмов, к изменению уровня экспрессии. Поэтому с ними связано более десятка различных наследственных аритмий, включая синдром удлиненного интервала QT 3 типа (LQT3), дилатационную кардиомиопатию, синдром слабости синусового узла, болезнь Ленгера-Лева и синдром Бругада. Стоит отметить, что мутации в генах β -субъединиц, ассоциированных с α -субъединицей $Na_v1.5$, также могут приводить к нарушениям работы сердца (Таблица 6) [114].

Синдром удлиненного интервала QT характеризуется удлиненным QT-интервалом на кардиограммах пациентов, а также желудочковой тахикардией и повышенной вероятностью внезапной смерти. Для пациентов, страдающих LQT3, нарушение сердечного ритма возникает во время отдыха и сна. Это заболевание возникает в результате мутаций в гене $Na_v1.5$, приводящих к нарушению быстрой инактивации канала, причем возможны различные варианты: канал может открываться после перехода в инактивированное состояние, инактивация может быть замедлена, может быть ускорен переход из инактивированного состояния в состояние покоя или может быть увеличен максимальный ток через канал [119].

Таблица 6. Роль Na_v в заболеваниях сердца. Адаптировано из [119].

Белок	Болезнь сердца
α-Субъединица	
$Na_v1.5$	Синдром удлиненного интервала QT 3 типа, синдром Бругада, нарушение проводимости сердца, синдром слабости синусового узла, асистолия предсердий, дилатационная кардиомиопатия, фибрилляция предсердий, синдром внезапной детской смерти
β-Субъединица	
$\beta1$	Синдром Бругада, нарушение сердечной проводимости, фибрилляция предсердий
$\beta2$	Фибрилляция предсердий
$\beta3$	Синдром Бругада, нарушение сердечной проводимости, фибрилляция предсердий, идиопатическая фибрилляция желудочков
$\beta4$	Синдром удлиненного интервала QT 10 типа

Синдром Бругада является наследственным и характеризуется желудочковой аритмией и повышенной вероятностью внезапной смерти, причем возникает он обычно у здоровых людей в возрасте до 40 лет. Наличие синдрома Бругада также может быть обнаружено по характерным изменениям в электрокардиограмме. Обычно это заболевание вызвано мутациями в гене $SCN5A$, приводящими к тому, что канал теряет свою функцию либо за счет ухудшения доставки канального

белка к мембране, либо за счет нарушения воротных механизмов. Это приводит к уменьшенному натриевому току, замедлению восходящей фазы потенциала действия, нарушенному ритмогенезу и, как следствие, замедлению тока крови [120, 121].

Для дилатационной кардиомиопатии характерны аритмии и фибрилляции предсердий, хотя процесс ее возникновения не до конца ясен. Показано, что в большинстве случаев это заболевание ассоциировано с мутациями в генах белков цитоскелета, хотя и мутации в гене *SCN5A* приводят к той же клинической картине. Любопытно, что большинство мутаций $Na_v1.5$, встречающихся при данном заболевании, локализовано в сенсорах потенциала [122, 123]. При этом недавние работы показывают, что одна из этих мутаций приводит к возникновению аберрантного тока, проходящего через ПЧД, так называемого ω -тока [124].

Нервно-мышечные расстройства

Основной изоформой Na_v , встречающейся в скелетной мускулатуре (и преимущественно только там), является $Na_v1.4$, причем в качестве вспомогательной, как правило, выступает $\beta 1$ -субъединица. Поэтому не удивительно, что мутации в гене $Na_v1.4$ часто приводят к дисфункции мышечной ткани и различным заболеваниям. Стоит отметить, что в настоящее время известно более 50 мутаций в гене *SCN4A*, кодирующем α -субъединицу $Na_v1.4$, и ни одной в гене *SCN1B*, кодирующем $\beta 1$ -субъединицу $Na_v1.4$, ассоциированных с какими-либо мышечными патологиями [4]. Любопытно, что все описанные мутации, кроме одной, были обнаружены в экзоне гена и являются миссенс-мутациями [4, 125].

Все мышечные каналопатии можно поделить на два класса: миотонии и периодические параличи (Рисунок 6). Миотонии характеризуются длительными тоническими спазмами мышц, возникающими вслед за начальными произвольными движениями. При этом больной не может расслабить сокращенные мышцы в течение нескольких десятков секунд. При некоторых разновидностях миотоний возможно постепенное преодоление спазма за счет повторных произвольных сокращений, так называемый «эффект разогрева мышц». В свою очередь, для периодических параличей характерны внезапные приступы мышечной слабости, проявляющиеся в невозможности сократить конкретную мышцу или группу мышц в течение нескольких минут или часов. При этом, как правило, параличу не подвержены дыхательные и глотательные мышцы. У приступов нет определенной периодичности, но есть ряд стимулов, которые могут их спровоцировать: отдых после интенсивной физической нагрузки, потребление богатой углеводами пищи, изменение уровня калия в крови, воздействие холода, эмоциональный стресс, беременность.

В некоторых случаях миотония может предшествовать периодическому параличу, диагноз в таких случаях ставят на основании того, какая симптоматика является более выраженной.

Миотонии

Выделяют несколько видов миотонии (Рисунок 6) [4]: болезнь Томсена (*myotonia congenita*), наследственная парамиотония (парамиотония Эйленбурга, *paramyotonia congenita*), миотония натриевых каналов, причем только две последние могут быть вызваны мутациями в гене *SCN4A*.

Миотония натриевых каналов

Частота встречаемости миотонии натриевых каналов, или миотонии, усиливающейся приемом калия, – 0,06 на 100 000 человек (для Великобритании) [126]. Заболевание обычно проявляется в возрасте до 10 лет и поражает лицевые мышцы и мышцы верхних конечностей.

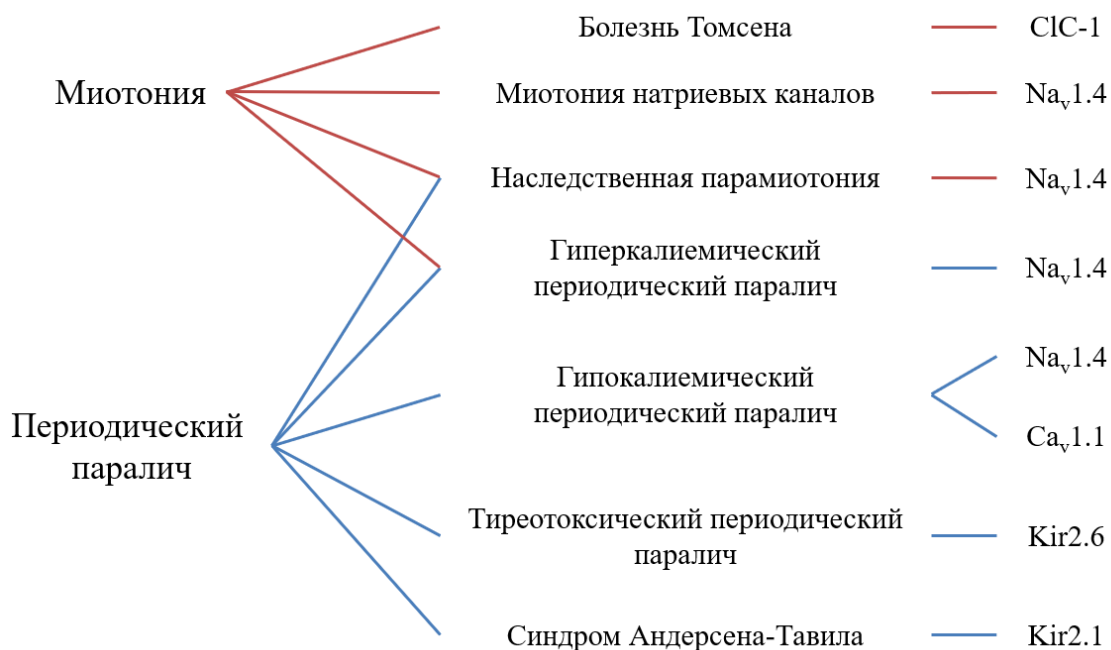


Рисунок 6. Виды мышечных каналопатий. Справа указаны ионные каналы, мутации в генах которых приводят к соответствующим каналопатиям. Адаптировано из [4].

Миотония натриевых каналов включает в себя несколько патологий. Для всех из них не свойственен паралич после миотонического приступа, но характерна чувствительность к повышению уровня калия в крови и болезненность. При этом миотонические приступы могут быть умеренной тяжести с асимптоматическими периодами, длящимися несколько месяцев (миотония с флюктуирующим течением, *myotonia fluctuans*); значительной тяжести с поражением дыхательных и

глутателльных мышц (миотония со стационарным течением, *myotonia permanens*) и миотония, чувствительная к ацетазоламиду, разной степени тяжести.

Мутации, ассоциированные с миотонией натриевых каналов, в основном сосредоточены в петле, соединяющей псевдосубъединицы III и IV (инактивационной петле), а также в цитоплазматическом конце S6. В результате скорость инактивации каналов уменьшается в ~5 раз, а скорость регенерации наоборот увеличивается [127]. В конце потенциала действия, вызванного мышечным сокращением, часть натриевых каналов оказывается не инактивирована, а внеклеточный уровень калия повышен, что может спровоцировать повторный потенциал действия. В итоге на физиологическом уровне это проявляется в виде миотонического приступа.

Наследственная парамиотония

Частота встречаемости наследственной парамиотонии – 0,17 на 100 000 человек (для Великобритании) [126]. Как и миотония натриевых каналов, заболевание проявляется в возрасте до 10 лет и поражает лицевые мышцы и мышцы верхних конечностей. Отличительной чертой наследственной парамиотонии является отсутствие «эффекта разогрева мышц»: повторные произвольные сокращения приводят к ухудшению состояния. Миотонические приступы обычно протекают безболезненно, а после приступа часто наступает мышечная слабость, характерная для гиперкалиемического периодического паралича. Это согласуется с тем фактом, что миотонический приступ у больных может быть инициирован повышением уровня калия, а также с тем, что одна и та же мутация может привести как к наследственной парамиотонии, так и к гиперкалиемическому параличу [128]. Кроме того, больные парамиотонией чувствительны к температуре: симптомы усугубляются при охлаждении мышцы. Например, в холодную погоду больные испытывают сложности с открытием век или сокращением лицевых мышц. Другими триггерами миотонических приступов могут служить эмоциональный стресс, беременность, гипотиреоз, а также анестетики общего действия [129].

Мутации $Na_v1.4$, вызывающие наследственную парамиотонию, в основном сосредоточены в петле, соединяющей псевдосубъединицы III и IV, а также в сегменте IVS4 (Рисунок 7). Они приводят к избыточному натриевому току либо за счет замедления/ингибирования инактивации, либо за счет облегчения активации. Механизм возникновения миотонических приступов сходен с описанным для миотонии натриевых каналов.

Периодические параличи

Выделяют несколько разновидностей периодического паралича (Рисунок 6), но только гипер- и гипокалиемический периодический паралич ассоциирован с мутациями в гене *SCN4A*.

Гиперкалиемический периодический паралич

Приблизительная встречаемость заболевания – 1:200 000 [130]; проявляется оно в первое десятилетие жизни больного. Приступы гиперкалиемического периодического паралича длятся 30–120 минут, хотя полное восстановление активности мышц иногда занимает дни. Провоцируются они, как правило, повышением уровня калия в крови до значений выше 5,5 мМ (при норме 3,5–5,5 мМ), что может быть вызвано потреблением богатой калием пищи, отдыхом после физической нагрузки, а также эмоциональным стрессом. Кроме того, приступам гиперкалиемического периодического паралича часто предшествуют миотонические приступы.

Мутации, ассоциированные с гиперкалиемическим периодическим параличом, в основном сосредоточены в петлях PIS4–S5 и PIS4–

S5 (Рисунок 7), участком канала, с которым, по-видимому, связываются инактивационные ворота при инактивации [131], что приводит к неполной инактивации натриевых каналов [132]. При повышении концентрации калия вне клетки потенциал покоя сдвигается в менее отрицательную область, что приводит к активации Na_v , часть из которых не может инактивироваться. В результате мембранный потенциал устанавливается на уровне около -50 мВ, и Na_v оказываются в инактивированном состоянии, что приводит к потере мышечным волокном способности проводить электрический импульс и, как следствие, к параличу.

Гипокалиемический паралич

Приблизительная встречаемость заболевания – 1:100 000 [133]; проявляется оно обычно во взрослом возрасте, а приступы гипокалиемического периодического паралича длятся несколько часов. Основным триггером приступов является снижение концентрации калия в крови до уровня ниже 3,5 мМ (при норме 3,5–5,5 мМ), что может быть спровоцировано потреблением высокоуглеводной пищи или отдыхом после интенсивных упражнений. В 20% случаев

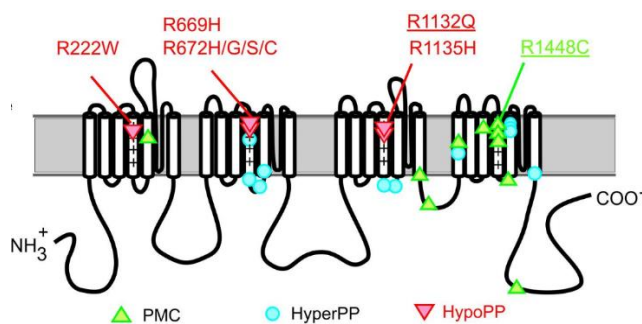


Рисунок 7. Мутации, приводящие к мышечным каналопатиям. PMC – наследственная параимитония, HyperPP – гиперкалиемический периодический паралич, HypoPP – гипокалиемический периодический паралич [3].

гипокалиемический паралич вызывается мутациями в гене *SCN4A*, в то время как в 60% случаев мутации обнаруживаются в гене *CACNA1S*, кодирующем потенциал-чувствительный кальциевый канал $Ca_v1.1$, а еще в 20% причина заболевания не обнаружена [4]. Для приступов гипокалиемического паралича не характерны предваряющие их миотонические приступы.

В настоящее время известно ~10 мутаций, приводящих к возникновению гипокалиемического периодического паралича, причем все они приводят к замене остатков аргинина в N-концевых участках сенсоров потенциалов ПЧД-I-III (Рисунок 7) [134]. При потенциале покоя мутантные каналы проводят ионные токи по аномальному пути в области сенсора потенциала, так называемые ω -токи [135]. Ионы проходят внутрь клетки через «трещину» в структуре канала, образовавшуюся между мутантным остатком в S4 и остальной частью ПЧД (Рисунок 8) (будем называть ее ω -порой). При этом ω -токи проходят, когда ПЧД находится в неактивированном состоянии, и прекращаются при активации канала (при потенциале >-40 В). ω -Токи примерно в 1000 раз меньше α -токов, токов проходящих через ПД каналов [136]. Обычно, ω -поры неселективны для

одновалентных катионов, но замены R669H и R672H в S4 домена II приводят к образованию протон-селективных ω -пор [137]. Стоит отметить, что мутации в N-концевых аргининах сегмента S4 домена IV, ассоциированные с миотонией, а не гипокалиемическим периодическим параличом, не приводят к возникновению ω -токов [3]. При восьми из десяти мутаций, ассоциированных с данным заболеванием, ω -токи активируются при гиперполяризации [4]. Однако у нескольких семей обнаружены мутации третьего аргинина в S4 домена II (R675), при этом наблюдают смешанный клинический фенотип с признаками как гипо-, так и гиперкалиемического паралича. Эту патологию обычно выделяют и называют нормокалиемическим периодическим параличом, чувствительным к концентрации калия, причем ω -токи возникают при деполяризации до напряжения -50 мВ или больше [138]. Сенсор потенциала в таком случае стабилизируется в активированном состоянии и после деактивации канала сохраняет способность проводить ω -токи, что наблюдается и при гипокалиемическом периодическом параличе.

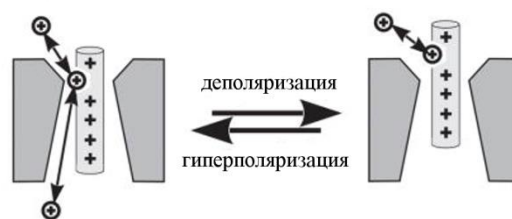


Рисунок 8. Схематическое изображение ω -токов при гипокалиемическом периодическом параличе.

Лиганды Na_v

В настоящее время известно большое множество молекул, связывающихся с Na_v . Их можно классифицировать по разным параметрам. По молекулярной массе лиганды можно разделить на низкомолекулярные (<1 кДа), пептидные (1–10 кДа) и высокомолекулярные (>10 кДа). Характер воздействия на каналы позволяет выделить поровые блокаторы, а также модуляторы, в том числе модуляторы активации, модуляторы инактивации, модуляторы смешанного действия. Наконец, часто лиганды делят на группы, основываясь на сайте их связывания с Na_v . Рассмотрим последнюю классификацию подробнее.

В Na_v к настоящему моменту было выявлено по крайней мере восемь различных сайтов связывания с лигандами (Рисунок 9), причем все они локализованы в α -субъединице [2]. Такие фармакологические сайты могут быть аллостерически сопряжены друг с другом, то есть конформационные изменения, вызванные связыванием лиганда в одном сайте, влияют на аффинность лигандов к другим сайтам [139-141]. Большое количество известных лигандов натриевых каналов представляют собой токсины, выделенные из различных групп живых организмов – от бактерий до позвоночных.

Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 1

Рецепторный сайт 1 сформирован остатками, располагающимися в поровых петлях и формирующими селективный фильтр. Молекулы, связывающиеся с этим сайтом, физически препятствуют прохождению ионов Na^+ сквозь канальную пору, не меняя кинетики работы канала. Их можно разделить на две группы: водорастворимые гетероциклические и пептидные молекулы.

Гетероциклические молекулы

Наверное, самым известным лигандом Na_v является ТТХ (Рисунок 10), выделенный впервые из рыбы *Takifugu rubripes* и сыгравший немаловажную роль в выделении и изучении натриевых каналов. В настоящее время ТТХ был обнаружен в тканях более, чем 40 видов рыб [142], а также в моллюсках, крабах, тритонах, птицах и других животных [143, 144]. Любопытно, что эти животные не способны самостоятельно вырабатывать ТТХ: его синтезируют бактерии, живущие с ними в симбиозе. Другой водорастворимый гетероциклический гуанидиновый нейротоксин, сакситоксин (STX) (Рисунок 10), продуцируется морскими динофлагеллятами, в частности, *Gonyaulax catenella*,

может быть найден в двустворчатых моллюсках, которые питаются этими водорослями [145], а также производится цианобактериями, например, из рода *Scytonema* [146].

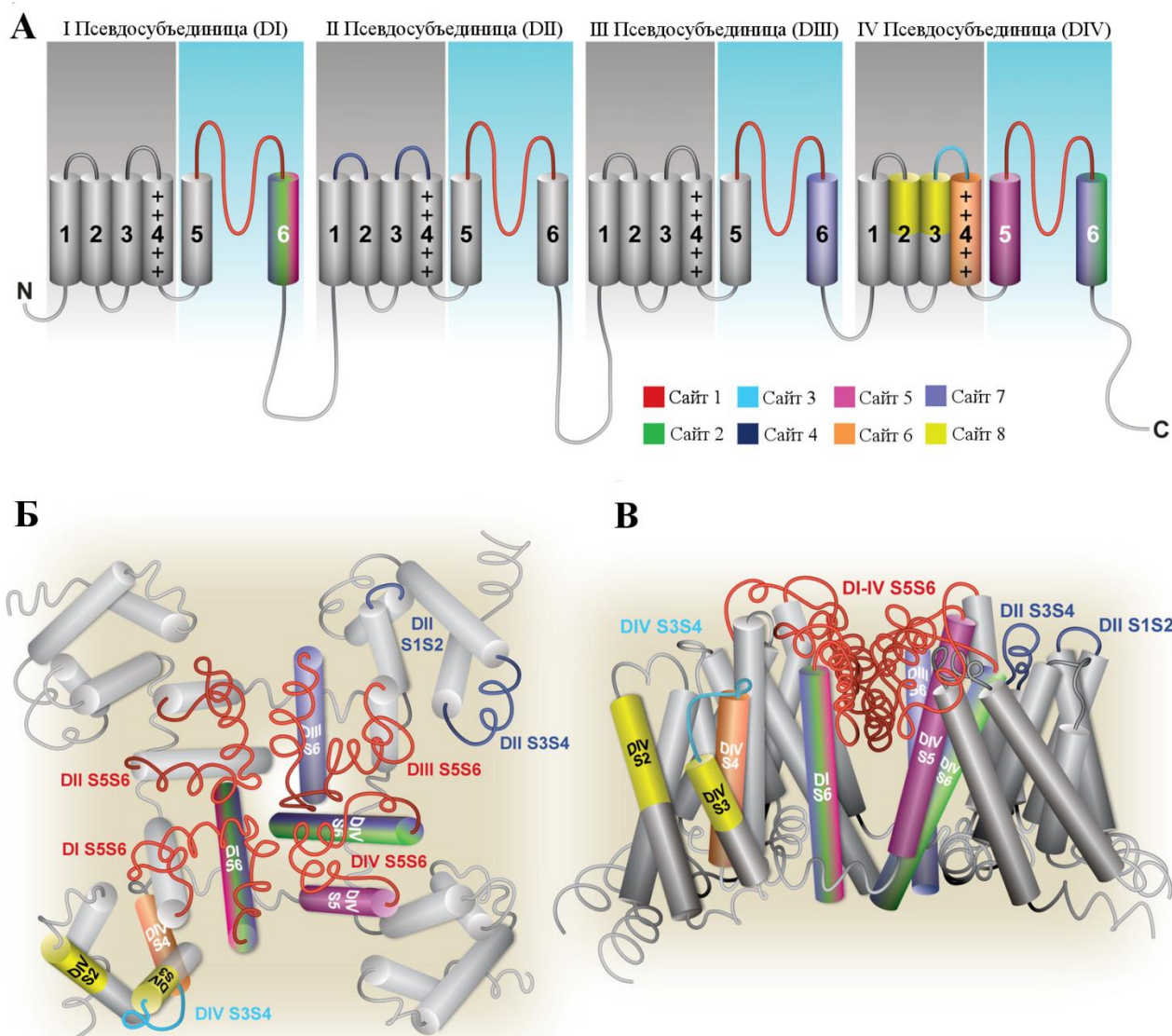


Рисунок 9. Рецепторные сайты Na_v . А – топология α -субъединицы Na_v , Б и В – вид на натриевый канал сверху и сбоку. Рецепторные сайты обозначены цветами согласно легенде. Адаптировано из [2].

Было показано, что сайт связывания ТТХ и СТХ сформирован заряженными а.о., формирующими селективный фильтр, а также близлежащими незаряженными остатками [147]. Так, нейтрализация каждого из зарядов во внешнем и внутреннем кольцах селективного фильтра (EE(M/D)D- и DEKA-мотивах) приводило к снижению аффинности ТТХ в ~ 104 раз [148]. Мутация ароматического а.о. Y или F (в зависимости от изоформы), расположенного в Р-петле псевдосубъединицы I, приводила к снижению чувствительности канала к ТТХ в 1000 раз [149, 150], что по-видимому, связано с

участием этого остатка в π -катионном взаимодействии с гуанидиновой группой лиганда [151]. То же справедливо и для STX, хотя значение ароматического остатка для него не так существенно [147].

Для блокирования канала функционально важными для TTX и STX оказались гидроксилы в

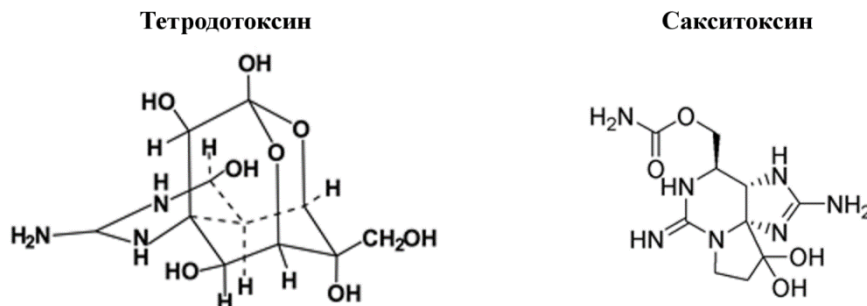


Рисунок 10. Структурные формулы TTX и STX.

положениях C9 и C10 для TTX или в положении C12 для STX, которые участвуют в формировании водородных связей с остатками канала и вероятно отвечают за позиционирование лиганда, а также гуанидиновые группы, которые проникают в пору, взаимодействуют там с заряженными и ароматическими остатками и таким образом обеспечивают физический блок хода ионов [152]. Такой характер взаимодействия TTX и STX с Na_v подтверждают и недавние структурные данные [23, 24].

Стоит отметить, что широко используется разделение Na_v на две группы: TTX-чувствительные каналы ($\text{Na}_v1.1-1.4$, $\text{Na}_v1.6-1.7$), которые ингибируются при наномолярных концентрациях TTX, и TTX-устойчивые каналы ($\text{Na}_v1.5$, $\text{Na}_v1.8$ и $\text{Na}_v1.9$), которые ингибируются только при микромолярных концентрациях токсина (Таблица 1). Потеря чувствительности ряда изоформ натриевого канала к TTX объясняется заменой ароматических а.о. в Р-петле псевдосубъединицы I, характерных для TTX-чувствительных каналов, на остаток цистеина в $\text{Na}_v1.5$ и серина в $\text{Na}_v1.8$ и $\text{Na}_v1.9$ [6].

μ -Конотоксины

Большинство известных блокаторов Na_v пептидной природы – μ -конотоксины, которые были выделены из яда конусов, хищных брюхоногих моллюсков, обитающих в теплых и тропических морях и океанах по всему миру [153, 154]. Эти молекулы состоят из 16–26 а.о., содержат 3 дисульфидных мостика, остатки оксипролина и иногда амидированный С-конец. μ -Конотоксины так же, как и TTX и STX, взаимодействуют с рецепторным сайтом 1 Na_v , хотя сайты связывания этих молекул перекрываются, а не совпадают. Так, было показано, что μ -конотоксины ингибируют связывание TTX и STX, однако, ряд мутаций, влияющих на аффинность гетероциклических

молекул, не влияет на связывание токсинов конусов, в частности, тирозина из Р-петли псевдосубъединицы I, а также ряд заряженных а.о. из Р-петель различных псевдосубъединиц [155]. В свою очередь, наиболее важным оказался остаток глутаминовой кислоты из внешнего кольца селективного фильтра, расположенный в псевдосубъединице 2 [155]. Для токсина μ -GIIIА из *Conus geographus* было показано, что ключевым для связывания с натриевым каналом является остаток R13, который, по-видимому, и взаимодействует с глутаминовой кислотой [155, 156].

Недавние работы показывают, что μ -конотоксины могут связываться с Na_v одновременно с ТТХ [157]. Это наталкивает на мысль, что гетероциклические молекулы связываются глубже в поре, по сравнению с μ -конотоксинами, которые из-за более крупных размеров располагаются ближе к внешней части входного вестибуля, что подтверждается также структурой комплекса Na_v с μ -конотоксином GIIIА [21].

Другие пептидные блокаторы

В настоящее время достоверно известен всего один токсин, выделенный из яда паукообразных, который связывается с рецепторным сайтом 1. Это токсин PnTx1 из яда паука *Phoneutria nigriventer*, который является блокатором натриевых каналов млекопитающих [158, 159]. Он состоит из 78 а.о., содержит 7 дисульфидных связей, а его С-конец амидирован. Было показано, что PnTx1 конкурирует с μ -конотоксином GIIIА, но не с ТТХ, за связывание с натриевым каналом. Из этого может быть сделан вывод, что сайт связывания PnTx1 перекрывается с сайтом связывания μ -конотоксинов, но не перекрывается с сайтом связывания ТТХ [159].

Два других токсина, HNTX-I из яда китайского паука-птицеда *Haplopelma hainanum* [160, 161] и SFII из яда погребного паука *Segestria florentina* [162], предположительно также связываются с сайтом 1. Данная гипотеза основывается на том факте, что эти пептиды не изменяют вольтамперную характеристику Na_v . Однако, ранее, основываясь на подобных рассуждениях, хуветоксин-IV (HWTX-IV) из паука *Haplopelma schmidti* так же относили к поровым блокаторам [163], хотя впоследствии было показано, что он связывается с рецепторным сайтом 4 [164].

Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 2

Рецепторный сайт 2 Na_v образован в основном а.о., локализованными в трансмембранных сегментах S6 псевдосубъединиц I и IV [165, 166], хотя остатки из S6DII и S6DIII также могут принимать участие в связывании лигандов этого сайта [167, 168]. В настоящее время известно несколько низкомолекулярных веществ различной химической природы, выделенных из растений, животных и бактерий, которые связываются с сайтом 2. Это вератридин из растений семейства

лилейных Liliaceae [169], гваянотоксин из растений семейства вересковых Ericaceae [170], аконитин из семейства лютиковых Ranunculaceae [171], батрахотоксин и его гомологи из кожи колумбийской жабы рода *Phylllobates* [172] и птиц рода *Pitohui* и *Ifrita* [173], а также антиллатоксин [174] и гоиамид [175] из цианобактерий *Lyngbya majuscula*. Они приводят к тому, что натриевый канал легче активируется и остается в открытом состоянии более длительное время, что осуществляется за счет сдвига порогового потенциала активации к более отрицательным значениям (каналы открываются при более низком напряжении, в том числе и при потенциале покоя), а также замедления или ингибирования инактивации. Кроме того, понижается селективность каналов и их пропускная способность [176, 177].

Эксперименты с фотомечеными производными батрахотоксина показали, что сайт его связывания находится в поре канала [178], а направленный мутагенез выявил важные для связывания остатки в трансмембранных участках IS6 [179], III6 [180] и IVS6 [166, 181, 182]. Точный механизм действия батрахотоксина не установлен, но предполагается, что он проникает через мембрану во внутриклеточное пространство и затем связывается с порой изнутри [183], частично перекрывая ток ионов.

Сайты связывания гваянотоксина и батрахотоксина, как и в случае с ТТХ и STX, перекрываются, но не полностью. Так, например, замена Y1586 в IVS6 Na_v1.4 не влияет на связывание батрахотоксина, но полностью отменяет эффект гваянотоксина [184]. Однако замена других важных остатков в IS6 и IVS6 уменьшает аффинность обоих токсинов к рецептору [185].

Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 3

Рецепторный сайт 3 в основном образован петлями IVS3–S4 и IVS1–S2, но также петля IS5–S6 участвует в связывании лигандов этого сайта. Молекулы, воздействующие на сайт 3, замедляют или ингибируют инактивацию канала. По-видимому, молекулярный механизм такого действия состоит в стабилизации ПЧД-IV, ключевого для быстрой инактивации канала, в неактивированном состоянии, в результате чего не происходит необходимых для быстрой инактивации канала пространственных перестроек [186]. Лиганды рецепторного сайта 3 были обнаружены в ядах разных животных, но наиболее характерны они для скорпионов и морских анемонов.

α-Токсины скорпионов

Большой группой токсинов, ингибирующих инактивацию натриевых каналов, являются α-токсины скорпионов, которые представляют особый интерес в рамках представленной работы. Остановимся на них более детально.

Общая информация и классификация α -токсинов скорпионов

α -Токсины скорпионов – группа структурно и функционально родственных полипептидных нейротоксинов, которые содержат ~60–70 а.о. и 4 дисульфидные связи, а в пространстве образуют $\beta\alpha\beta\beta$ укладку [187, 188]. Как правило, α -токсины скорпионов делят на 3 группы на основе таксономической селективности их действия [189, 190] (Таблица 7):

(i) Классические α -токсины, или α -млекотоксины, имеют низкое сродство к нейрональным мембранам насекомых и проявляют низкую инсектотоксичность ($LD_{50} = 2–20$ мг/кг), но в то же самое время обнаруживают ярко выраженную активность в отношении млекопитающих как при внутрижелудочковом ($LD_{50} = 0,025–2$ мкг/кг), так и при подкожном ($LD_{50} = 10–60$ мкг/кг) способах введения. К ним относятся Aah1 [191, 192], Aah2 [191, 193, 194] и Aah3 [191, 192] из *Androctonus australis*, Ab8 из *Androctonus bicolor* [195], Bot3 из *Buthus occitanus tunetanus* [194], Lqq5 из *Leiurus quinquestriatus* [191], Lqh2 из *Leiurus quinquestriatus hebraeus* [196], BmK M8 из *Mesobuthus martensii* [197], Ts2 [198] и Ts4 [199] из *Tityus serrulatus*.

(ii) Инсектотоксины проявляют сравнительно низкую токсичность для млекопитающих при внутрижелудочковом введении ($LD_{50} \geq 50$ мкг/кг), среднюю токсичность при подкожных инъекциях ($LD_{50} \geq 50$ мкг/кг), но высокую инсектотоксичность ($LD_{50} = 5–600$ мкг/кг). При этом они не конкурируют с классическими α -токсинами за связывание в синапсосах мозга крысы, но связываются с поверхностью нейрональных мембран насекомых. К ним относятся Lqh α IT из *L. q. hebraeus* [191, 200], Lqq3 из *L. q. quinquestriatus* [191], BotIT1 [201] и Bot XIV [202] из *B. o. tunetanus*, BjaIT из *Buthotus judaicus* [203], BmKaIT1 из *M. martensii* [204] и MeuNaTx α -4 из *Mesobuthus eupeus* [205].

(iii) Для α -подобных токсинов наибольшая активность при действии на млекопитающих наблюдается в случае внутрижелудочкового введения ($LD_{50} = 1–30$ мкг/кг), в то время как при подкожном введении токсичность оказывается на два порядка ниже ($LD_{50} = 100–300$ мкг/кг). При этом они характеризуются средней по силе инсектотоксичностью ($LD_{50} = 100–400$ мкг/кг). Кроме того, α -подобные токсины конкурируют с инсектотоксинами за связывание с нейрональными мембранами насекомых, но не конкурируют с млекотоксинами в синапсосах мозга крысы [190]. К ним относят Lqh3 [191, 196, 200], Lqh4 [214], Lqh6 [208] и Lqh7 [208] из *L. q. hebraeus*, Bom3 [191] и Bom4 [191] из *Buthus occitanus mardochei*, BmK M1 [197], BmK M4 [197], BmK M7 [215], BmK M10 [212], BmK II [204, 216], и BmK α IV [217] из *M. martensii*, Bot1 и Bot2 из *B. o. tunetanus* [213], Bs-Tx28 из *Buthus indicus* [218], OD1 из *Odontobuthus doriae* [219-221], Ts5 из *T. serrulatus* [222], AamH1

и AamH2 из *Androctonus amoreuxi* [223], MeuNaTx α -1, MeuNaTx α -2, MeuNaTx α -5 [205], MeuNaTx α -12 и MeuNaTx α -13 [224] из *M. eureus*.

Таблица 7. Активность α -токсинов скорпионов в отношении млекопитающих и насекомых. *B.g.* – *Blattella germanica*, л. – личинки *Musca domestica*, i.c.v., s.c. и i.v. – внутрижелудочковый, подкожный и внутривенный способ введения, соответственно, * показывает пептиды с амидированным С-концом.

Токсин	Токсичность (LD ₅₀), мкг/кг		Ссылка
	Насекомые	Млекопитающие	
<i>α-Млекотоксины</i>			
Aah1	1 900 (<i>B.g.</i>)	0,5 (i.c.v.), 17,5 (s.c.)	[206, 207]
Aah2*	6 600 (<i>B.g.</i>)	0,025 (i.c.v.), 12 (s.c.)	[207, 208]
Aah3	10 500 (<i>B.g.</i>)	0,35 (i.c.v.), 25 (s.c.)	[206, 207]
BmK M8		10 000 (i.v.)	[197]
Bot3*		1,25 (i.c.v.)	[194]
Lqh2*	2 040 (<i>B.g.</i>)	0,1 (i.c.v.), 64 (s.c.)	[208]
Lqq5*	16 900 (<i>B.g.</i>)	0,125 (i.c.v.), 25 (s.c.)	[206, 207]
<i>Инсектотоксины</i>			
Bj α IT*	50 (<i>B.g.</i>)	> 6 000 (s.c.)	[203]
BmK α IT1	5.2 (<i>B.g.</i>)	4 500 (s.c.)	[209]
BotIT1	600 (<i>B.g.</i>)	50 (i.c.v.)	[201]
Lqh α IT	18,8 (<i>B.g.</i>)	55 (i.c.v.)	[206]
Lqq3	60 (<i>B.g.</i>)	60 (s.c.) 55 (i.c.v.) 55 (s.c.)	[206]
<i>α-Подобные токсины</i>			
BmK M1	–	530 (i.v.)	[210]
BmK M4		4 000 (i.v.)	[211]
BmK M7			
BmK M10		>50 000 (i.v.)	[212]
Vom3	360 (<i>B.g.</i>)	1,15 (i.c.v.), 150 (s.c.)	[206-208]
Vom4	140 (<i>B.g.</i>)	1,15 (i.c.v.), 275 (s.c.)	[206-208]
Bot1*		97 (i.v.)	[213]
Bot2*		16 (i.v.)	[213]
Lqh3*	200 (<i>B.g.</i>)	2,5 (i.c.v.), 160 (s.c.)	[207, 208]
Lqh6*	233 (<i>B.g.</i>)	34 (i.c.v.), 96,5 (s.c.)	[208]

Проще говоря, млекотоксины высокотоксичны в отношении млекопитающих, инсектотоксины – в отношении насекомых, а α -подобные токсины проявляют активность в отношении обеих групп организмов. Стоит отметить также, что достаточно явно прослеживается тенденция классифицировать α -токсины скорпионов, основываясь на их активности в отношении каналов того или иного таксона.

Структурные особенности, определяющие селективность α -токсинов скорпионов

В настоящее время механизм таксономической селективности α -токсинов скорпионов не до конца ясен. Сайт-направленный мутагенез ряда токсинов позволил изучить роль индивидуальных а.о. Было показано, что важными для функции токсинов остатками (при их мутации отмечают изменение эффективности токсинов более, чем в пять раз, по нумерации каждого токсина) являются: K2, F15, R18, A39, N44, T57 и K58 в Lqh2 [195, 225]; R2, K8, Y10, V13, F17, R18, W38, A39, I57, R58, V59, K62 и R64 в Lqh α IT [195, 226-228]; R2, Y5, I6, K8, H10, N11, Y14, G34, W38, Y42, G43, W47, I57, P60 и G61 в VmK M1 [210, 229-231]; Y6 и K11 в OD1 [219]; Q8, P9, Y14, F17, P18, F39, L45, I59 и K64 в Lqh3 [232]; недавние исследования также выявляют значимость (изменение эффективности токсинов более, чем в 2,5 раза) E15, D18, A19, F20, S22, I40, L41 и A52 в MeuNaTx α -5 [233]. Кроме того, были выявлены остатки, вносящие важный вклад в таксономическую селективность: K8, P9, H10, G43 и K62 в VmK M1 [210, 229, 231, 234]; K8, F17, A39 и K41 в Lqh α IT [195, 226, 227, 232]; F15 и A39 в Lqh2 [195, 225]; H15, K64 и H66 в Lqh3 [232]; P9, A19, F20 и A52 в MeuNaTx α -5 [233]. Оказалось также, что замены некоторых остатков приводит к нарушению пространственной укладки молекул [195, 225-227, 229, 230, 232], что говорит о структурной важности этих остатков.

Данные мутагенеза совместно с анализом последовательностей токсинов из разных групп позволили выделить два домена, участвующих в связывании токсина с каналом: так называемые «сердцевину», или сердцевинный домен, и «RC-домен», которые взаимодействуют с разными участками канала [225, 226, 232]. Наибольшие различия между тремя фармакологическими группами α -токсинов расположены в варибельном модуле, RC-домене, состоящем из RT-петли (остатки 8–12 по нумерации Aah2) и С-конца (остатки 56–64), скрепленных дисульфидным мостом. В этом домене расположены остатки, меняющиеся под давлением положительного отбора [195, 205, 235, 236], а также ответственные за распознавание каналов млекопитающих или каналов насекомых [189, 226]. Считается, что RC-домен взаимодействует с петлей IS5–S6 [176, 237], а его топология и гидрофильность могут влиять на таксономическую селективность. Так, RC-домен токсинов, действующих на насекомых, «выпирает» из «глобулы» пептида [189, 226], в отличие от модуля специфичности млекотоксинов, имеющего «прижатую» топологию [226]. Это связано с тем, что пептидная связь, соединяющая второй и третий остатки RT-петли токсинов, действующих на насекомых, находится в цис-конфигурации [194, 210, 234, 238]. Кроме того, было показано, что С-конец α -подобного токсина VmK M1 образует гидрофобный кластер на его поверхности, нарушение которого влияет на изменение его селективности в пользу млекопитающих или насекомых [239].

Сердцевинный домен, аминокислотная последовательность которого консервативна среди α -токсинов, включает в себя все не входящие в RC-домен остатки. По-видимому, он взаимодействует с внеклеточными петлями IVS1–S2 и IVS3–S4 [176, 237] и отвечает за распознавание натриевых каналов в целом, а также за непосредственный эффект токсина. Кроме того, этот домен обеспечивает стабильность молекулы, так как содержит ряд структурных мотивов. Кроме трех дисульфидных связей и гидрофобного «ядра», присущего водорастворимым белкам, здесь есть β -поворот и «гнездо» из четырех остатков. Остатки Y5, Y35, Y46 и Y48 (по нумерации Aah2), участвующие в π -стэкинг-взаимодействиях, располагаются ортогонально друг другу в наиболее энергетически выгодной пространственной ориентации [240]. Важность этих а.о. для стабилизации β -листа подтверждается их мутагенезом в VmK M1 [230]. Кроме того, остаток Y41, расположенный в β_2 – β_3 -петле, также участвует в ортогональных π -стэкинг-взаимодействиях и обеспечивает изгиб этой петли.

О связывании α -токсинов скорпионов с Na_v

Было показано, что хотя все α -токсины связываются с рецепторным сайтом 3 Na_v , для разных токсинов остатки канала, вовлеченные во взаимодействие, могут отличаться [241, 242]. Эксперименты с помощью мутагенеза выявили взаимодействие токсинов с IVS1–S2 [243], IVS3–S4 [244] и IVS5–S6 [245], а также с петлями IS5–S6 [243].

Эксперименты по тушению флуоресценции показали, что токсин Ts3 препятствует активации ПЧД-IV [186]. Другой токсин, Lqq5, оказался не способен связываться с мембранами [246]. Из этих двух фактов было заключено, что α -токсины скорпионов подходят к каналу с внеклеточной стороны, садятся в рецепторный сайт 3, мешают движению сенсора потенциала псевдосубъединицы IV и таким образом ингибируют инактивацию канала.

Недавние работы по изучению структуры комплекса токсина Aah2 с Na_v [20] позволяют визуализировать сайт связывания α -токсинов скорпионов. Как и показано в предыдущих исследованиях, токсин связывается с DIV и IS5–S6, причем во взаимодействии со стороны токсина принимают участие, как RC-домен, так и петля β_2 – β_3 . Более того, данное исследование помогает объяснить механизм действия Aah2: токсин связывается с Na_v таким образом, что при активации DIV между R62 токсина и R1 IVS6 возникает электростатическое отталкивание. В результате DIV находится в неактивированном состоянии, и происходит ингибирование инактивации канала.

Токсины актиний

Токсины актиний – пептиды длиной около 50 а.о., которые содержат 3 дисульфидные связи [247] и замедляют инактивацию натриевых каналов [248-250], не влияя при этом на открытие, деактивацию или медленную инактивацию канала [251-253]. Они содержат консервативный аргинин в 14 позиции (по нумерации антоплеурина В из *Anthopleura xanthogrammica*, Ap-B) [254], играющий, по-видимому, ключевую роль в токсичности [255], а гибкость петли, содержащей этот остаток, важна для узнавания различных изоформ Na_v [256, 257].

Токсины актиний взаимодействуют с Na_v схожим с α -токсинами скорпионов образом, конкурируя с ними за связывание [258]. Тем не менее, сайты связывания этих двух групп ингибиторов инактивации Na_v не совпадают, но перекрываются. Так, например, мутации K1617 и P1622 в $Na_v1.2$ повышали аффинность α -токсинов скорпионов, в то время как сразу 6 остатков петли IVS3–S4 оказались важны для связывания токсинов анемон: L1614, E1616, K1617, V1620, S1621 и L1624 [244].

Другие лиганды

В настоящее время известен ряд токсинов, выделенных из ядов пауков, которые, по-видимому, связываются с рецепторным сайтом 3. В качестве примеров можно выделить δ -атракотоксин Ar1 (робустоксин) из *Atrax robustus* [259], δ -атракотоксин Hv1a (версутоксин) из *Hadronyche versuta* [260] и JZTX-I из *Chilobrachys guangxiensis* [261]. Первые два токсина ингибируют инактивацию канала (как и другие лиганды сайта 3), а также конкурируют с α -токсинами скорпионов за связывание с нейрональными мембранами [262]. JZTX-I также ингибирует инактивацию, а сайт его связывания подтверждается мутагенезом [263, 264].

Кроме того, охарактеризовано два осиных токсина, взаимодействующих с сайтом 3 Na_v : α -помпилидотоксин из *Anoplius samariensis* и β -помпилидотоксин из *Batozonellus maculifrons* [265, 266]. Это короткие пептиды (12 остатков), не обладающие дисульфидными связями и гомологией с токсинами других организмов. Оба токсина замедляют быструю инактивацию нейрональных Na_v каналов, делая это схожим с α -токсинами скорпионов и токсинами актиний образом [53], на основании чего и был сделан вывод о сайте связывания. Кроме того, аналогично α -токсинам скорпионов и токсинам актиний, для активности этих пептидов важны катионные а.о. [267].

Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 4

Считается, что рецепторный сайт 4 в основном образован петлями IIS1–S2 и IIS3–S4, хотя а.о. из других доменов могут также принимать участие в связывании лигандов этого сайта. Токсины,

воздействующие на рецепторный сайт 4, были выделены из ядов скорпионов, пауков и конусов. Несмотря на один фармакологический сайт, такие токсины проявляют разные эффекты на Na_v . Так, они могут облегчать или ингибировать активацию, ингибировать инактивацию или одновременно действовать и на активацию, и на инактивацию. Рассмотрим основные группы токсинов, связывающихся с рецепторным сайтом 4, уделив особое внимание группе токсинов пауков, ингибирующих активацию.

β -Токсины скорпионов

β -Токсины скорпионов – группа полипептидов из яда скорпионов, которые сдвигают пороговый потенциал активации Na_v каналов в более отрицательные области мембранного потенциала. Они содержат ~60–75 а.о., прошиты четырьмя дисульфидными связями, как и α -токсины скорпионов, а в пространстве образуют $\beta\alpha\beta\beta$ укладку [188, 268, 269].

Подобно α -токсинам скорпионов, в зависимости от таксономической селективности β -токсины скорпионов делят на 3 группы:

(i) Классические β -токсины или млекотоксины, например, Cn2 из яда *Centruroides noxius* [270] и Css4 из яда *Centruroides suffusus* [271].

(ii) β -Инсектотоксины, которые в свою очередь подразделяют на возбуждающие (например, AahIT из *A. australis* [272] и Vj-xtrIT из *B. judaicus* [273]) и депрессивные β -инсектотоксины (LqhIT2 из *L. q. hebraeus* [274]). Первые понижают порог активации Na^+ каналов и, как следствие, вызывают быстрый возбуждающий паралич у насекомых. Вторые же вызывают вялый паралич у насекомых как результат сильной деполяризации мембраны.

(iii) β -Токсины смешанного действия, активные в отношении и млекопитающих, и насекомых (Ts1 из *T. serrulatus* [275] и Lqh β 1 из *L. q. hebraeus* [276]).

Сайт связывания β -токсинов формируется петлями IIS1–S2 и IIS3–S4, причем основную роль играет последняя [33, 277, 278]. Так, единичная замена G845N в $\text{Na}_v1.2$ значительно снижает активность токсинов в отношении этой изоформы [279]. Кроме того, было показано, что три а.о. (E1251, K1252 и H1257) петли IIS5–S6 важны для связывания и активности β -токсина Tz1 из яда *Tityus zulianus* [280].

Считается, что β -токсины скорпионов сначала связываются с IIS4 в неактивированном состоянии. В процессе перехода канала в открытое состояние сенсор потенциала псевдосубъединицы II переходит в активированное состояние, обнажается рецепторный сайт 4, и токсин садится в него, фиксируя сенсор потенциала в активированном состоянии. При дальнейшей деполяризации для

активации канала требуется изменение конформационного состояния меньшего количества ПЧД, что и приводит к облегчению активации [33, 279, 281].

Токсины пауков, облегчающие активацию и/или ингибирующие инактивацию Na_v

В настоящее время считается, что ряд токсинов пауков связывается с рецепторным сайтом 4. Однако, далеко не для всех из них есть достаточная доказательная база для такого заключения и ситуация однозначна. Так, ряд токсинов пауков оказывает аналогичное β -токсинам скорпионов действие: μ -агатоксины, семейство пептидов длиной 36–38 а.о. из яда паука *Agelenopsis aperta* [282], и Magi-5, амфифильный токсин из яда тарантула *Macrothele gigas* [283], также облегчают активацию Na_v . И если для Magi-5 вывод о его взаимодействии с сайтом 4 был сделан на основе экспериментов по вытеснению Css4 [284], то для μ -агатоксинов – на основе характера их действия на Na_v и сходства последовательностей с некоторыми достоверными лигандами сайта 4 [285]. Кроме того, и для Magi-5, и для наиболее изученных μ -агатоксинов показано, что они способны влиять также и на инактивацию натриевых каналов [283, 285], что подтверждается способностью Magi-5 вытеснять α -токсины скорпионов из их сайта связывания (рецепторного сайта 3) [284].

Еще одно семейство пептидных токсинов, взаимодействующих с сайтом 4, было обнаружено в яде азиатского паука *Paracoelotes luctuosus* [286]. Оно включает в себя четыре полипептида δ -PaluIT1–4, состоящих из 36–37 а.о. и ингибирующих инактивацию натриевых каналов, что роднит их с α -токсинами скорпионов. Однако эксперименты по вытеснению показали, что δ -палутоксины связываются не с третьим, а с четвертым рецепторным сайтом [287].

Наконец, для семейства β/δ -агатоксинов, состоящего из 7 пептидных токсинов, выделенных из яда паука *Agelena orientalis*, было показано, что его представители облегчают активацию Na_v и ингибируют их инактивацию. Основываясь на сходстве аминокислотных последовательностей β/δ -агатоксинов и δ -палутоксинов, предполагается, что они связываются с рецепторным сайтом 4 [285].

Токсины, ингибирующие активацию Na_v

В настоящее время известно две группы токсинов, взаимодействующие с рецепторным сайтом 4 и ингибирующие активацию натриевых каналов. Первая группа токсинов – μ O-конотоксины, которые долгое время считались блокаторами натриевых каналов. Тем не менее, было показано, что они не конкурируют с STX [288] и μ -конотоксинами [289] за связывание с рецепторным сайтом 1, но конкурируют с β -токсинами за связывание с сайтом 4 [289]. Предполагается, что в отличие от β -токсинов скорпионов, сайтом связывания μ O-конотоксинов является IIS4 в неактивированном

состоянии, причем в результате связывания эти пептиды фиксируют неактивированное состояние канала, таким образом ингибируя натриевые токи.

Другая группа токсинов, ингибирующая активацию, – семейство пептидов из ядов различных тарантулов длиной 30–35 а.о., образующих в пространстве укладку типа цистинового узла, стабилизированную 3 дисульфидными связями. В настоящее время в нем насчитывается порядка десятка представителей: ProTx-I и ProTx-II из *Thrixopelma pruriens* [290], JZTX-III из *Chilobrachys jingzhao* [291], HWTX-IV из *Haplopelma schmidti* [163, 291], CcoTx1, CcoTx2 и CcoTx3 из *Ceratogyrus marshalli* [292], PaurTx3 из *Paraphysa scrofa* [292], μ -TRTX-Phlo1a, Phlo1b и Phlo2a из *Phlogius* sp. [293]. Стоит отметить, что для наиболее изученных представителей данной группы токсинов было показано, что они являются неселективными: помимо Na_v , они также могут воздействовать и на другие молекулярные мишени. Так, ProTx-I и ProTx-II ингибируют токи через потенциал-чувствительные кальциевые каналы Т-типа $\text{Ca}_v3.1$, ProTx-I действует на канал TRPA1, а JZTX-III активен в отношении потенциал-чувствительного калиевого канала $\text{K}_v2.1$ [294–296].

Основываясь на том факте, что ингибиторы активации Na_v из тарантулов, как и β -токсины скорпионов, модулируют активацию Na_v , было сделано предположение о том, что эти токсины также связываются с рецепторным сайтом 4, что затем было подтверждено с помощью сайт-направленного мутагенеза. Так, для ProTx-II было показано, что мутация L833C в петле IIS3–S4 снижает его активность в отношении $\text{Na}_v1.2$ [297]; остатки E818 и D816 $\text{Na}_v1.7$ (петля IIS3–S4) важны для выраженной активности HWTX-IV в отношении этого канала; а остатки S799, R800 и L804 в петле IIS3–S4 $\text{Na}_v1.5$ участвуют в связывании JZTX-III с каналом [298]. Таким образом, основным сайтом связывания ингибиторов активации Na_v из тарантулов считается рецепторный сайт 4, хотя остатки канала, задействованные в связывании, отличаются от остатков, важных для связывания β -токсинов скорпионов. Стоит отметить, однако, что данные не так однозначны. Одна из работ показывает, что замена петли IIS3–S4 $\text{Na}_v1.5$ на петлю IVS3–S4 не влияла на действие ProTx-II, хотя привела к потере эффекта β -токсина Css4 [299]. Другая работа показывает, что S3–S4 петли других псевдосубъединиц, помимо II, также могут участвовать во взаимодействии с ингибиторами активации Na_v [300]. Отчасти это объясняет способность ProTx-II ослаблять быструю инактивацию $\text{Na}_v1.7$, хотя вступает в противоречие с неспособностью ProTx-II проявлять аналогичное действие в отношении $\text{Na}_v1.2$ [300, 301].

Мутагенез ингибиторов активации Na_v из тарантулов показал, что два типа остатков, гидрофобные и заряженные, являются ключевыми для функции этих молекул. Так, для ProTx-II важными оказались W5, M6, W7, W24, L29 и W30, а также E10, D12, R13, D17, R22, K26 и K27 [299];

для JZTX-III – W8, W9, W28 и W30, а для также D1 и E3 [298]; а для HWTX-IV – F6, L22, W30, Y33 и I35, а также D14 и K32 [302]. Гидрофобные остатки образуют на поверхности молекулы кластер, в то время как заряженные а.о. этот кластер окружают. Считается, что гидрофобный кластер является ключевым для взаимодействия ингибиторов активации Na_v из тарантулов с клеточными мембранами (что также подтверждается экспериментами по связыванию этих молекул с модельными мембранами [30, 246, 303]), а заряженные остатки участвуют во взаимодействии с каналом. Однако опять же ситуация неоднозначна: есть работы, демонстрирующие важность заряженных остатков для взаимодействия с липидной мембраной [303], а также работы, позволяющие предположить, что гидрофобные остатки токсина взаимодействуют также и с каналом [304, 305]. В пользу последнего варианта говорят также недавние структуры комплексов Na_v с ProTx-II и HWTX-IV [19, 24].

Основываясь на всем сказанном выше, был предложен механизм действия ингибиторов активации Na_v из тарантулов. Согласно ему, эти молекулы сначала связываются с липидной мембраной клетки, затем дрейфуют по мембране до встречи с натриевым каналом, с ПЧД-II которого они и взаимодействуют, фиксируя его в неактивированном состоянии (подобно μ О-конотоксинам). Таким образом, механизм действия ингибиторов активации Na_v можно назвать мембрано-опосредованным захватом сенсора потенциала [246, 297].

Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 5

Рецепторный сайт 5 формируется трансмембранными участками IS6 и IVS5 [306, 307]. С ним взаимодействуют жирорастворимые полициклические органические молекулы цигуатоксины и бреветоксины [141], продуцируемые динофлагеллятами *Gambierdiscus toxicus* и *Karenia brevis*, соответственно. Эти молекулы принадлежат к модуляторам смешанного действия, приводя к снижению порога активации и ингибированию инактивации канала [308, 309]. Кроме того, бреветоксины способны увеличивать время, которое канал находится в открытом состоянии, а также повышать проницаемость канала для ионов натрия [310], причем стабилизировать несколько различных проводящих состояний [311]. Цигуатоксины же наоборот вызывают снижение ионного тока [312], а также могут вызывать осцилляции мембранного потенциала [313], что свидетельствует о том, что хотя эти полициклические молекулы сходны по структуре и связываются с одним рецепторным сайтом, механизм их действия различается. К сожалению, конкретные а.о., вовлеченные во взаимодействие с цигуатоксинами и бреветоксинами пока не известны.

Токсины, взаимодействующие с рецепторным сайтом 6

Практически ничего не известно о рецепторном сайте 6. Изначально он был выделен как сайт связывания δ -конотоксинов (из яда конусов *Conus textile*, *Conus gloriamaris*, *Conus straitus* и др.), которые ингибировали инактивацию так же, как и токсины, действующие на сайт 3, но не обладали зависимостью эффекта от напряжения [314]. Сайт связывания δ -конотоксинов пока точно не известен: только для одного токсина δ -SVIE было показано, что он взаимодействует с триадой остатков YFV в петле IVS3–S4 [315]. Из этого можно заключить, что сайт связывания δ -конотоксинов совпадает или скорее перекрывается с рецепторным сайтом 3, что также подтверждается тем фактом, что δ -SVIE конкурирует за связывание с α -токсином Lqh2, хотя и не конкурирует с α -подобным токсином Lqh3 [315]. Таким образом, рецепторный сайт 6 вероятно образован петлей IVS3–S4 и возможно, другими структурными элементами натриевых каналов.

Лиганды, взаимодействующие с рецепторным сайтом 7

Рецепторный сайт 7 – сайт связывания местных анестетиков и лекарственных препаратов сходного действия [316]. Он образован а.о. сегментов S6 псевдосубъединиц I, III и IV и находится во внутренней части поры [317]. Так, мутагенез показал, что I409 из IS6, L1465, N1466 и I1469 из III S6, I1760, F1764 и Y1771 из IV S6 (по нумерации $\text{Na}_v1.2$) являются важными для связывания местных анестетиков (Рисунок 11) [318-320]. После посадки в свой сайт за счет стерических и электростатических факторов местные анестетики частично перекрывают ток ионов. Любопытен также тот факт, что местные анестетики эффективно связываются лишь с открытым или инактивированным каналом, что наталкивает на мысль, что сайт связывания «обнажается» при активации канала [321].

Долгое время считалось, что активные в отношении сайта 7 молекулы имеют к нему доступ лишь изнутри канальной поры, что делало критичной их способность к проникновению внутрь клетки сквозь мембрану [6]. Так, местные анестетики, как правило, содержат гидрофильную и гидрофобную части, соединенные линкером. Гидрофобная часть включает ароматическое кольцо, в то время как гидрофильная представляет собой одиночный четвертичный амин или содержит пиперидиновое кольцо.

С установлением пространственной структуры натриевого канала [14] другой способ проникновения к сайту 7 также представился возможным: местные анестетики сначала связываются с мембраной, а затем через лакуны в стенках канала подходят к своему сайту связывания.

Наконец, недавние работы показывают, что местные анестетики могут проникать внутрь клетки через другие каналы, например TRPV1, и лишь затем попадать в фармакологический сайт 7 натриевых каналов [322]. По-видимому, для разных молекул предпочтительнее разные механизмы проникновения в активный сайт [323].

Лиганды, взаимодействующие с рецепторным сайтом 8

Последний рецепторный сайт был выделен совсем недавно, в 2013 году, как сайт связывания двух низкомолекулярных веществ ICA-121431 и PF-04856264 (Рисунок 12); поэтому его также называют ICA/PF сайтом [324]. Оба соединения ингибируют

токи через натриевые каналы, по-видимому, за счет стабилизации его в инактивированном состоянии, но при этом молекула ICA-121431 селективна в отношении $Na_v1.3/Na_v1.1$, а PF-04856264 избирательно воздействует на изоформу $Na_v1.7$. Несмотря на разные молекулярные мишени, обе молекулы имеют одинаковый сайт связывания, сформированный внеклеточными участками IVS3 и IVS4 Na_v , и более того, взаимодействуют с а.о. в аналогичных положениях: ICA-121431 – с S1510, R1511 и E1559 $Na_v1.3$, а PF-04856264 – с Y1537, W1538 и D1586 $Na_v1.7$. Стоит отметить, что рецепторный сайт 8 частично перекрывается с рецепторным сайтом 3, так как было показано, что а.о., аналогичные остаткам в положениях E1559 и D1586 в $Na_v1.3$ и $Na_v1.7$, соответственно, участвуют в связывании α -токсинов скорпионов и токсинов анемон [18, 244, 325].

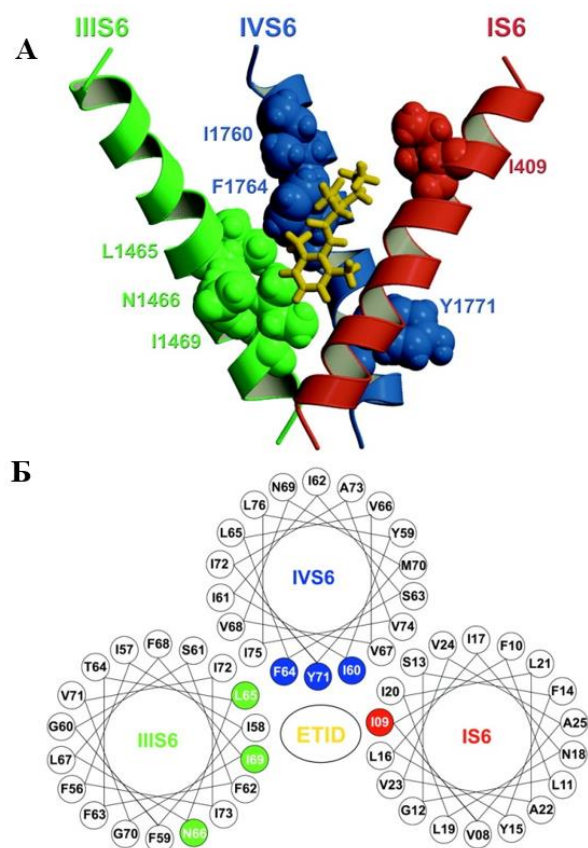


Рисунок 11. Модель связывания этидокаина с $Na_v1.2$. А – 3D модель связывания этидокаина с $Na_v1.2$. Б – круговые диаграммы спиралей, участвующих в связывании. Адаптировано из [1].

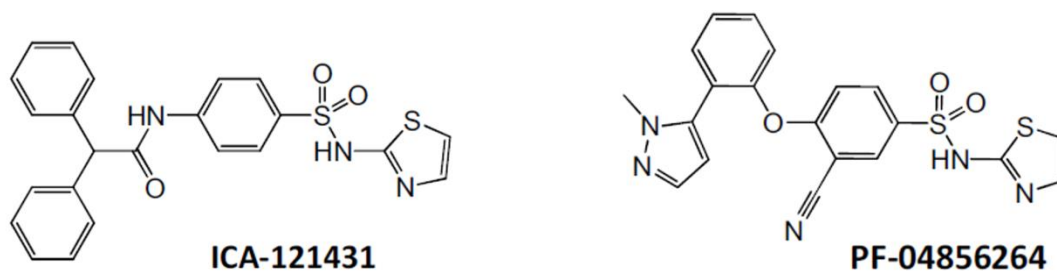


Рисунок 12. Структурные формулы лигандов рецепторного сайта 8 Na_v .

Недостатки существующей классификации рецепторных сайтов Na_v

Стоит отметить, что предложенная классификация рецепторных сайтов Na_v далека от идеальной. Так, рецепторные сайты 6 и сайт 8 значительно перекрывается с сайтом 3, что вполне может стать основанием для их объединения. Кроме того, в предложенную классификацию не вошел сайт связывания таких инсектицидов, как дихлордифенилтрихлорметилметан (ДДТ), пиретрины и пиретроиды. Поэтому несколько слов об этом, девятом, рецепторном сайте.

Рецепторный сайт 9 локализован в S6 повторов II и III (Рисунок 9). Характер физиологического действия лигандов этого сайта аналогичен характеру действия токсинов, взаимодействующих с сайтом 2, однако эффекты, оказываемые ими на Na_v разнообразны: это ингибирование инактивации, облегчение и ингибирование активации [326]. Как уже сказано выше, примерами лигандов рецепторного сайта 9 могут служить жирорастворимые инсектициды пиретрины, выделенные из цветков многолетних трав рода *Chrysanthemum*, и их синтетические аналоги пиретроиды, а также ДДТ и его аналоги [327, 328].

Критикуя выделение сайта 9, также можно отметить, что он перекрывается с рецепторным сайтом 2 Na_v , и поэтому стоит рассмотреть их объединение в будущих классификациях.

Глава 2. Материалы и методы

Материалы

Оборудование и расходные материалы

Вакуумный концентратор (Labconco, США), встряхиватель пробирок (Cole-Parmer, США), градиентный хроматограф 1525 (Waters, США), деионизатор воды Milli-Q UF Plus (Millipore, США), двуволновой детектор УФ/видимого излучения модели 2489 для ВЭЖХ-систем (Waters), колонка для аффинной хроматографии (Bio-Rad, США), колонки для обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ): Jupiter C₅ (250×4,6 мм) и Jupiter C₅ (250×10 мм; Phenomenex, США), Vydac C₁₈ (250×4,6 мм; Grace, США), ламинарный шкаф (Gelaire, Австралия), микробиологическая петля (Биолаб, Россия), микроинжектор (World Precision Instruments, США) набор автоматических пипеток на 2, 20, 200, 1000 мкл (Gilson, США), набор шприцов на 100, 500, 1000, 5000 мкл (Hamilton, США), настольные весы (Sartorius, Германия), пробирки объемом 0,5, 1,7 мл (Costar, США), пробирки объемом 15, 50 мл (Corning, США), пробирки объемом 5 мл (Greiner, США), ПЦР-амплификатор PTC-200 (MJ Research, США), система сбора данных pClamp (Axon instruments, США), спектрофотометр (Shimadzu, Япония), сублиматор (Labconco), термостат Termomixer compact (Eppendorf, Германия), термостат BT120 (Laboratorní Přístroje Praha, Чехия), термостат-шейкер (Lab-line, США), трансиллюминатор 2011 Macrovue (LKB, Швеция), ультразвуковой дезинтегратор (Cole-Parmer), ультразвуковой дезинтегратор (Badelin Electronic GmbH, Германия), усилитель Gene 500 (Axon Instruments), центрифуга 5417R (Eppendorf), центрифуга Minifuge GL (Heraeus, Германия), центрифуга MiniSpin (Eppendorf), чашки Петри (Ленинградский завод медицинских полимеров, Россия), шпатели (Биолаб), электропоратор (Eppendorf), электрофорезная камера для агарозного электрофореза (170×120 мм; Helicon, Россия).

Реактивы

2-(N-Морфолино)этансульфоновая кислота (MES; Sigma, США), N-2-гидроксиэтилпиперазин-N-2-этансульфоновая кислота (HEPES; Sigma), ¹⁵N-меченый хлорид аммония (CIL, США), агар (Serva Feinbiochemica, Германия), агароза (ICN, США), ампициллин (Синтез, Россия), ацетонитрил (Panreac, Испания), бактотриптон (Difco, США), бромистый этидий (Sigma), бромфеноловый синий (Sigma), бромциан (Sigma), буфер *VamHI* (Fermentas, Канада), гидрофосфат натрия (Sigma), глицерин (Химмед, Россия), глюкоза (Гротекс, Россия), дигидрофосфат калия (Sigma), дигидрофосфат натрия (Sigma), дейтерий (CIL), дейтерированный d3-метанол (CD₃OH, 99.5%

дейтерия; CIL), дейтерированный d1-хлороформ (CDCl₃, 100% дейтерия; CIL), ДНК-полимераза (Евроген, Россия), 2,5-дигидроксibenзойная кислота (ДНВ; Мерк), дрожжевой экстракт (Difco), изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ; Fermentas), имидазол (Диаэм, Россия), канамицин (Sigma), ксиленицианол (Amresco, Канада), лигаза фага T4 (Fermentas), 10× лигазный буфер (Fermentas), метансульфонат натрия (NaMeS; Sigma), плаزمид рЕТ-32b (Novagen, США), 10× полинуклеотид киназа (ПНК; Fermentas), 10× ПЦР-буфер (Евроген), рестриктаза *Bam*HI (Fermentas), рестриктаза *Kpn*I (Fermentas), рестриктаза *Sal*I (Fermentas), смесь четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dNTPs; Евроген), соляная кислота (Химмед), сорбент для аффинной хроматографии HisPur (Thermo Scientific, США), среда ISOGRO-15N (Sigma), стандарты для белкового электрофореза (Amersham, США), сульфат гуанидина (Sigma), сульфат магния (Sigma), тетрациклин (Sigma), тиамин хлорид (ЕХФФ, Армения), трис-(гидроксиметил)аминометан (Трис; Sigma), тритон X-100 (ICN), трифторуксусная кислота (ТФУ; Panreac), уксусная кислота (Химмед), 1-пальмитой-2-олеоил-sn-глицеро-3-фосфохолин (POPC; Avanti Polar Lipids, США), 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфо-гас-(1-глицерин) (DOPG; Avanti Polar Lipids), хлорид калия (Merck, Германия), хлорид кальция (Merck), хлорид магния (Merck), хлорид натрия (Merck), этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА; Sigma), этиловый спирт (Химмед).

Наборы реактивов

Набор реактивов для выделения ДНК из агарозных гелей GeneJET Gel Extraction Kit, набор реактивов для выделения плазмидной ДНК GeneJET Plasmid Miniprep Kit, набор реактивов для транскрипции РНК T7/SP6 mMESSAGE-mMACHINE (Ambion, США), набор реактивов для экстракции ДНК из ПЦР-смесей GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific).

Бактериальные штаммы

Escherichia coli DH5α, *E. coli* XL1 Blue, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* Origami B, *E. coli* SHuffle.

Растворы

Приготовление всех растворов и суспензий производилось с использованием деионизированной воды, очищенной до сопротивления 18,2 МОм на установке Milli-Q UF Plus (Millipore).

1. Среда LB (на 1 л H₂O): 1% бактотриптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 7,6).
2. Твердая среда LB: среда LB с добавлением 1,5% агара.

3. Стартовый буфер для аффинной хроматографии: 20 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 300 мМ хлорид натрия.
4. Промывочный буфер для аффинной хроматографии: 500 мМ хлорид натрия, 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 5 мМ имидазол, 5% глицерин, 0,1% Тритон X-100.
5. Элюирующий буфер для аффинной хроматографии: 50 мМ Трис-НСl (рН 8,0), 300 мМ хлорид натрия, 150 мМ имидазол.
6. Раствор А для ОФ-ВЭЖХ: 0,1% ТФУ в воде.
7. Раствор В для ОФ-ВЭЖХ: 0,1% ТФУ в ацетонитриле.
8. Раствор ND96 для ооцитов: 93,5 мМ NaCl, 2 мМ KCl, 1,8 мМ CaCl₂, 2 мМ MgCl₂, 5 мМ HEPES (рН 7,4).
9. 10×Буфер М9: 5 г NaCl, 60 г Na₂HPO₄ (рН 7,4), 30 г KH₂PO₄ (на 1 л H₂O).
10. Питательная среда М9: 10% 10×буфера М9, 1 мМ MgSO₄, 0,1 мМ CaCl₂, 1,13 мМ хлорид тиамина, 0,2% глюкозы, 13 мМ ¹⁵NH₄Cl, 1 г ISOGRO-¹⁵N.
11. Буфер для нанесения образцов для электрофореза: 10 мМ Трис-НСl (рН 7,8), 40% глицерин, 40 мМ ЭДТА, 0,01% бромфеноловый синий, 0,01% ксиленцианол.
12. Буфер ТАЕ (на 1 л H₂O): 40 мМ Трис-ацетат (рН 7,6), 1 мМ ЭДТА.

Программное обеспечение

Breeze 2 (Waters), Clampex 10.4 (Molecular Devices, США), ClampFit 10.4 (Molecular Devices), ClustalW (Conway Institute UCD Dublin, Ирландия), Gromacs 4.0.7 (Швеция), MODELLER 8.2 (Salilab, США), Lasergene (DNASTAR, США), GPMW 4.0 (Lighthouse data, Дания), OriginPro 8.0 (OriginLab Corp., США), PLATINUM (Laboratory of Biomolecular Modeling, Россия), PyMOL (DeLano Scientific, США).

Методы

Полимеразная цепная реакция

Для проведения ПЦР использовали реакционную смесь следующего состава (Таблица 8):

Общий вид программы для ПЦР-амплификатора:

1. 94°C – 20 с – денатурация ДНК,
2. T_{отж} – 20 с – отжиг праймеров,
3. 72°C – 20 с – элонгация цепи,
4. Повторение шагов 1–3 25 раз,

5. 72°C – 7 мин – дополнительная стадия элонгации,

6. 10°C – 10 мин – охлаждение реакционной смеси.

Таблица 8. Состав реакционной смеси для ПЦР.

Компонент смеси	Необходимое количество (на 100 мкл смеси)
10× ПЦР-буфер	10 мкл
dNTPs (10 мМ)	2,5 мкл
ДНК-полимераза	1 ед. акт.
ДНК-матрица	<1 мкг
праймер f_1 (10 мкМ)	2,5 мкл
праймер rev (10 мкМ)	2,5 мкл

Выделение и очистка ДНК из ПЦР-смеси

Выделение и очистку ДНК из ПЦР-смеси проводили с помощью набора реактивов GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) по методике компании-производителя.

Синтез гена, кодирующего целевой продукт

Методом обратной трансляции, исходя из аминокислотной последовательности целевого (поли)пептида, составляли последовательность ДНК, его кодирующую. Полученную последовательность разбивали на несколько фрагментов размером не более 50 нуклеотидов, которые синтезировались компанией Евроген (Таблица 9). Синтез полноразмерной последовательности производили с помощью методов лигирования и ПЦР (Таблица 10). Для этого готовили две смеси (объемом 20 мкл каждая):

- а) смесь 1, содержащую по 2 мкМ праймеров f_2, f_3, \dots, f_n ; 1× лигазный буфер и 10 ед. акт. ПНК;
- б) смесь 2, содержащую по 2 мкМ праймеров $f_1, rev_{1/2}, rev_{2/3}, \dots, rev_{(n-1)/n}$ и 1× лигазный буфер ($n=5$ для ВеМ9 и его производных; $n=3$ для Нм-3).

Смесь 1 инкубировали 20 мин при 37°C. Затем в отдельную пробирку вносили по 5 мкл каждой из смесей и полученный раствор инкубировали при 96°C в течение 5 мин и охлаждали до 20°C в течение 20 мин. Затем к смеси добавляли 1 мкл раствора ДНК-лигазы фага Т4. Инкубацию проводили в течение ночи при 16°C. Нарботку вставки производили с использованием метода ПЦР с праймерами f_1 и rev . В качестве матрицы использовали лигазную смесь, разбавленную в 100 раз.

Таблица 9. Последовательности всех олигонуклеотидных праймеров, использованных в работе

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера
Hm-3-f1	ATGCGGATCCATGGGATGTATAGCCAAGAAT
Hm-3-f2	AGGAGTGTGCCTGGTTTTAGGAGAGTGGTGTGGAG
Hm-3-f3	CCCTATCATGTAAGTATTCAATAAAGAGGAATCTAAAGATATGTG
Hm-3-rev1/2	AAACCAGGCACACTCCTTATTCTTGGCTATACATCC
Hm-3-rev2/3	GAATACTTACATGATAGGGCTCCACAACACCACTCT
Hm-3-rev	GCATGTCGACCTAGACACATATCTTTAGATTCTC
M9f1	ATATGGTACCATGGCTCGTGACGTTACATCGTA
M9f2	AACCGCACAACCTGCGTTTACGAATGCTACAACCCGAAAGGTTCTT
M9f3	ACTGCAACGACCTGTGCACCGAAAACGGTGTGAATCTGGTTACT
M9f4	GCCAGATCCTGGGTAAATACGGTAACGCTTGCTGGTGCATCCA
M9f5	GCTGCCGGACAACGTTCCGATCCGTATCCCGGGTAAATGCC
M9r1/2	AAACGCAGTTGTGCGGTTTAGCGATGTAAGCGTCAC
M9r2/3	TGCACAGGTCGTTGCAGTAAGAACCTTTCCGGTTGT
M9r3/4	ATTTACCCAGGATCTGGCAGTAACCAGATTCAGCAC
M9r4/5	GAACGTTGTCCGGCAGCTGGATGCACCAGCAAGC
M9r	GCATGGATCCCTAGTGGCATTACCCGGGATAC
M9a4/g-f1	ATATGGTACCATGGCTCGTGACGTTACATCGTA
M9a4/g-rev1/2	AAACGCAGTTGTGCGGTTTAGCGATGTAACCGTCAC
M9y17/g-f2	AACCGCACAACCTGCGTTTACGAATGCG GCAACCCGAAAGGTTCTT
M9l41/q-f4	GCCAGATCCAGGGTAAATACGGTAACGCTTGCTGGTGCATCCA
M9l41/q-r3/4	ATTTACCCTGGATCTGGCAGTAACCAGATTCAGCAC
M9i59,61/q-f5	GCTGCCGGACAACGTTCCGCAGCGTCAGCCGGGTAAATGCC
M9i59,61/q-r	GCATGGATCCCTAGTGGCATTACCCGGCTGAC
M9ph/ny-f2	TTGTTTATAACTGCGTTTACGAATGCTACAACCCGAAAGGTTCTT
M9ph/ny-r1/2	AAACGCAGTTCTCATTTTTAGCGATGTAAGCGTCAC
M9/Aah/G-f1	ATATGGTACCATGGCTCGTGACGTTACATCGCTG
M9/Aah/G-f2	ATGATGTGAACTGCGTTTACGAATGCGGTAACCCGAAAGGTTCTT
M9/Aah/G-rev1/2	AAACGCAGTTCACATCATCAGCGATGTAAGCGTCAC
M9/Aah-f4	GCCAGATCGCGTCTCCGTACGGTAACGCTTGCTGGTGCATCCA
M9/Aah-r3/4	ACGGAGACGCGATCTGGCAGTAACCAGATTCAGCAC
M9/Aah-f5	GCTGCCGGACAACGTTCCGTACCAAAGGTCCGGGTCGTTGCC
M9/Aah-r	GCATGGATCCCTAGTGGCAACGACCCGGGCCTT
M9/Aa-f1	ATATGGTACCATGGCTCGTGACGTTACATCGCTG
M9/Aa-f2	ATGATGTGAACTGCGTTTACGAATGCTACAACCCGAAAGGTTCTT
M9/Aa-r1/2	AAACGCAGTTGTGATCATCAGCGATGTAAGCGTCAC
M9/Aa-f5	GCTGCCGGACAACGTTCCGTATCCGTATCCCGGGTAAATGCC
M9/pos-f1	ATATGGTACCATGGCTAAAGACGTTACATCGTA
M9/pos-r1/2	AAACGCAGTTGTGCGGTTTAGCGATGTAAGCGTCTT
M9/pos-f5	GCTGCCGGACAACGTTCCGATCAAAATCCCGGGTCGTTGCC
M9/pos-r	GCATGGATCCCTAGTGGCAACGACCCGGGATT

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймера
M9/Aah/GG-rev1/2	AAACGCAGTTCACATCATCAGCGATGTAACCGTCAC
M9r60/k-f5	GCTGCCGGACAACGTTCCGATCAAAATCCCGGGTAAATGCC
M9r60/k-r	GCATGGATCCCTAGTGGCATTACCCGGGATTT
M9y17/g-r2/3	TGCACAGGTCGTTGCAGTAAGAACCTTTCGGGTTGC
M9E15F-f2	AACCGCACAACCTGCGTTTACTTCTGCTACAACCCGAAAGGTTCTT
M9E15D-f2	AACCGCACAACCTGCGTTTACGACTGCTACAACCCGAAAGGTTCTT
M9-mammal-f2	ATGATGTGAATTGCACCTATTTTTGCGGCCGTAATGCGTATTGCA
M9-mammal-f3	ATGATCTGTGCACCGAAAATGGCGCGGAATCCGGCTATTGCCAGTG
M9-mammal-f4	GGCGTCCCGTATGGCAATGCGTGCTGGTGCATTAGCTGCC
M9-mammal-f5	GGATCATGTGCGTACCAAAGGCCCGGGCCGTTGCC
M9-mammal-r1/2	TAGGTGCAATTCACATCATCCGCAATATAGCCATCAC
M9-mammal-r2/3	TTTTCGGTGCACAGATCATTGCAATACGCATTACG
M9-mammal-r3/4	TTGCCATACGGGGACGCCCACTGGCAATAGCCGGAT
M9-mammal-r4/5	TGGTACGCACATGATCCGGCAGCTGAATGCACC

Рестрикция плазмиды pET-32 и синтетического гена

Рестрикцию линейных фрагментов ДНК и плазмиды pET-32 проводили по сайтам *Bam*HI и *Kpn*I/*Sal*I в буфере *Bam*HI при температуре 37°C в течение 4 ч с использованием соответствующих ферментов. Реакционная смесь (50 мкл) содержала: 1× буфер для рестрикции; 0,5 и 1 ед. акт. рестриктаз *Bam*HI и *Kpn*I/*Sal*I, а также 200–500 нг ДНК. Полноту протекания рестрикции и ее селективность контролировали методом ДНК-электрофореза в агарозном геле.

Электрофорез в агарозном геле

На несмачиваемой поверхности смешивали 0,2–0,5 мкл буфера для нанесения образцов и 2 мкл анализируемого образца ДНК. Получившуюся смесь переносили в лунку в геле. В зависимости от задачи использовали 1–5% агарозный гель с лунками нужного объема. Электрофорез проводили в буфере TAE при напряжении 110 В. Для визуализации использовали трансиллюминатор.

Выделение ДНК из агарозного геля

После разделения ДНК с помощью электрофореза в 1% агарозном геле полосу, содержащую интересующий продукт, определяли по свечению при облучении УФ-светом, вырезали скальпелем и помещали в пробирку. Выделение рестрицированных фрагментов осуществляли с помощью набора реактивов GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Scientific) по методике компании-производителя.

Таблица 10. Олигонуклеотидные праймеры, использованные для синтеза генов целевых продуктов

Целевой продукт	Олигонуклеотидные праймеры, использованные для синтеза гена целевого продукта
Hm-3	Hm-3-f1, Hm-3-f2, Hm-3-f3, Hm-3-rev1/2, Hm-3-rev2/3, Hm-3-rev
BeM9	M9f1, M9f2, M9f3, M9f4, M9f5, M9r1/2, M9r2/3, M9r3/4, M9r4/5, M9r
M9.1	M9a4/g-f1, M9y17/g-f2, M9f3, M9f4, M9f5, M9a4/g-r1/2, M9y17/g-r2/3, M9r3/4, M9r4/5, M9r
M9.2	M9f1, M9f2, M9f3, M9l41/q-f4, M9i59,61/q-f5, M9r1/2, M9r2/3, M9l41/q-r3/4, M9r4/5, M9i59,61/q-r
M9.3	M9a4/g-f1, M9y17/g-f2, M9f3, M9l41/q-f4, M9i59,61/q-f5, M9a4/g-r1/2, M9y17/g-r2/3, M9l41/q-r3/4, M9r4/5, M9i59,61/q-r
M9.4	M9f1, M9ph/ny-f2, M9f3, M9f4, M9f5, M9ph/ny-r1/2, M9r2/3, M9r3/4, M9r4/5, M9r
M9.5	M9/Aah/G-f1, M9/Aah/G-f2, M9f3, M9/Aah-f4, M9/Aah-f5, M9/Aah/GG-rev1/2, M9y17/g-r2/3, M9/Aah-r3/4, M9/Aah-r
M9.6	M9/Aa-f1, M9/Aa-f2, M9f3, M9f4, M9/Aa-f5, M9/Aa-r1/2, M9r2/3, M9r3/4, M9r4/5, M9r
M9.7	M9/pos-f1, M9f2, M9f3, M9f4, M9/pos-f5, M9/pos-r1/2, M9r2/3, M9r3/4, M9r4/5, M9/pos-r
M9.8	M9f1, M9f2, M9f3, M9f4, M9r60/k-f5, M9r1/2, M9r2/3, M9r3/4, M9r4/5, M9r60/k-r
M9.9	M9f1, M9E15F-f2, M9f3, M9f4, M9f5, M9r1/2, M9r2/3, M9r3/4, M9r4/5, M9r
M9.10	M9f1, M9-mammal-f2, M9-mammal-f3, M9-mammal-f4, M9-mammal-f5, M9-mammal-r1/2, M9-mammal-r2/3, M9-mammal-r3/4, M9-mammal-r4/5, M9r
M9.11	M9/Aah/G-f1, M9E15D-f2, M9f3, M9f4, M9f5, M9r1/2, M9r2/3, M9r3/4, M9r4/5, M9/Aah-r

Лигирование синтетического гена и линейризованной плазмиды рЕТ-32

Лигазная смесь (20 мкл) содержала: ~500 нг рестрицированного гена целевого продукта; ~100 нг рестрицированного вектора рЕТ-32; 1× лигазный буфер и 1 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4. Реакцию проводили в течение 1 ч при комнатной температуре.

Трансформация клеток *E. coli* методом теплового шока

Замороженную суспензию клеток *E. coli* DH5а размораживали на льду в течение 10 мин. К 50 мкл суспензии клеток добавляли 10 мкл лигазной смеси и аккуратно перемешивали. Полученную смесь инкубировали на льду в течение 30 мин и прогревали при 42°C в течение 30 с. Далее суспензию охлаждали на льду в течение 5 мин, добавляли 500 мкл среды LB и инкубировали при 37°C в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Весь объем суспензии переносили на чашку Петри с твердой средой LB с добавлением ампициллина (70 мкг/мл) в качестве селективного фактора. Чашки инкубировали при 37°C в течение ночи.

Трансформация клеток *E. coli* методом электропорации

22 мкл размороженных на льду компетентных клеток *E. coli* (штаммы XL1 Blue, BL21 (DE3), Origami B и SHuffle) смешивали с 0,5–2 мкл лигазной смеси/плазмидной ДНК и помещали в кювету для электропорации. Параметры электроимпульса устанавливали согласно рекомендациям фирмы-производителя электропоратора. После импульса к клеткам сразу же добавляли 500 мкл охлажденной на льду среды LB, суспензию переносили в 1,5 мл-пробирку, инкубировали 5 мин на льду, а затем 1 ч при 37°C. Весь объем суспензии переносили на чашку Петри с твердой средой LB с добавлением соответствующих антибиотиков в качестве селективного фактора (ампициллина (70 мкг/мл) при работе со штаммами XL1 Blue, BL21 (DE3) и Shuffle; ампициллина (70 мкг/мл), тетрациклина (12,5 мкг/мл) и канамицина (15 мкг/мл) при работе со штаммом Origami B). Чашки инкубировали при 37°C в течение ночи.

Отбор трансформантов, несущих целевой ген

Колонии *E. coli*, полученные на селективной среде после проведения трансформации, рассеивали штрихами на новой чашке Петри с твердой средой LB и соответствующими антибиотиками. Чашки инкубировали ночь при 37°C. Далее клеточный материал (~1 мкл) стерильными скрепками переносили в пробирку с реакционной смесью (20 мкл), ресуспендировали клетки и проводили ПЦР со специфичными к интересующей последовательности олигонуклеотидными праймерами f_1 и rev . Матрицей выступала тотальная нуклеиновая кислота из полученной клеточной массы.

После проведения реакции ПЦР-смеси подвергали электрофорезу в 3% агарозном геле для определения наличия вставки.

Выделение плазмидной ДНК

Для получения плазмиды, содержащей последовательность, кодирующую целевой (поли)пептид, колонии, давшие положительный результат при анализе клонов, рассеивали микробиологической петлей в 5 мл питательной среды LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл). Клетки инкубировали при 37°C в течение ночи при постоянном перемешивании.

Ночные культуры центрифугировали. Процедуру препаративного выделения ДНК из осажденных клеток проводили, используя набор реактивов GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific) по методике компании-производителя.

Секвенирование ДНК

Для проверки правильности последовательности полученной плазмидной ДНК 150 нг очищенной ДНК подвергали секвенированию по методу Сэнгера в компании Евроген.

Контролируемая экспрессия гена химерного белка

С помощью электропорации в клетки *E. coli* штаммов BL21 (DE3), Origami B или SHuffle вводили плазмидный вектор, несущий ген целевого продукта. Ночную культуру клеток, трансформированных плазмидой, разбавляли в 200 раз жидкой питательной средой LB или бедной средой M9 с добавлением соответствующих антибиотиков. Клетки инкубировали при 37°C и постоянном перемешивании до достижения оптической плотности $OD_{600} = 0,4-0,6$. После этого в смесь добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 0,2 мМ и инкубировали ее при комнатной температуре в течение ночи при постоянном перемешивании.

Ультразвуковая дезинтеграция клеток

Клетки с наработанным гибридным белком осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 3500 об/мин. Осадок суспендировали в 20–30 мл стартового буфера для аффинной хроматографии с добавлением 5% глицерина. Далее проводили лизис клеток ультразвуком с длительностью импульса 3 с и промежутком между импульсами 2 с. Амплитуда ультразвуковых колебаний составляла 30–35% от максимальной.

Аффинная хроматография

Клеточный лизат предварительно центрифугировали 15 мин при 3500 об/мин для осаждения нерастворимых компонентов. Полученную растворимую фракцию наносили на колонку с сорбентом для аффинной хроматографии HisPur, предварительно промытую стартовым буфером. Для исключения неспецифического связывания через колонку затем пропускали промывочный буфер, после чего ее вновь промывали стартовым буфером. Гибридный белок получали в результате вытеснительной элюции имидазолом. Регенерацию сорбента (удаление связавшегося с ним имидазола) проводили 20 мМ MES. Детекцию осуществляли по оптическому поглощению элюата при 280 нм.

УФ-спектрометрия

Концентрацию белка измеряли по спектру его оптического поглощения в УФ-диапазоне и рассчитывали по следующей формуле:

$$C \text{ (ммоль/мл)} = (A_{280} - A_{320}) / \epsilon_{280},$$

где C – концентрация белка, A_{280} , A_{320} – оптическая плотность раствора при длинах волн 280 и 320 нм, соответственно, ϵ_{280} – молярный коэффициент поглощения (поли)пептида при длине волны 280 нм (Таблица 11).

Таблица 11. Значения коэффициентов экстинкции и молярных масс объектов исследования

(Поли)пептид	ϵ_{280}	Молярная масса, Да
Hm-3	13020	3907,7
VeM9	13850	7335,3
M9.1	12570	7215,2
M9.2	13850	7380,2
M9.3	12570	7260,1
M9.4	15130	7378,3
M9.5	12570	7129,8
M9.6	13850	7399,3
M9.7	13850	7228,2
M9.8	13850	7228,2
M9.9	13850	7353,4
M9.10	18260	7103,8
M9.11	13850	7321,3
M9.12	13850	7336,3
M9.13	12570	7230,1

Гидролиз гибридного белка BgCN

Раствор белка разбавляли до концентрации 1 мг/мл, добавляли HCl до концентрации 0,1–0,5 М и добавляли раствор 5 М BgCN в ацетонитриле из расчета 100 моль BgCN на 1 моль остатков метионина в гибридном белке. Реакцию проводили в темноте при комнатной температуре в течение ночи.

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

Разделение смесей полипептидов и белков производили методом ОФ-ВЭЖХ в линейном градиенте раствора В (0,5–1% в минуту). При этом скорость потока подвижной фазы составляла 5 мл/мин для колонки Jupiter C₅ (250×10 мм) и 1 мл/мин во всех остальных случаях. В случае необходимости, для достижения большей чистоты целевого продукта использовали дополнительную стадию хроматографии на колонке Vydac C₁₈ в градиенте раствора В 0,5% в минуту. Во всех случаях детекция проводилась по оптическому поглощению при длинах волн 210 нм и 280 нм.

Масс-спектрометрия

Измерение молекулярных масс полипептидов с помощью метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) проводили в лаборатории протеомики ИБХ РАН на приборе Ultraflex MALDI TOF/TOF с идентификацией положительных ионов в рефлекторном режиме с точностью 1 Да (Таблица 11). В качестве матрицы использовали ДНВ.

Экспрессия генов ионных каналов

Плазмиды, содержащие гены различных потенциал-чувствительных каналов и их химер, были ранее получены в лаборатории токсикологии и фармакологии Католического университета Лёвена и в отделе физиологии университета Джонса Хопкинса. Плазмиды линейаризовали с помощью соответствующих рестриктаз и кэпированные РНК синтезировали с линейаризованных плазмид при помощи системы для транскрипции T7/SP6 mMACHINE (Ambion). Далее 4–5 нл растворов мРНК в концентрации 1 нг/нл вводили в ооциты лягушки *Xenopus laevis* с помощью микроинжектора (World Precision Instruments). Ооциты помещали в раствор ND96 (pH 7,4) и инкубировали 1–5 дней при 16°C.

Электрофизиологические исследования

Определение активности (поли)пептидов в отношении различных потенциал-чувствительных каналов проводили в лаборатории токсикологии и фармакологии Католического университета Лёвена (если не указано иное) методом двухэлектродной фиксации потенциала при комнатной температуре с помощью усилителя Gene 500 и системы сбора данных pClamp. Сопротивление электродов составляло 0,5–1,5 МОм. Токи измеряли на частоте 1–20 кГц с обработкой низкочастотным фильтром Бесселя. Вычитание токов утечки производили согласно протоколу –P/4. Исследуемые вещества растворяли в ND96 и добавляли в емкость для измерений. Раствор в емкости в течение нескольких секунд тщательно перемешивали.

Для электрофизиологической характеристики (поли)пептидов использовалось несколько протоколов. При этом прикладывали тестовый деполяризующий импульс от потенциала покоя –90 мВ или –100 мВ до потенциала V_{max} , соответствующего максимальному току для каждой конкретной изоформы в контрольном эксперименте, в течение 100 мс при частоте 0,2 Гц.

Для оценки эффекта, оказываемого исследуемыми веществами на инактивацию I_{NaV} , прикладывали тестовый деполяризующий 100-мс импульс от потенциала покоя –90 мВ до V_{max} . Вычисление условной величины, характеризующей эффективность действия вещества, проводили по следующей формуле:

$$E = \frac{I_{30}^{mutant}}{I_{min}}$$

где E – эффективность, I_{30}^{mutant} – величина тока через 30 мс после тестового импульса при добавлении токсина, I_{min} – максимальная амплитуда тока после тестового импульса без добавления токсинов. Ввиду быстрой инактивации канала сердечных клеток (hNav1.5), для расчета эффективности действия использовалась I_5^{mutant} – величина тока после добавления токсина через 5 мс после тестового импульса.

Для определения вольтамперных характеристик каналов при добавлении (поли)пептидов деполяризацию мембраны проводили каждые 100 мс в диапазоне от -90 мВ до $+70$ мВ с интервалом 5 мВ. Проводимость Na^+ (g_{Na}) рассчитывали из токов в соответствии с законом Ома: $g_{\text{Na}} = I_{\text{Na}} / (V - V_{\text{rev}})$, где I_{Na} – амплитуда натриевого тока при тестовом потенциале V , а V_{rev} – потенциал реверсии. График зависимости g_{Na} от напряжения был построен с использованием уравнения Больцмана: $g_{\text{Na}}/g_{\text{max}} = [1 + \exp((V_{1/2} - V)/k)]^{-1}$, где g_{max} – максимальное значение g_{Na} , $V_{1/2}$ – напряжение, соответствующее полумаксимальной проводимости, а k – коэффициент наклона.

Изучение зависимости проводимости химерных каналов Kv2.1 с пересаженными ПЧД Nav1.4 от напряжения проводили в отделе физиологии университета Джонса Хопкинса. Графики строили с использованием уравнения Больцмана: $g/g_{\text{max}} = [1 + \exp((V_{1/2} - V)/k)]^{-1}$, где g/g_{max} – нормализованная проводимость канала, $V_{1/2}$ – напряжение, соответствующее полумаксимальной проводимости, а k – коэффициент наклона.

При изучении «стационарной инактивации» (steady-state inactivation) использовали стандартный двухступенчатый протокол: за импульсом длительностью 100 мс (от -90 мВ до $+60$ мВ с интервалом 5 мВ) следовал импульс длительностью 50 мс до V_{max} . Ток натрия был нормализован к его максимальной амплитуде; график зависимости нормализованного тока от величины предимпульса был построен с использованием уравнения Больцмана: $I_{\text{Na}}/I_{\text{max}} = [1 + \exp((V - V_{1/2})/k)]^{-1}$, где $V_{1/2}$ – напряжение, соответствующее полумаксимальной проводимости, а k – коэффициент наклона.

При исследовании зависимости эффекта (поли)пептидов от напряжения деполяризацию мембраны проводили с увеличением амплитуды импульса до 100 мВ и/или его длительности до 800 мс с последующей 20-мс реполяризацией до удерживающего потенциала -100 мВ и тестовым импульсом до 0 мВ. Нормализацию проводили следующим образом: амплитуду тока I_{Na} при приложении 1 мкМ Nm-3 считали равной 0, а амплитуду тока I_{Na} при приложении предимпульса 700 мс – равной 1. Далее строили график зависимости нормализованного тока от времени: $f(t) = (I_t - I_0) / (I_{700 \text{ мс}} - I_0)$, где I_t – амплитуда тока при длительности предимпульса t , I_0 – амплитуда тока

без приложения предимпульса, I_{700} – амплитуда тока при предимпульсе длительностью 700 мс. Для исследования кинетики обратимости ингибирования натриевых токов токсином определяли длительность предимпульса, необходимого для восстановления 60% натриевого тока.

Проводимость каналов определяли по закону Ома (см. выше). При построении активационных и инактивационных кривых данные анализировали по уравнению Больцмана (см. выше). Кривые доза-ответ получали по уравнению Хилла, по ним определяли значение EC_{50} : $y=100/\{1+(EC_{50}/[токсин]^h)\}$, где y – амплитуда эффекта, вызванного приложением токсина, EC_{50} – концентрацию токсина, при которой эффект равен половине максимального значения, $[токсин]$ – концентрация токсина, h – коэффициент Хилла.

Тестирование способности полученных токсинов блокировать ω -токи проводилось в Университетском колледже Лондона на ооцитах *X. laevis*, которые экспрессируют ген *SCN4A* с мутациями, характерными для гипокалиемического периодического паралича. В качестве раствора, омывающего клетки, использовали 60 mM NaMeS, 60 mM сульфата гуанидина, 1,8 mM CaSO₄ и 10 mM HEPES (pH 7,4). Потенциал покоя поддерживали на уровне –100 мВ. Для записи ω -токов в омывающий раствор добавляли 1 мкМ ТТХ для блокирования натриевого тока через ПД (так называемого α -тока), после чего прикладывали 10 мкМ токсина. Ток через мембрану регистрировали в течение 100 мс через 200 мс после установления определенного потенциала на мембране в диапазоне от –140 мВ до +50 мВ с шагом в 5 мВ. Токи утечки, линейно зависящие от напряжения, рассчитывали, достраивая линейную зависимость тока от напряжения в области от +10 до +30 мВ на всю область значений напряжения. Из экспериментальных данных вычитали полученное значение. Результирующее значение натриевого тока нормализовали к значению амплитуды тока при напряжении –100 В без добавления токсина.

Для сравнения средних величин использовали парный критерий Стьюдента ($p < 0,05$). Для каждого измерения проводилось не менее четырех независимых экспериментов. Все данные представлены в виде среднее значение \pm стандартное отклонение.

Для обработки данных экспериментов использовали программное обеспечение Clampex 10.4, ClampFit 10.4 и OriginPro 8.0.

Построение моделей пространственной структуры токсинов

Построение моделей пространственной структуры токсинов проводили в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН. Использовали следующий подход:

1) Из базы данных Uniprot были получены аминокислотные последовательностей моделируемых белков.

2) Был произведен поиск шаблона (известной структуры токсина с последовательностью, гомологичной исследуемой) в базах данных белковых структур. Парные и множественные выравнивания проводили в автоматическом режиме на веб-сервере ClustalW [329]. Моделирование по гомологии проводили с помощью программы MODELLER [330], используя опцию SPECIAL_PATCHES для корректного построения консервативных дисульфидных мостов.

3) На основании гомологии с уже известными структурами с помощью программы MODELLER [330] были построены модели пространственных структур токсинов. Для каждого токсина было получено по 20 моделей, из которых для дальнейшего изучения была выбрана «лучшая» на основании анализа значений функции потенциальной энергии MODELLER.

Расчеты молекулярной динамики для α -токсинов скорпионов

Расчеты молекулярной динамики (МД) проводили в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН. Для выявления структурно-динамических и физико-химических различий α -токсинов было проведено моделирование МД набора α -токсинов. Группа α -токсинов была представлена 8 α -млекотоксинами, 6 инсектотоксинами и 13 α -подобными токсинами. Структуры этих токсинов были либо получены экспериментально и взяты с сайта Protein Data Bank [331] (www.rcsb.org), либо смоделированы на основе близкородственных токсинов с известной структурой с помощью метода моделирования по гомологии (см. выше).

Доступное токсинам конформационное пространство исследовали с помощью расчетов МД в программе Gromacs [332]. При этом для всех исследованных токсинов использовался стандартный протокол расчетов. В моделях амидировали С-конец, если соответствующие указания были найдены в литературе или в базе Uniprot. Расчет МД проводился в явно заданном растворителе с необходимым для сохранения электронейтральности числом противоионов, компенсирующих электрический заряд молекулы токсина. После этапа минимизации потенциальной энергии система в течение 100 пс нагревалась до температуры 300 К, и расчет продолжался в течение 60 нс. Использовали силовое поле Gromos 96 (45a3) и SPC-модель (single point charge model) для молекул растворителя. Расчет проводили с шагом интегрирования 2 фс и периодическими граничными условиями. Температура (300 К) и давление (1 бар) поддерживались постоянными при помощи

алгоритмов термостатирования V-rescale и баростатирования Берендсена, соответственно. Ван-дер-ваальсовы и электростатические взаимодействия учитывались до радиусов «отсечки» 10 /12 Å.

Для выявления высокоамплитудных скоррелированных внутренних движений в молекулах токсинов проводили ковариантный анализ траектории МД на интервале 20–60 нс, считая, что в течение первых 20 нс молекула претерпевает период релаксации. Для этого использовали утилиты Gromacs: `g_covar`, которая рассчитывает и диагонализует ковариантную матрицу и получает набор собственных значений и собственных векторов; и `g_anaeig`, которая анализирует собственные вектора и фильтрует траекторию по выбранным собственным векторам. Каждому а.о. в токсине длиной N а.о. приписывали вектор, описывающий движение C^α атома этого остатка по самой низкочастотной моде. Имея вектор движения для каждого остатка, строили попарную матрицу скалярных произведений этих векторов ($A1 \times A2 \times \cos \alpha$), где A1, A2 – амплитуды движения, а α – угол между двумя векторами. В результате получали матрицу размером N×N, на диагонали которой расположены элементы со значением, равным квадрату амплитуды. Недиагональные элементы полученной матрицы соответствуют всем возможным парам разных остатков. Эту матрицу отображали в виде карты, где синие области соответствуют сонаправленным движениям, красные – направленным в противоположные стороны. Белые области означают, что остатки движутся ортогонально или амплитуды их движения малы.

Для нахождения характерных высокоамплитудных движений, присущих всем токсинам определенной группы, строили усредненные карты групп, учитывая выравнивание последовательностей токсинов (для корректного сопоставления структурных элементов разных молекул). В результате, получали карты размером 69×69 а.о. (69 – длина выравнивания), показывающие характерные для данной группы высокоамплитудные скоррелированные движения.

Расчеты молекулярного гидрофобного потенциала

Расчеты молекулярного гидрофобного потенциала (МГП) проводили в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН. Гидрофобные характеристики молекул токсинов рассчитывались на основании МГП [333]. Этот алгоритм позволяет рассчитывать пространственное распределение гидрофобных и гидрофильных характеристик как суперпозицию затухающих с расстоянием вкладов от отдельных атомов, которым приписываются теоретически рассчитанные атомные константы гидрофобности [334]. Расчеты были выполнены с использованием программы PLATINUM [335].

Сравнение гидрофобных свойств α -токсинов различных групп проводили, отдельно рассматривая сердцевинный и модуль специфичности. Сравнивали средние динамические значения МГП на поверхности этих модулей (для каждого шага МД в анализе вычислялось среднее значение МГП в точках поверхности соответствующего модуля, и предметом изучения были динамические распределения этих средних значений). Различия между двумя группами токсинов считались значимыми, если статистическая значимость различий распределений подтверждалась с помощью критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

Картирование гидрофобных свойств поверхности молекул α -токсинов

Картирование гидрофобных свойств поверхности молекул α -токсинов проводили в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН. Для наглядного представления свойств поверхности токсинов использовали метод картирования гидрофобных свойств в сферической проекции. Этот метод позволяет перейти от трехмерного объекта сложной формы (молекулярной поверхности) к более удобной для анализа двумерной карте, а также создавать карты, усредненные по каждой группе α -токсинов, сравнивать эти карты между собой и производить другие математические операции (вычитание, сложение и т.д.).

Для получения карт сначала рассчитывали молекулярную поверхность каждого α -токсина по методу Коннолли, и в каждой точке поверхности вычисляли МГП, создаваемый атомами токсина. Далее эти значения проецировали на сферу, описанную вокруг молекулы токсина. За центр сферы и начало координат был взят геометрический центр поверхности. Проекцию точки поверхности с декартовыми координатами (x , y , z) можно представить в виде долготы ($\arcsin(z/r)$) и широты ($\arctan(y/x)$), где r – радиус-вектор этой точки. Затем проводили интерполяцию значений МГП на координатную сетку: по долготе $[-180^\circ; +180^\circ]$ и по широте $[-90^\circ; +90^\circ]$ с шагом 1° . Полученный «глобус» отображали на плоскость с помощью распространенной в астрономии и картографии проекции Мольвейде. Эта картографическая проекция сохраняет соотношение площадей, однако довольно сильно искажает изображение на полюсах.

Оценка гидрофобных характеристик внеклеточных петель Na_v

Оценку гидрофобных характеристик внеклеточных петель Na_v проводили в лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН. Гидрофобные свойства внеклеточных петель Na_v , с которыми потенциально могут взаимодействовать молекулы токсинов, были рассчитаны на основе аминокислотных последовательностей нескольких Na_v насекомых и млекопитающих. При

этом гидрофобные свойства приписывались каждому а.о. на основании тех же атомных констант гидрофобности [334], что и в методе МГП.

Для сравнения использовались последовательности одного N_{av} насекомых (Para) из семи видов (семь последовательностей) и семи N_{av} млекопитающих ($N_{av}1.1-1.7$) человека, крысы и мыши (21 последовательность). Сравнивали среднюю гидрофобность петель S1–S2, S3–S4, S5–P и P–S6, идентифицированных с помощью выравнивания аминокислотных последовательностей для каждого канала. Различие насекомые–млекопитающие считали значимым, если два распределения статистически достоверно различались с применением критерия Стьюдента ($p < 0.05$).

Связывание с липидными везикулами

Эксперименты по связыванию Nm-3 с липидными везикулами проводили в группе структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН. Для приготовления маленьких моноламелярных везикул сухие навески POPC или смеси POPC с DOPG в соотношении 3:1 суспендировали в 10 мМ Tris-Ас буфере (рН 7,0) с или без добавления соли (100 мМ NaCl). Полученные суспензии подвергали обработке ультразвуком на льду в течение 10 с 5 раз с паузами (20 с) для охлаждения. Конечные концентрации липидов измеряли с помощью одномерной 1H ЯМР-спектроскопии путем растворения небольших фракций препарата моноламелярных везикул в смеси $CDCl_3/CD_3OD/D_2O$ (15:10:3). Титрование образца Nm-3 (20 мкМ; 5% D_2O ; тот же буфер) с помощью моноламелярных везикул проводили при 35°C. При каждой концентрации липидов измеряли одномерный 1H ЯМР-спектр и определяли равновесную концентрацию свободного пептида в растворе (C_f). Полученные кривые связывания аппроксимировали либо уравнением равновесного распределения (Ур. 1), либо с помощью изотермы Ленгмюра (Ур. 2), учитывая разведение исходных образцов при титровании:

$$\frac{C_b}{L^*} = K_p \times C_f \quad \text{Ур. 1}$$

$$\frac{1}{K_N} = \frac{C_f \cdot (L^* - N \cdot C_b)}{N \cdot C_b} \quad \text{Ур. 2}$$

где C_b – концентрация связанного пептида ($C_0 = C_b + C_f$), K_p – коэффициент распределения, K_N – константа образования комплекса пептид–сайт связывания, образованный N молекулами липидов, и L^* – концентрация липидов во внешнем монослое везикул (60% от общего количества липидов; $L^* = 0,6 \times L$).

Глава 3. Результаты исследования и их обсуждение

Na_v играют важную роль в организме человека, а их дисфункция часто приводит к различным патологиям. В связи с этим представляется важным понимание тонкостей работы этих мембранных белков, а также нюансов их взаимодействия с различными молекулами. В рамках данной работы мы сосредоточили свое внимание на изучении молекулярных основ взаимодействия с каналами лигандов, связывающихся с рецепторными сайтами 3 и 4.

Напомним, что молекулы, взаимодействующие с рецепторным сайтом 3, ингибируют или замедляют инактивацию. В качестве представителей лигандов этого сайта была выбрана группа α -токсинов скорпионов. Несмотря на то, что мировое научное сообщество собрало немало информации об этих полипептидах, основы их селективности в отношении разных таксономических групп не до конца ясны. Поэтому в рамках данной работы мы предприняли попытку выявить физико-химические особенности представителей различных групп α -токсинов скорпионов и использовать эти знания для дизайна полипептидов с заданным профилем селективности.

Лиганды, взаимодействующие с рецепторным сайтом 4, обладают различным характером воздействия на Na_v : они могут облегчать/подавлять активацию и ингибировать инактивацию. Тут наше внимание привлекла группа токсинов пауков, способных ингибировать активацию, а именно токсин Nm-3, выделенный ранее из яда паука *Heriades melloteei* [285, 336]. Нам показалось любопытным, что *H. melloteei* принадлежит к инфраотряду аранеоморфных пауков, в то время как другие ингибиторы активации Na_v были выделены из ядов мигаломорфных пауков, а именно из ядов настоящих пауков-птицеедов (семейство Theraphosidae). В свете этого было решено охарактеризовать токсин Nm-3 и особенности его взаимодействия с Na_v , а также определить общие структурные особенности ингибиторов активации Na_v , определяющие их эффект на канал.

Наконец, некоторые каналопатии, в частности, гипокалиемический периодический паралич, обусловлены мутациями в сенсорах потенциала псевдосубъединиц I–III, приводящими к пропуску ПЧД так называемых ω -токов. Так как сайт связывания ингибиторов активации Na_v как раз и находится в ПЧД, причем S4 участвует в образовании рецепторного сайта 4, мы выдвинули гипотезу о способности ингибиторов активации Na_v подавлять ω -токи, что затем было проверено в рамках данной работы.

Изучение структурно-функциональных особенностей α -токсинов скорпионов

Анализ молекулярных поверхностей α -токсинов скорпионов для выявления основ их таксономической селективности

Модульное строение α -токсинов скорпионов

В ходе ранее проведенных работ другими научно-исследовательскими коллективами было показано, что в структуре α -токсинов скорпионов можно выделить два домена, сердцевину и RC-домен, ответственные за их связывание с Na_v и селективность (см. Обзор литературы, раздел « α -Токсины скорпионов») [225, 226, 232]. В то время как первый является консервативным для α -токсинов и отвечает за распознавание Na_v в целом, второй – достаточно вариабелен и играет роль в их таксономическую селективности. Было замечено, что в сравнении с RC-доменами α -млекотоксинов, RC-домены полипептидов, активных в отношении насекомых, имеют более выпуклую топологию [189, 226]. Кроме того, в некоторых работах отмечается, что гидрофильность RC-домена также может влиять на селективность α -токсинов скорпионов [239]. Многочисленные работы посвящены роли определенных а.о. в избирательности действия α -токсинов скорпионов, в то время как мы поставили перед собой задачу выявить физико-химические свойства поверхностей этих молекул, определяющие их профиль селективности. Для этого мы сначала составили базу данных последовательностей α -токсинов скорпионов с известным профилем селективности. Затем анализировали подвижность и гидрофильность поверхности α -токсинов скорпионов, а также корреляцию между этими свойствами и таксономической селективностью этих полипептидов. Наконец, полученные закономерности мы подвергли экспериментальной проверке.

Создание базы данных последовательностей α -токсинов скорпионов

Для выявления физико-химических свойств α -токсинов скорпионов, ответственных за селективность их действия в отношении млекопитающих и насекомых, мы составили базу данных последовательностей α -токсинов скорпионов с известным профилем специфичности. Анализ литературных данных позволил выявить 27 таких полипептидов (Рисунок 13): 8 млекотоксинов, 6 инсектотоксинов и 13 α -подобных токсинов. Для 14 полипептидов, пространственная структура которых была неизвестна, в сотрудничестве с лабораторией моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН были построены молекулярные модели по гомологии с изученными токсинами (Таблица 12).

Таблица 12. Свойства α -токсинов скорпионов, рассчитанные в данной работе. * обозначает амидированный С-конец (согласно аннотации Uniprot). % – эти параметры были рассчитаны на основании участка траектории молекулярной динамики 20–60 нс. Приведенные значения соответствуют среднему значению \pm стандартное отклонение. ^ – усредненный молекулярный гидрофобный потенциал (МГП) на поверхности модуля специфичности (МС) и сердцевинного модуля (СМ) токсина. & – усредненное среднеквадратичное отклонение (СКО) участка молекулы, рассчитанное по траектории, «отфильтрованной» с использованием первой моды из ковариантного анализа для остатков RT-петли (СКО_{RT}) и сердцевинного модуля (СКО_{СМ}). Aah2 chimera – производное токсина Aah2 (обозначен в таблице «Aah2 wt»), в которое пересадили RC-домен Lqh α IT [226].

Токсин	PDB ID или (Uniprot ID / шаблон для моделирования)	Рассчитанные параметры %			
		МГП _{МС} [^]	МГП _{СМ} [^]	СКО _{RT} (нм) ^{&}	СКО _{СМ} (нм) ^{&}
α-Млекотоксины					
Aah1	(P01479 / IPTX)	-0,027 \pm 0,286	0,025 \pm 0,420	0,19 \pm 0,04	0,07 \pm 0,07
Aah2 wt*	1PTX	-0,087 \pm 0,309	-0,023 \pm 0,277	0,08 \pm 0,04	0,04 \pm 0,03
Aah3	(P01480 / IPTX)	-0,017 \pm 0,268	0,033 \pm 0,300	0,18 \pm 0,11	0,11 \pm 0,07
BmK M8	1SNB	-0,269 \pm 0,266	-0,019 \pm 0,313	0,17 \pm 0,07	0,15 \pm 0,10
BmK α Tx11	2KBH	-0,211 \pm 0,281	-0,043 \pm 0,315	0,19 \pm 0,06	0,12 \pm 0,08
Bot3*	(P01485 / IPTX)	-0,144 \pm 0,288	0,023 \pm 0,312	0,13 \pm 0,08	0,09 \pm 0,08
Lqh2*	(P59355 / IPTX)	-0,126 \pm 0,298	0,017 \pm 0,302	0,13 \pm 0,03	0,08 \pm 0,05
Lqq5*	(P01481 / IPTX)	-0,162 \pm 0,184	-0,005 \pm 0,299	0,07 \pm 0,01	0,09 \pm 0,06
Инсектотоксины					
Aah2 chimera	1SEG	0,037 \pm 0,265	0,039 \pm 0,283	0,10 \pm 0,06	0,07 \pm 0,05
Bj α IT*	(Q56TT9 / ISN1)	0,103 \pm 0,304	-0,010 \pm 0,309	0,07 \pm 0,03	0,09 \pm 0,04
BmK α IT1	1OMY	0,039 \pm 0,239	0,036 \pm 0,317	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,02
BotIT1	(P55902 / ILQQ)	0,018 \pm 0,256	0,052 \pm 0,312	0,09 \pm 0,02	0,08 \pm 0,04
Lqh α IT	1LQH	-0,013 \pm 0,210	0,105 \pm 0,311	0,13 \pm 0,06	0,11 \pm 0,07
Lqq3	1LQQ	-0,009 \pm 0,243	0,068 \pm 0,327	0,05 \pm 0,03	0,05 \pm 0,06
α-Подобные токсины					
BmK M1	1SN1	0,085 \pm 0,253	0,043 \pm 0,281	0,12 \pm 0,03	0,09 \pm 0,07
BmK M2	1CHZ	-0,006 \pm 0,257	0,090 \pm 0,335	0,07 \pm 0,02	0,06 \pm 0,04
BmK M4	1SN4	-0,073 \pm 0,184	-0,001 \pm 0,332	0,06 \pm 0,01	0,07 \pm 0,04
BmK M7	1KV0	0,089 \pm 0,219	0,056 \pm 0,366	0,05 \pm 0,01	0,08 \pm 0,07
BmK M10	2KBK	-0,059 \pm 0,226	0,032 \pm 0,299	0,07 \pm 0,02	0,08 \pm 0,06
Bom3	(P13488 / IFH3)	0,029 \pm 0,303	-0,015 \pm 0,340	0,11 \pm 0,04	0,11 \pm 0,09
Bom4	(P59354 / ISN1)	0,013 \pm 0,189	-0,010 \pm 0,325	0,10 \pm 0,08	0,06 \pm 0,07
Bot1*	(P01488 / ISN1)	0,018 \pm 0,274	0,003 \pm 0,340	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,04
Bot2*	(P01483 / ISN1)	0,001 \pm 0,196	0,037 \pm 0,336	0,03 \pm 0,01	0,05 \pm 0,04
Lqh3*	1BMR	-0,078 \pm 0,224	0,003 \pm 0,322	0,13 \pm 0,04	0,10 \pm 0,07
Lqh4*	(P83644 / ILQQ)	0,019 \pm 0,299	-0,013 \pm 0,261	0,06 \pm 0,02	0,06 \pm 0,04
Lqh6*	(P59356 / IFH3)	-0,025 \pm 0,251	0,012 \pm 0,297	0,19 \pm 0,09	0,08 \pm 0,06
OD1*	(P84646 / ISN1)	-0,025 \pm 0,295	0,044 \pm 0,317	0,09 \pm 0,05	0,03 \pm 0,02

Различная подвижность модуля специфичности у разных групп α -токсинов скорпионов

В сотрудничестве с лабораторией моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН 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. Этот анализ позволил выявить в структуре токсинов три области, движущиеся относительно независимо друг от друга (Рисунок 14), а именно: 1) петлю, содержащую остатки 8–12 (RT-петлю; далее везде нумерация по аминокислотной последовательности Aah2), и C-концевую область (остатки 56–64); 2) β_2 – β_3 петлю (остатки 39–43); и 3) остальную часть молекулы (ее «сердцевину»).

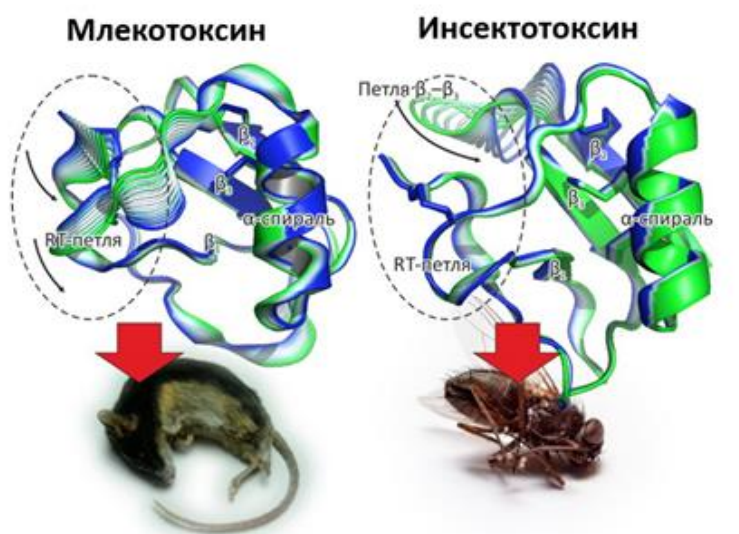


Рисунок 14. Различная подвижность модулей специфичности (обозначены пунктирными овалами) млеко- и инсектотоксинов. Показаны изменения конформации молекул токсинов вдоль первой (самой низкочастотной) моды, полученной из ковариантного анализа траекторий МД для типичных млекотоксина (Aah2) и инсектотоксина (Lqg III). Изображены две «экстремальные» структуры, характерные для данной моды и показанные зеленым и синим, и несколько промежуточных сгенерированных структур.

На основе анализа их подвижности мы смогли заключить, что структура α -токсинов скорпионов состоит из двух динамических модулей: «модуля специфичности» и «сердцевинного модуля». Стоит отметить, что выделенные нами модули отличаются от рассматриваемых другими научными коллективами RC-домена и сердцевины: наши результаты показывают, что β_2 – β_3 петля входит в состав модуля специфичности, а не сердцевинного модуля.

Групповой анализ конформационной подвижности позволил выявить характерные свойства различных групп α -токсинов скорпионов. Для всех полипептидов построили карты корреляции высокоамплитудных движений каждой пары остатков в одной молекуле. Затем индивидуальные

карты усреднили по группам с различной таксономической селективностью и получили карты внутримолекулярных движений, характерных для разных групп (Рисунок 15А). Анализ полученных карт позволил определить участки токсинов, обладающие наибольшей подвижностью (диагональные элементы), а также выявить пары остатков, которые движутся сонаправленно (синие недиагональные элементы) или в противоположных направлениях (красные недиагональные элементы). В результате мы обнаружили, что α -млекотоксины имеют наиболее конформационно лабильные модули специфичности, в частности, их RT-петля имеет самую высокую амплитуду движения по сравнению с другими группами α -токсинов (Рисунок 15Б). Кроме того, для α -млекотоксинов характерно согласованное движения RT-петли и С-конца, что на картах выражается в виде голубого пятна, отмеченного маленьким черным прямоугольником. При этом присущим всем α -токсинам скорпионов оказалось движение петли $\beta 2$ – $\beta 3$ и С-конца в противофазе (красная область около пары остатков 42–60).

Сравнение аминокислотных последовательностей α -токсинов скорпионов позволило выявить а.о., которые возможно определяют высокую подвижность RT-петли α -млекотоксинов: в 4 и 17 позиции (по нумерации Aah2; то есть по обе стороны от RT-петли) у α -млекотоксинов, как правило, расположены остатки глицина, играющие, по-видимому, роль «шарниров», в то время как у инсекто- и α -подобных токсинов в аналогичных позициях находятся более объемные остатки аланина, валина или фенилаланина. Для проверки этой гипотезы в сотрудничестве с лабораторией моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН на компьютере были произведены точечные замены G17A и G17F в классическом α -млекотоксине Bot3, а также F17G и A17G в классических инсектотоксинах Lqh3 и VmK α IT1 соответственно. МД показала, что такие мутации привели к изменению подвижности RT-петли Bot3 с заменой G17F (СКО=0,09±0,02 нм против 0,13±0,03 нм для модифицированной и исходной молекулы) и VmK α IT1 с заменой A17G (СКО=0,11±0,03 нм против 0,04±0,01 нм), чего не наблюдалось для Lqq3 с заменой F17G и Bot3 с заменой G17A. Поэтому для Lqq3 была произведена двойная замена A4G/F17G, которая смогла повысить подвижность RT-петли (СКО=0,10±0,03 нм против 0,05±0,03 нм). Судя по всему, объем бокового радикала 17-го а.о. влияет на подвижность всей RT-петли, что существенно для активности токсина в отношении определенных типов Na_v .

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

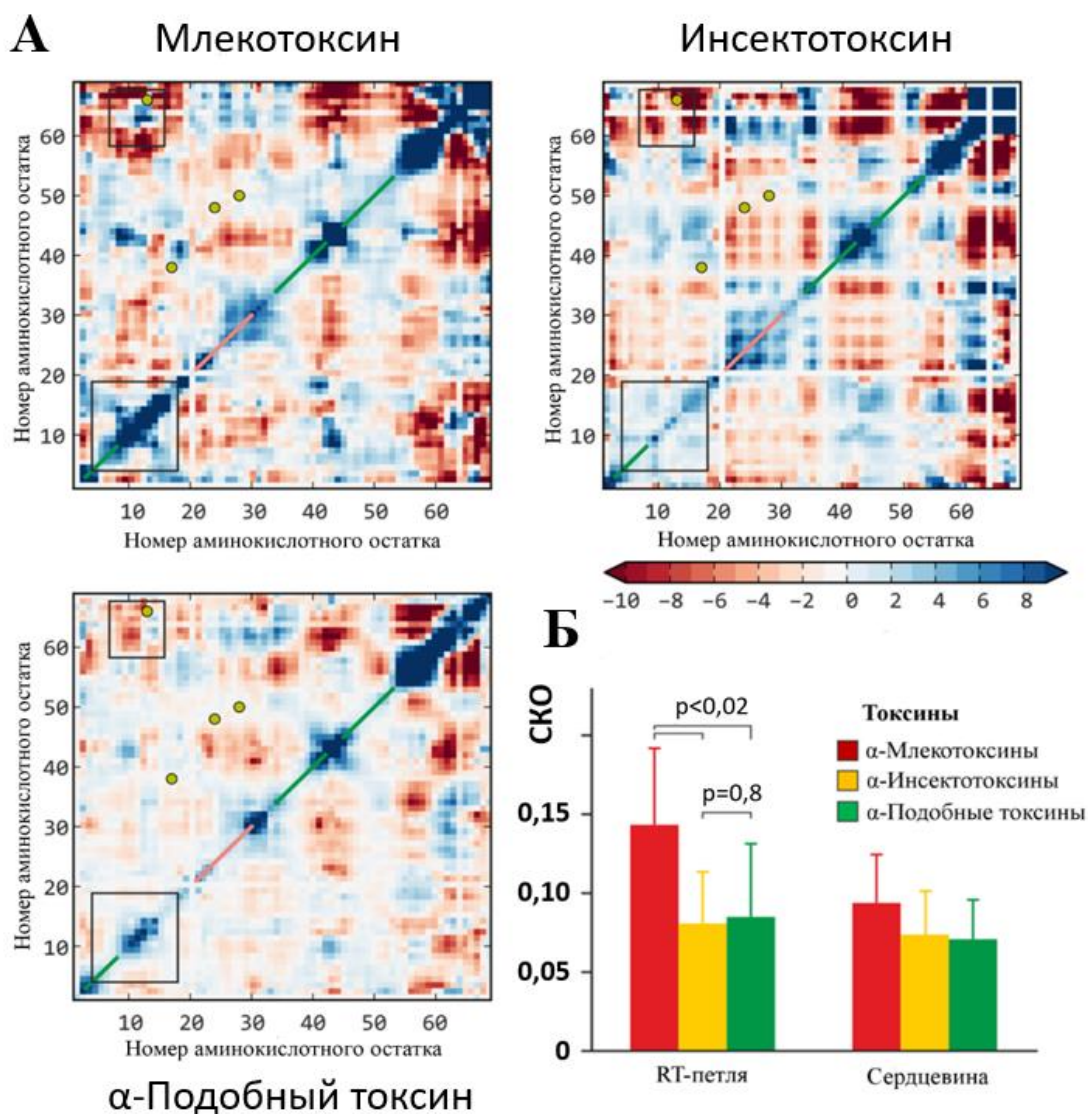
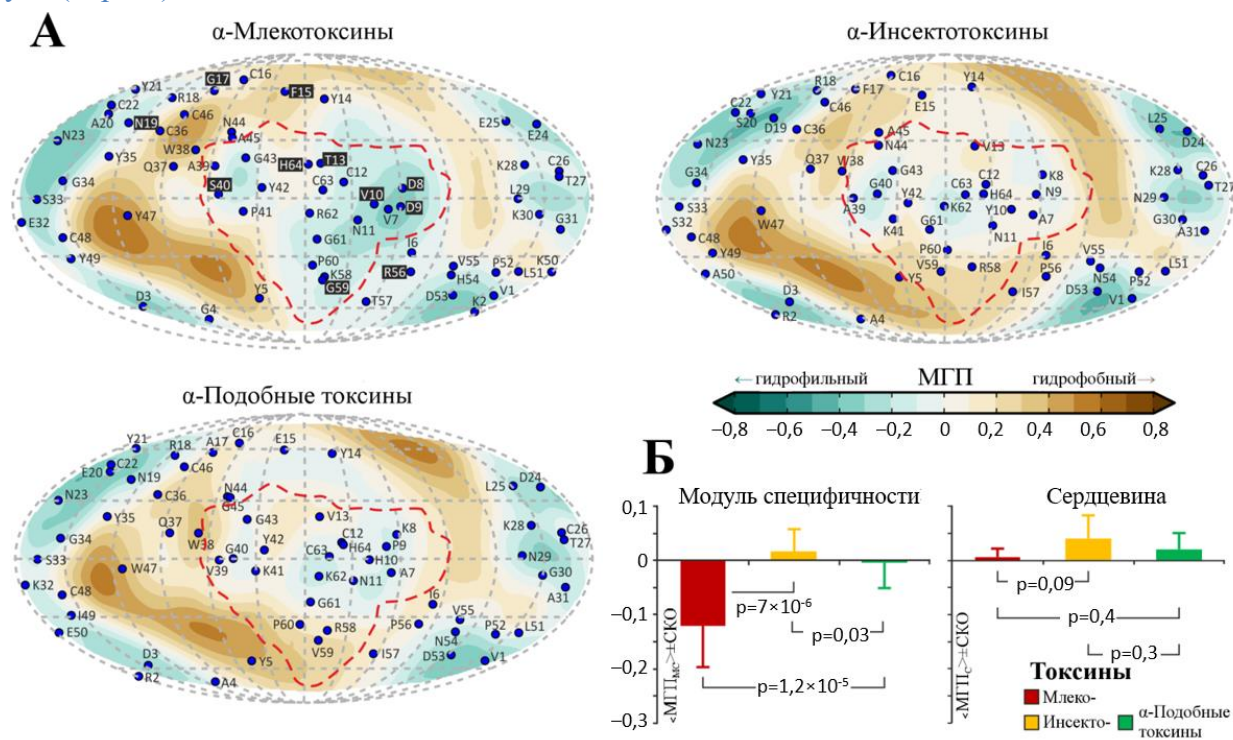


Рисунок 15. Анализ характерных внутренних движений α -токсинов. А. Карты высокоамплитудных скоррелированных внутренних движений, характерных для каждой из групп токсинов. Дисульфидные мостики изображены желтыми кругами; α -спираль и β -тяги показаны диагональными розовой и зелеными линиями, соответственно. Внутри черных квадратов находятся области максимального различия между группами. Шкала соответствует скалярному произведению векторов каждого остатка из пары, описывающих движение в первой моде. Б. Значения среднеквадратичного отклонения (СКО) для остатков RT-петли и сердцевинного модуля.

Связь гидрофильности модуля специфичности с селективностью α -токсинов скорпионов

На следующем этапе работы в сотрудничестве с лабораторией моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН для α -токсинов скорпионов из составленной ранее базы (Рисунок 13) был вычислен суммарный МГП их поверхности на основе МГП отдельных а.о. [319]. Оказалось, что млекотоксины в целом более гидрофильны, чем токсины, активные в отношении насекомых (Таблица 10). Далее были построены сферические проекции поверхности молекул токсинов с распределением на них гидрофобных свойств, которые затем проектировали на плоскость и получали карты гидрофобности α -токсинов скорпионов (использовали так называемый метод белковой топографии). Групповой анализ полученных карт (Рисунок 16А) показал, что в целом для

Рисунок 16. А. Карты гидрофобности α -токсинов скорпионов. Проекции модулей селективности обведены красным контуром. На карты млеко-, инсекто- и α -подобных токсинов нанесены проекции S^{α} -атомов остатков токсинов Aah2, Lqq3 и VmK M1, соответственно. На карте для млекотоксинов черным фоном отмечены а.о., консервативные для токсинов этой группы, но отличные от а.о. токсинов других групп (Рисунок 13). Б. Сравнение среднединамического МГП для трех групп токсинов. Показаны значения $\langle \text{МГП}_{\text{MC}} \rangle \pm \text{СКО}$ для модуля специфичности (МС) и сердцевинного модуля (справа).



поверхностей α -токсинов скорпионов характерно чередование гидрофильных и гидрофобных участков. Тем не менее, в области, соответствующей модулю специфичности (показана на рисунке красным пунктиром), карты трех групп существенно отличаются: у α -млекотоксинов в этой области находится гидрофильное «озеро». Более того, оказалось, что эта область практически совпадает с

RC-модулем (остатки 8–12, 58–64). Для проверки значимости этого наблюдения было рассчитано распределение среднединамического МГП для модуля специфичности и сердцевинного модуля (Рисунок 15Б). Было показано, что МГП сердцевинного модуля, в отличие от МГП модуля специфичности, примерно одинаков у разных групп α -токсинов скорпионов: модуль специфичности оказался существенно более гидрофильным у α -млекотоксинов, чем у инсектотоксинов и α -подобных токсинов ($p < 10^{-4}$) (Рисунок 15Б). При этом для α -подобных токсинов и инсектотоксинов существенной разницы МГП модулей специфичности не наблюдается. Из этих данных можно заключить, что гидрофильность модуля специфичности α -млекотоксинов играет важную роль в их специфичности в отношении Na_v млекопитающих.

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

Использование анализа гидрофильности поверхности для предсказания селективности α -токсинов скорпионов

Для проверки возможности использования анализа конформационной подвижности и гидрофильности поверхности для предсказания таксономической селективности α -токсинов скорпионов мы выбрали 3 токсина, которые не вошли в набор, проанализированный в ходе предыдущих этапов. Это токсины ВеМ9, MeuNaTx α -1 и -2 из яда *M. eurus*. В то время как последние два токсина были охарактеризованы командой китайских ученых под руководством Чжу [205] уже после начала нашей работы (и поэтому не были включены в набор), ВеМ9 был выделен почти 30 лет назад в ИБХ РАН под руководством Е.В. Гришина и является первым α -токсином скорпионов, для которого методом ЯМР была установлена пространственная структура [337]. Несмотря на это, ВеМ9 оказался слабо охарактеризован биохимически, а его селективность в отношении Na_v млекопитающих и насекомых изучена не была.

Для предсказания активности токсинов из *M. eurus* мы проанализировали динамические и гидрофобные свойства этих молекул (Рисунок 17А,Б). В результате мы отнесли ВеМ9, MeuNaTx α -1 и -2 к инсектотоксинам или α -подобным токсинам (МГП = $0,051 \pm 0,018$, $-0,069 \pm 0,022$ и $-0,033 \pm 0,039$ соответственно, в то время как для α -млекотоксинов характерен МГП $< -0,1$). Кроме того, ВеМ9 имеет динамические особенности, характерные для токсинов, активных в отношении насекомых: относительно жесткую RT-петлю и довольно гибкую β_2 - β_3 петлю. Примечательно, что для

MeuNaTx α -1 наше предсказание разнится с предсказанием на основе филогенетического дерева (Рисунок 17В), которое относит этот токсин в группу α -млекопитающих.

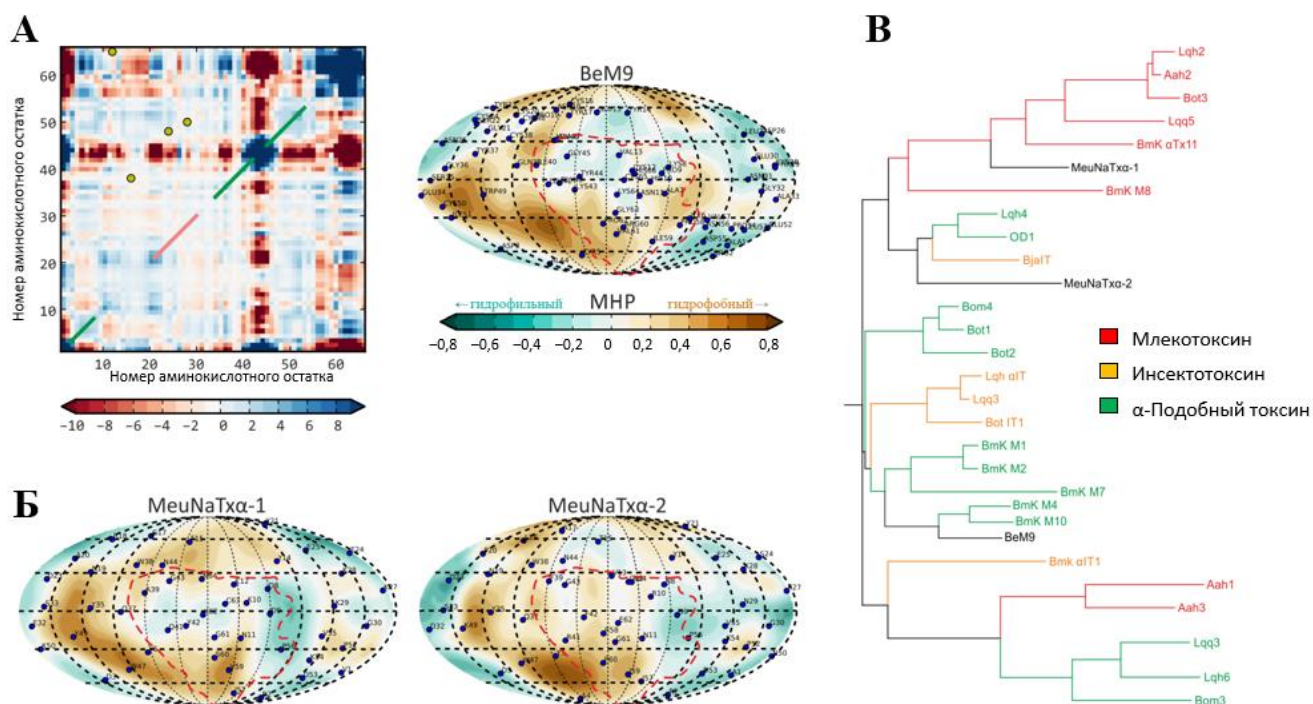


Рисунок 17. Предсказание активности ВеМ9, MeuNaTx α -1 и -2. А. Анализ внутренних движений и гидрофобности поверхности ВеМ9. Б. Карты гидрофобности MeuNaTx α -1 и -2. В. Филогенетическое дерево α -токсинов, построенное с помощью ClustalW.

Оба токсина MeuNaTx α -1 и -2, охарактеризованные командой Чжу [205], в концентрации 1–2 мкМ активны в отношении каналов как млекопитающих, так и насекомых, что относит их в группу α -подобных токсинов и согласуется с нашим предположением.

Чтобы охарактеризовать ВеМ9, этот токсин был сначала получен в бактериальной системе экспрессии (более подробно в следующем разделе). Активность ВеМ9 затем тестировали на ооцитах *X. laevis* методом двухэлектродной фиксации потенциала (Рисунок 18). Было показано, что в концентрации 1 мкМ токсин ингибирует инактивацию трех изоформ Na_v млекопитающих, а также потенциал-чувствительного натриевого канала плодовой мушки DmNa_v1. Эти данные позволяют также отнести ВеМ9 к α -подобным токсинам, что согласуется с нашим предсказанием.

Таким образом, анализ гидрофобных свойств и подвижности модуля специфичности α -токсинов скорпионов можно использовать для предсказания таксономической селективности этих молекул.

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

Далее нас заинтересовала возможность использования различия свойств модулей специфичности разных групп α -токсинов скорпионов не просто для предсказания, а для создания полипептидов с заданным профилем селективности. Для этого мы сначала выбрали подходящую для мутагенеза молекулу и затем использовали ряд подходов для изменения ее селективности: мы изменяли гидрофильность и/или подвижность модуля специфичности, частично или полностью пересаживали модули специфичности из других токсинов, а также вносили точечные аминокислотные замены, которые согласно литературным данным могли повлиять на избирательность действия токсина. Затем все полученные мутантные молекулы тестировали на 4 изоформах Na_v млекопитающих и канале насекомых.

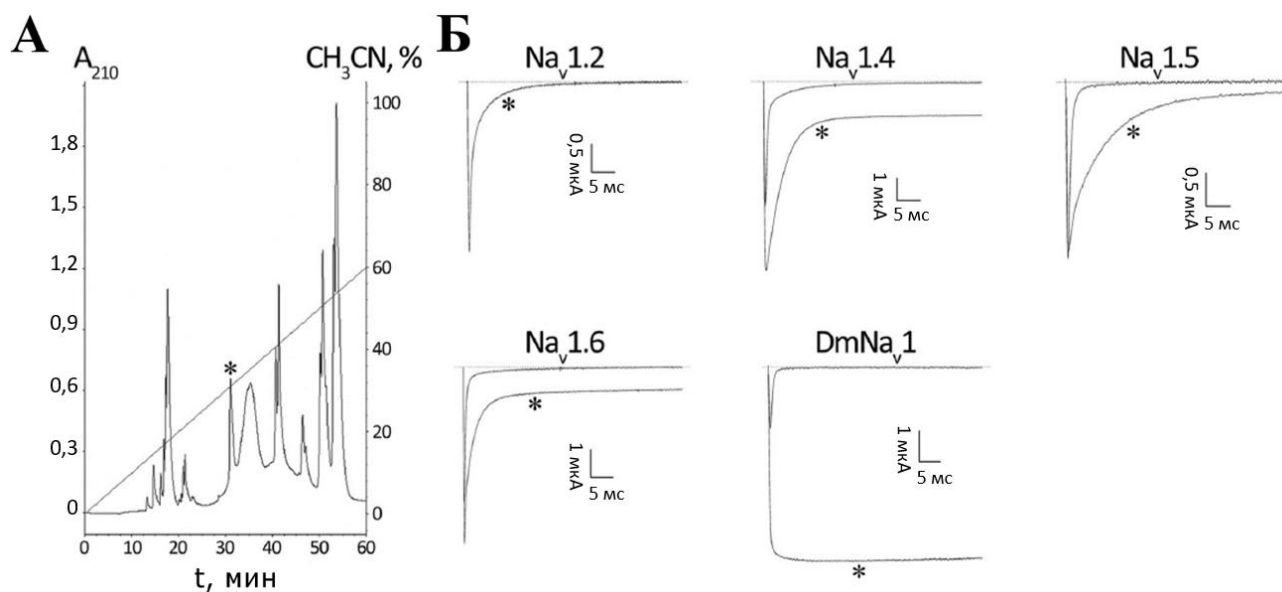


Рисунок 18. Получение и активность ВеМ9. А. Профиль хроматографического разделения продуктов гидролиза Trx-ВеМ9 с использованием бромциана. Звездочкой отмечена фракция, содержащая ВеМ9. Б. Воздействие ВеМ9 на различные изоформы Na_v . Кривые отображают токи через соответствующие каналы в контроле и при аппликации 1 мкМ токсина (показаны звездочками).

Выбор объекта мутагенеза

В качестве объекта мутагенеза было решено использовать α -подобный токсин: нам показалось удобным создание таксономически селективного лиганда Na_v на основе токсина с широким профилем активности. Из множества α -подобных токсинов мы выбрали ВеМ9, поскольку приоритет структурного и биохимического исследования этого полипептида закреплен за ИБХ РАН.

Дизайн производных ВеМ9 с заданными свойствами

Для изменения специфичности ВеМ9 были сконструированы 13 его производных (Таблица 13). Рассмотрим, какие изменения были внесены в аминокислотную последовательность ВеМ9 и почему.

Напомним, что модуль специфичности α -млекотоксинов более подвижен и гидрофилен, чем у α -токсинов скорпионов, активных в отношении насекомых. Поэтому для увеличения подвижности RT-петли в производное М9.1 в положения 4 и 17 мы ввели два «шарнирных» остатка глицина, соответствующие G4 и G17 у Aah2. В свою очередь, в производном М9.2 три гидрофобных остатка из модуля специфичности (β_2 - β_3 -петли и С-конца) мы заменили на более гидрофильные остатки Q, что должно привести к увеличению гидрофильности модуля специфичности. Наконец, полипептид М9.3 получен суммированием замен М9.1 и М9.2: он имеет более подвижный и более гидрофильный по сравнению с ВеМ9 модуль специфичности. Таким образом, активность всех трех производных ВеМ9 должна сдвинуться в сторону млекотоксинов.

Таблица 13. 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 K8E. Модуль специфичности выделен серыми прямоугольниками.

	1	10	20	30	40	50	60												
ВеМ9	ARDA	YIAKPHNCVYEC	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	LGKYGNACWCIQLPDNV	PIRIPGKCH													
М9.1	ARD	G	YIAKPHNCVYEC	G	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	LGKYGNACWCIQLPDNV	PIRIPGKCH											
М9.2	ARDA	YIAKPHNCVYEC	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	Q	GKYGNACWCIQLPDNV	Q	QPGKCH											
М9.3	ARD	G	YIAKPHNCVYEC	G	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	Q	GKYGNACWCIQLPDNV	Q	QPGKCH									
М9.4	ARDA	YIAK	N	YNCVYEC	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	LGKYGNACWCIQLPDNV	PIRIPGKCH											
М9.5	ARD	G	YIA	DDV	NCVYEC	G	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	ASP	YGNACWCIQLPDNV	RTKGPGRCH								
М9.6	ARDA	YIA	DD	HNCVYEC	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	LGKYGNACWCIQLPDNV	R	IRIPGKCH										
М9.7	A	K	DAYIAKPHNCVYEC	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	LGKYGNACWCIQLPDNV	PI	K	IPGRCH										
М9.8	ARDA	YIAKPHNCVYEC	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	LGKYGNACWCIQLPDNV	PI	K	IPGKCH											
М9.9	ARDA	YIAKPHNCVY	F	CYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	LGKYGNACWCIQLPDNV	PIRIPGKCH												
М9.10	ARD	G	YIA	DDV	N	C	T	F	C	GRNA	--	Y	CNDLCTENGAESGYCQI	W	ASP	YGNACWCIQLPDNV	G	V	RTKGPGRCH
М9.11	ARDA	YIAKPHNCVY	D	CYNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	LGKYGNACWCIQLPDNV	PIRIPGKCH												
М9.12	ARDA	YIA	E	PHNCVYEC	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	LGKYGNACWCIQLPDNV	PIRIPGKCH											
М9.13	ARDA	YIA	E	PHNCVYEC	G	YNPKG	SYCNDLCTENGAESGYCQI	LGKYGNACWCIQLPDNV	PIRIPGKCH										

М9.4, наоборот, характеризуется более гидрофобным модулем специфичности, чем ВеМ9, за счет переноса двух а.о. из модуля специфичности инсектотоксинов. Поэтому по нашему предположению новая молекула должна приблизиться к инсектоселективности.

В нескольких работах показано, что пересадка RC-домена приводит к смене селективности α -токсинов скорпионов [225, 226]. По аналогии, мы решили пересадить модуль специфичности классического α -млекотоксина Aah2 на каркас VeM9. Кроме того, в M9.5 мы также внесли в последовательность «шарнирные» глицины (аналогично производному M9.1). В этом случае модуль специфичности молекулы приобретает бóльшую подвижность, гидрофильность, а также топологию, характерную для α -млекотоксинов. В свою очередь в производное M9.6 мы перенесли редуцированный модуль специфичности α -млекотоксинов (наиболее консервативные остатки модуля специфичности), что преимущественно влияет на гидрофильность этой части молекулы.

Есть указания на то, что положительно заряженные остатки модуля специфичности α -токсинов скорпионов участвуют во взаимодействии с отрицательно заряженными остатками Na_v , причем важным для взаимодействия с каналом является, по-видимому, не только положительный заряд, но и длина боковой цепи [226]. Поэтому в M9.7 были произведены замены двух R на консервативные для млекотоксинов K (K2 и K58 у Aah2) и K на консервативный для млекотоксинов R (R56 у Aah2), а в M9.8 мы ограничились лишь заменой R60K. Предположительно, обе молекулы должны стать более селективными в отношении каналов млекопитающих.

Есть данные, согласно которым остатки в сердцевинном модуле также могут определять селективность α -токсинов скорпионов, в частности, остаток F15 у Aah2 (E15 у VeM9), высококонсервативный у млекотоксинов и не характерный для других групп α -токсинов скорпионов, вносит существенный вклад в распознавание $\text{Na}_v1.2$ [225]. По этой причине в производное M9.9 мы внесли замену E15F.

В производное M9.10 были внесены замены всех переменных среди α -токсинов остатков на соответствующие им остатки млекотоксина Aah2 (Рисунок 13), а также укорочена петля, расположенная между вторым и третьим остатками цистеина. Эта петля является частью поверхности токсина, взаимодействующей с каналом, и может стерически препятствовать связыванию VeM9 с каналом $\text{Na}_v1.2$ [233]. Стоит отметить, что связывание с $\text{Na}_v1.2$, помимо отсутствия активности в отношении каналов насекомых, является характерным отличием млекотоксинов от α -подобных токсинов.

Согласно литературным данным замена а.о. E1613 (по нумерации $\text{rNa}_v1.2$) в Na_v на D или R или наоборот, замена D1428 (по нумерации $\text{rNa}_v1.4$) на E, приводит к изменению избирательности α -токсинов скорпионов к Na_v [243, 325, 338, 339]. Поэтому в производном M9.11 мы попытались воспроизвести аналогичную замену E15D только в токсине, так как этот а.о. находится на

предполагаемой поверхности взаимодействия токсин–канал. По нашему предположению M9.11 приобретет активность в отношении каналов мозга млекопитающих (Nav1.2).

Наконец, производные M9.12 и M9.13 были получены благодаря случайным мутациям в генах запланированных производных.

Получение VeM9 и его производных

Токсин VeM9 и его производные получали в бактериальной системе экспрессии. Исходя из аминокислотной последовательности VeM9, методом обратной трансляции с помощью программы EditSeq из пакета программ Lasergene были построены нуклеотидные последовательности, кодирующие этот полипептид, с учетом наиболее часто встречающихся кодонов для *E. coli*. Полученная последовательность была фланкирована сайтами рестрикции *KpnI* в 5'-концевой области и *BamHI* в 3'-концевой для встраивания синтетических генов в экспрессионный вектор (Рисунок 19А). Кроме того, в 5'-концевую область был введен кодон метионина для отщепления целевого продукта от белка-помощника (Рисунок 19Б). Полноразмерная нуклеотидная последовательность была разделена на фрагменты, а синтез гена VeM9 осуществлялся комбинированием методов лигирования и ПЦР (Рисунок 20).

Для получения генов производных VeM9 нуклеотиды в соответствующих позициях заменяли на нужные, а синтез гена совершали аналогично синтезу гена VeM9. Далее полученные синтетические гены были введены в состав вектора pET-32b. Для этого была проведена рестрикция плазмиды pET-32b и соответствующего синтетического гена по сайтам *BamHI* и *KpnI*, а затем их лигирование по липким концам. В результате были получены векторные конструкции pET-32b-VeM9 и pET-32-M9.X, где X = 1–13 (Рисунок 19А). Полученные векторные конструкции методом электропорации были введены в клетки *E. coli* штамма XL1 Blue, который обеспечивает

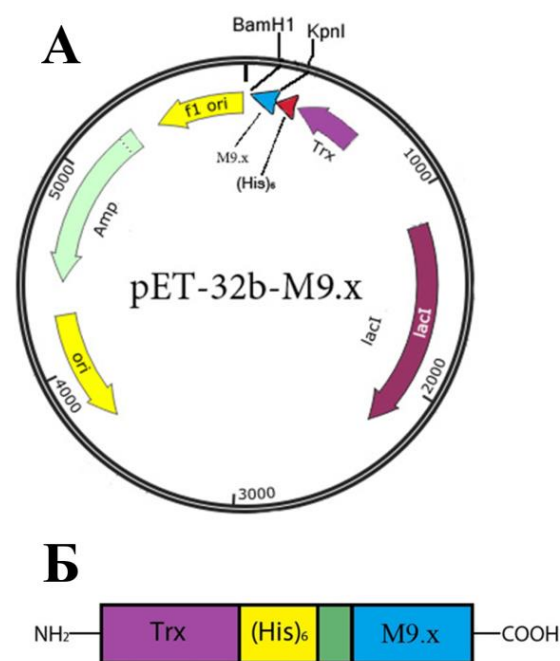


Рисунок 19. А. Схема организации плазмиды pET-32b-M9.x. Отмечены: положение вставки гена M9.x, Amp – ген устойчивости к ампициллину, f1 ori, ori – точки начала репликации, lacI – лактозный оперон, Trx – ген, кодирующий тиоредоксин, (His)₆ – последовательность, кодирующая гексагистидиновый участок. Б. Схема организации химерного белка Trx-M9.x. Показаны структурные элементы: тиоредоксин, гексагистидиновый участок, линкерный участок, M9.x.

высокий уровень копийности плазмиды. Из полученных клонов методом ПЦР с соответствующими праймерами f1 и rev были отобраны клоны, содержащие искомую нуклеотидную последовательность гена (Рисунок 20), правильность которой была подтверждена секвенированием по методу Сэнгера.

Полученные плазмидные векторы pET-32b-BeM9 и pET-32b-M9.X были далее использованы для трансформации клеток *E. coli* штамма Origami методом электропорации. Штамм Origami используется для получения пептидов с множеством дисульфидных связей, так как имеет мутации в генах тиоредоксин-редуктазы и глутатион-редуктазы [340]. Белки, кодирующиеся этими генами, не позволяют дисульфидным связям замыкаться в цитоплазме. Поэтому для наработки дисульфид-богатых пептидов в цитоплазме бактерии гены тиоредоксин-редуктазы и глутатион-редуктазы «выключены».

```

5'      KpnI  M  A  R  D  A  Y  I  A  K  P  H  N  C  V  Y  E  C  Y  N  P  K  G  S  Y
ATATGGTACCATGGCTCGTGACGCTTACATCGCTAAACCGCACAACTGCGTTTACGAATGCTACAACCCGAAAGGTTCTTACT
TATACCATGGTACCGAGCACTGCGAATGTAGCGATTTGGCGTGTGACGCAAATGCTTACGATGTTGGGCTTTCCAAGAATGA

C  N  D  L  C  T  E  N  G  A  E  S  G  Y  C  Q  I  L  G  K  Y  G  N  A  C  W  C  I
GCAACGACCTGTGCACCGAAAACGGTGCTGAATCTGGTTACTGCCAGATCCTGGGTAATAACGGTAACGCTTGCTGGTGCATC
CGTTGCTGGACAGTGGCTTTTGCACGACTTAGACCAATGACGGTCTAGGACCCATTTATGCCATTGCGAACGACCACGTAG

Q  L  P  D  N  V  P  I  R  I  P  G  K  C  H  stopBamHI  3'
CAGCTGCCGGACAACGTTCCGATCCGTATCCCGGGTAAATGCCACTAGGGATCCATGC
GTGACGGCCTGTTGCAAGGCTAGGCATAGGGCCATTTACGGTGTATCCCTAGGTACG

```

Рисунок 20. Синтетический ген, кодирующий BeM9. Подчеркиванием отмечены олигонуклеотидные фрагменты f1, f3 и f5, желтым выделены сайты рестрикции KpnI и BamHI, серым – праймеры f2 и f4, зеленым – праймеры rev, rev1/2, rev2/3, rev3/4, фиолетовым – стоп-кодон, голубым – кодон метионина.

После контролируемой экспрессии генов химерных белков проводили ультразвуковой лизис клеток. Из водорастворимой фракции тотального клеточного белка методом металл-хелатной аффинной хроматографии выделяли химерные белки Trx-BeM9 или Trx-M9.X (Рисунок 19Б), которые затем подвергали гидролизу с помощью бромциана. Продукты гидролиза разделяли затем методом ОФ-ВЭЖХ (Рисунок 18А), после чего проводили дополнительный раунд ОФ-ВЭЖХ для более тщательной очистки целевого продукта.

Стандартные условия экспрессии гена целевого продукта (концентрация индуктора ИПТГ 0,2 мМ, инкубация культуры при 22°C в течение 16 ч), выбранные на основе подобных работ в лаборатории, позволили получить полипептиды BeM9, M9.4, M9.6, M9.7, M9.8, M9.12, M9.13 в то время как для других производных наблюдались проблемы фолдинга: хроматографический пик, содержащий целевой продукт, имел гауссову форму с малым отношением полувысоты пика к

полуширине пика на полувысоте, что говорит о возможном перекрытии нескольких пиков, содержащих по-разному свернутый полипептид. В некоторых работах показано, что в случае пептидов с несколькими S-S-связями, понижение температуры увеличивает выход продукта с правильным расположением дисульфидных мостиков [341, 342]. Поэтому было решено понизить температуру экспрессии до 16°C, что позволило получить еще 4 полипептида (M9.1, M9.3, M9.5 и M9.6). Наконец, для получения производного M9.2 использовали штамм SHuffle, основанный на штамме Origami, но содержащий дополнительно мутации в гене периплазматической изомеразы дисульфидных связей DsbC, которая позволяет изомеразе находиться и в цитоплазме [342]. Экспрессию гена M9.2 проводили при комнатной температуре.

В результате были получены целевые полипептиды VeM9 и M9.X с выходом ~2 мг с 1 л клеточной культуры. О правильности аминокислотных последовательностей рекомбинантных продуктов судили по совпадению рассчитанной и измеренной методом МАЛДИ масс-спектрометрии масс полипептидов (Таблица 11).

Тестирование активности производных VeM9

Активность α -подобного токсина VeM9 и его производных тестировали методом двухэлектродной фиксации потенциала на четырех изоформах Na_v млекопитающих $\text{rNa}_v1.2$, $\text{rNa}_v1.4$, $\text{hNa}_v1.5$, $\text{mNa}_v1.6$ и на канале таракана *Blattella germanica* BgNa_v , экспрессирующихся в ооцитах *X. laevis*. Для сравнения активности молекул использовали количественную характеристику, называемую «эффективность ингибирования инактивации», которая определяется как $I_{30}^{\text{mutant}}/I_{\text{min}}$ для $\text{rNa}_v1.2$, $\text{rNa}_v1.4$, $\text{mNa}_v1.6$, BgNa_v и $I_5^{\text{mutant}}/I_{\text{min}}$ для $\text{hNa}_v1.5$, где I_{30}^{mutant} и I_5^{mutant} – величина токов через мембрану ооцита при приложении токсина спустя 30 мс и 5 мс соответственно после тестового импульса при добавлении токсина, а I_{min} – максимальная амплитуда контрольных токов через мембрану ооцита в отсутствие токсина (Таблица 14).

Из 13 производных VeM9 M9.13 оказался инсектоселективным, в то время как M9.10 наоборот стал избирательно действовать в отношении каналов млекопитающих. Проанализируем полученные результаты подробнее.

Неудачные попытки изменения селективности VeM9

Изменение физико-химических свойств поверхности α -токсинов скорпионов

Дизайн мутантов M9.1–4 был основан на изменении гидрофильности и/или подвижности модуля специфичности этих молекул. Тем не менее, ни введение «шарнирных» глицинов, ни грубая подстройка гидрофильности модуля специфичности не привела к нужному результату. Более того,

в случае M9.2 и M9.3 этот подход привел к полной потере активности в отношении Na_v . Вероятно, это связано со способностью определенных а.о. на поверхности молекулы участвовать в специфических взаимодействиях с Na_v , что нельзя обеспечить простой корректировкой гидрофильности, а требует введения конкретных а.о. Кроме того, важную роль может играть рельеф молекулы, который со стерической точки зрения может определять способность полипептида взаимодействовать с той или иной изоформой Na_v . Возможно также, что потеря активности M9.2 и M9.3 произошла из-за замены гидрофобного остатка I40, который вовлечен в связывание с каналами [233], на Q или замены I59 на Q, ставшей причиной перестройки сети водородных связей RC-домена, что в конечном итоге привело к изменению формы модуля специфичности.

Таблица 14. Активность производных ВеM9 на Na_v . Сокращение «н/а» обозначает «не активен при концентрации 1 мкМ»; числа обозначают эффективность действия токсина в концентрации 1 мкМ на данный канал. Относительная погрешность приведенных величин не превышает 5%. Оранжевым цветом обозначено производное ВеM9, селективное в отношении млекопитающих, голубым – в отношении насекомых.

	$Na_v1.2$	$Na_v1.4$	$Na_v1.5$	$Na_v1.6$	Bg Na_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

Пересадка модулей специфичности

В ряде работ показано, что пересадка RC-домена из одного α -токсина скорпиона на каркас другого может привести к соответствующему изменению профиля селективности производного полипептида [225, 226]. Мы решили использовать похожий подход для изменения селективности ВеM9. Два производных M9.5 и M9.6, полученные с помощью пересадки модуля специфичности из классического α -млекотоксина Aah2, не оправдали ожиданий: пересадка полного модуля специфичности привела к получению неактивной молекулы, в то время как пересадка

редуцированного модуля специфичности – к общему ухудшению активности молекулы. Вероятно, неудача этого подхода в нашем случае связана с наличием у ВеМ9 удлиненной петли между вторым и третьим остатками цистеина, которая стерически мешает связыванию токсина и его производных с $\text{Na}_v1.2$. Так, недавние исследования α -подобного токсина $\text{MeuNaTx}\alpha\text{-5}$, выделенного из яда скорпиона *M. eureus* (как и ВеМ9), показывают, что аналогичная удлиненная петля принимает непосредственное участие в связывании с каналом, а ее укорочение уменьшает токсичность $\text{MeuNaTx}\alpha\text{-5}$ для млекопитающих и увеличивает для насекомых [233]. Кроме того, возможно, в получении селективного производного ВеМ9 могли помочь замены а.о. в сердцевинном модуле токсина, для которых в предыдущих работах была показана важная роль для селективности токсинов [225, 226]. Эти замечания были учтены при проектировании производного М9.10, которое будет рассмотрено далее.

Внесение точечных аминокислотных замен

Ряд работ также демонстрирует важность отдельных а.о. в селективности α -токсинов скорпионов. Так, экспериментально продемонстрировано, что остаток F1610 $\text{rNa}_v1.2$ взаимодействует с F15 Lqh2 [339], и с помощью мутагенеза показано, что именно ароматическая боковая цепь в данной позиции важна для связывания с изоформой натриевых каналов, характерной для мозга [225, 226]. Вероятно, поэтому F15 (по нумерации Lqh2) является консервативным остатком среди млекотоксинов. Мы предположили, что замена E15F в сердцевинном модуле ВеМ9 позволит получить производное, действующее на канал мозга млекопитающих. К сожалению, профиль специфичности производного слабо изменился скорее всего из-за того, что в связывании токсина с каналами участвуют и другие остатки.

В М9.11 мы произвели замену E15D, поскольку есть данные, демонстрирующие, что аналогичная замена отрицательно заряженного а.о. канала приводит к изменению его чувствительности к инсекто- и млекотоксинам [243, 325, 338, 339]. Тем не менее, активность снизилась примерно одинаково на всех протестированных каналах. Это указывает на то, что E15 важен для связывания с каналами, но длина боковой цепи не играет роли в специфичности ВеМ9.

Производные М9.7 и М9.8 были спроектированы на основании данных о том, что положительно заряженные остатки модуля специфичности α -токсинов скорпионов участвуют во взаимодействии с отрицательно заряженными остатками Na_v [226], причем важным для взаимодействия с каналом является, по-видимому, не только положительный заряд, но и длина боковой цепи. Последующий

анализ ВеМ9 позволил заключить, что боковые цепи R2 и R60 направлены внутрь молекулы и участвуют в образовании ряда водородных связей, стабилизирующих пространственную укладку полипептида, а их замена может приводить к изменению сетки водородных связей, конформационным перестройкам и, как следствие, изменению профиля селективности данных молекул. Любопытно, что замена R60K ощутимо сдвинула селективность токсина в сторону инсекто-специфичности, в то время как замена всех трех положительно заряженных остатков вернула селективность примерно к начальному уровню, что вероятно связано с созданием сетки водородных связей, эквивалентной начальной.

Млекоселективное производное M9.10

Анализ неудачных попыток пересадки модуля специфичности на каркас ВеМ9 подтолкнул нас к созданию производного M9.10. Так, в M9.10 мы внесли следующие замены: пересадили модуль специфичности из Aah2, ввели «шарнирные» глицины в положениях 4 и 17, обеспечивающие необходимую подвижность модуля специфичности, а также пересадили все другие остатки из Aah2, которые являются консервативными для млекотоксинов или подвержены позитивной селекции [195, 236], и укоротили петлю между вторым и третьим остатками цистеина. Последнее было сделано для того, чтобы гарантировать необходимую топологию поверхности токсина. Все эти замены привели к получению производного, активного в отношении $Na_v1.2$ и других изоформ Na_v млекопитающих, но не активного в отношении каналов насекомых.

Инсектоселективное производное M9.13

Несмотря на ряд попыток получить инсектоселективное производное путем рационального дизайна, именно счастливая случайность позволила нам достичь желаемого результата, причем путем введения в последовательность ВеМ9 всего двух замен K8E и Y17G. Анализ ВеМ9 позволил выявить, что K8 участвует в π -катионном взаимодействии с Y14, а также возможно образует солевой мост с E15, тем самым стабилизируя модуль специфичности токсина. Поэтому замена этого остатка (производное M9.12) дестабилизирует модуль специфичности, меняя его конформацию и возможно делая его более подвижным, что приводит к полной потере активности в отношении $Na_v1.4$ и снижению активности в отношении $Na_v1.5$, $Na_v1.6$ и $BgNa_v1$ в 8, 4 и 2 раза соответственно. Дополнительное введение «шарнирного» глицина в положение 17 приводит, видимо, к изменению подвижности модуля специфичности и, как результат, исчезновению активности в отношении Na_v млекопитающих.

Уточнение сайта связывания α -токсинов скорпионов

Выявленные различия между α -токсинами с различной таксономической селективностью подсказали, что и сайты их связывания будут различаться по своим физико-химическим свойствам. Мы исследовали гидрофобность внеклеточных петель S1–S2, S3–S4, S5–P и P–S6 различных изоформ Na_v : Na_v семи видов насекомых и семи Na_v трех видов млекопитающих (мыши, крысы и человека) (Рисунок 21А).

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.

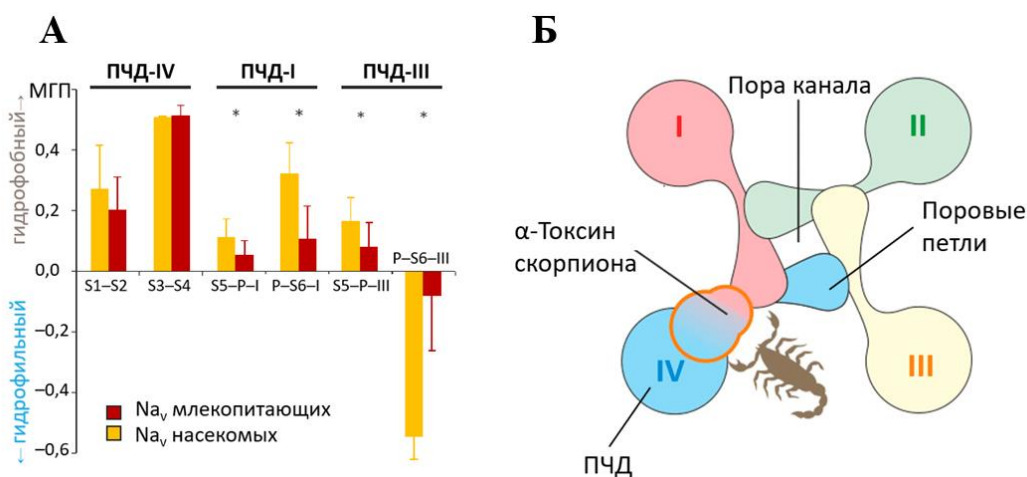


Рисунок 21. А. Средняя гидрофобность внеклеточных петель Na_v . Звездочкой отмечены петли, существенно отличающиеся между группами ($p < 0,05$). Б. Модель связывания α -токсина скорпиона с Na_v .

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.

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 21Б): более статичный сердцевинный модуль токсина взаимодействует с консервативным гидрофобным ПЧД-IV, а более подвижный и гидрофильный модуль специфичности – с вариабельными и более гидрофильными петлями ПД повтора I.

Промежуточное заключение

Было 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-IV, а модуль специфичности – за селективность действия токсинов с внеклеточными петлями ПД-I (Рисунок 21Б). Более того, свойства модулей специфичности α -токсинов скорпионов, селективных в отношении определенных Na_v , соответствуют свойствам ПЧД-IV 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 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.

Изучение структурно-функциональных особенностей ингибиторов активации Na_v

Изучение структурных и функциональных особенностей токсина Hm-3

Выбор объекта исследования

Среди множества пептидов, действующих на рецепторный сайт 4, нас заинтересовала группа токсинов пауков, способных ингибировать активацию Na_v (см. Обзор литературы, раздел «Токсины, ингибирующие активацию Na_v »). В настоящее время эта группа насчитывает порядка дюжины представителей, причем все они были выделены из пауков-птицеедов, принадлежащих к инфраотряду мигаломорфных пауков. Ранее же в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН из яда аранеоморфного паука *H. melloteei* был выделен токсин Hm-3, обладающий сходным действием [285, 336]. Поэтому в рамках данной работы мы решили тщательно охарактеризовать этот токсин; выявить его особенности, ответственные за ингибирование активации натриевых каналов, а также сравнить его с другими ингибиторами активации Na_v .

Получение рекомбинантного токсина Hm-3 и исследование его пространственной структуры

Для проведения полноценных структурных и функциональных исследований токсина Hm-3 необходимы были его миллиграммовые количества. Выделение нативного пептида из природного источника затруднено, что связано с небольшими размерами пауков *H. melloteei* и, как следствие, ограниченным количеством яда, доступного нам. Поэтому было решено получать токсин в бактериальной системе экспрессии.

Методика получения Hm-3 была аналогична методике получения токсина ВеМ9: сначала мы спроектировали и синтезировали ген пептида, который затем ввели в состав плазмиды pET-32a. После этого имела место ИПТГ-индуцируемая экспрессия гена токсина в клетках *E. coli* штамма Origami (16 часов при температуре $\sim 22^\circ\text{C}$), очистка с помощью металл-хелатной хроматографии химерного белка, гидролиз с помощью бромциана и два раунда ОФ-ВЭЖХ для очистки целевого продукта (Рисунок 22А). Идентичность полученного рекомбинантного пептида природному заключали по совпадению измеренной методом МАЛДИ масс-спектрометрии массы пептида с расчетной, а также по совпадению хроматографических подвижностей природного и рекомбинантного Hm-3 (Рисунок 22Б). Выход целевого продукта составил ~ 200 мкг с 1 л культуры *E. coli*.

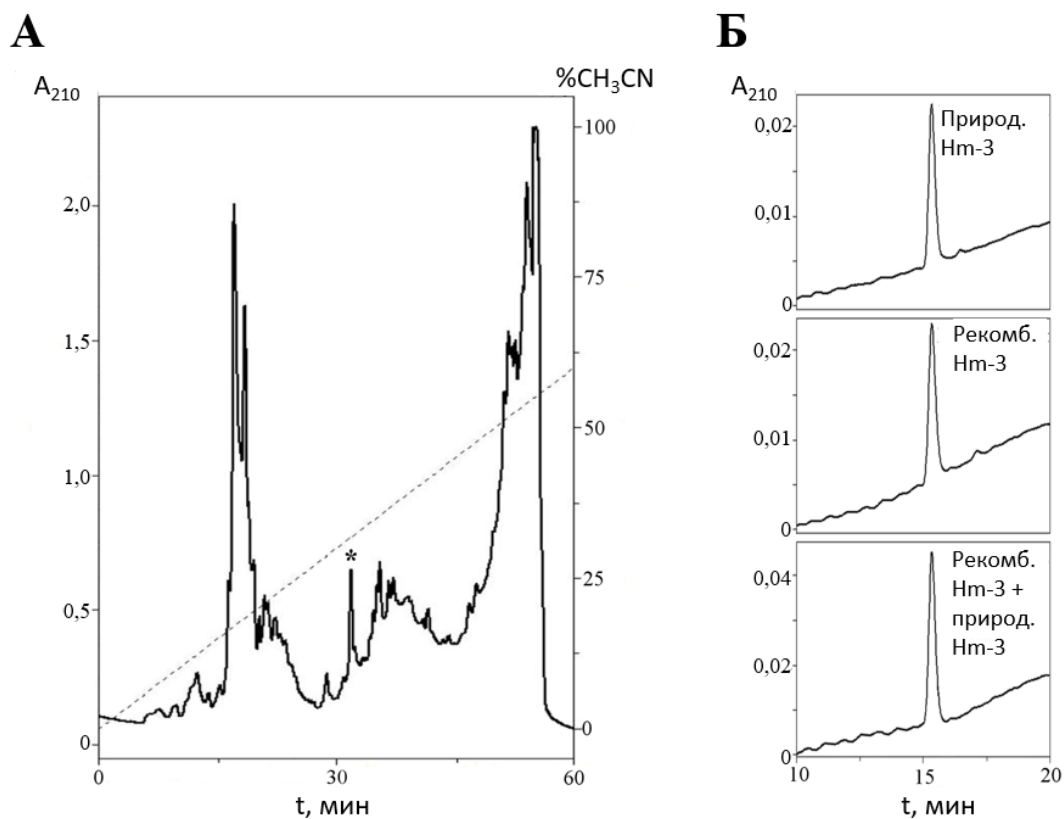


Рисунок 22. Получение Hm-3. А. Профиль хроматографического разделения продуктов гидролиза Trx-Hm-3 с использованием бромциана. Звездочкой отмечена фракция, содержащая Hm-3. Б. Сравнение хроматографических подвижностей природного и рекомбинантного Hm-3.

Для изучения пространственной структуры было получено ^{15}N -меченое производное Hm-3. Для этого клетки *E. coli*, несущие плазмиду с геном целевого продукта, культивировали на бедной среде M9, содержащей $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. Выход ^{15}N -меченого Hm-3 составил ~ 100 мкг с 1 л культуры *E. coli*.

Исследование пространственной структуры Hm-3 в водной среде при pH 5,2 и температуре 35°C методами ЯМР-спектроскопии высокого разрешения было проведено сотрудниками лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН. Было показано, что в пространстве Hm-3 образует β -шпильку, сформированную двумя β -тяжами C23–S26 и L31–C34, соединенными петлей в 3_{10} -спиральной конформации (Рисунок 23А). Стоит отметить, что β -шпилька выпячивается из «глобулярного ядра», стабилизированного тремя дисульфидными связями в топологии цистинового узла (C2–C18, C9–C23, C17–C34) (Рисунок 23Б). Таким образом, можно заключить, что в пространстве Hm-3 образует так называемый цистиновый узел, характерный для токсинов пауков тип укладки.

Стоит отметить, что, несмотря на невысокий уровень сходства аминокислотных последовательностей, ингибиторы активации Na_v , выделенные из мигаломорфных пауков, также в пространстве образуют укладку типа цистинового узла [30, 295, 302, 343]. Более того, для ингибиторов активации других ионных каналов, в частности, ингибиторов активации потенциал-чувствительных калиевых каналов, также характерен этот тип укладки [344, 345]. Тем не менее, несмотря на то, что в целом укладка Hm-3 сходна с укладкой других ингибиторов активации ионных каналов, есть и явные отличия. Так, отличаются длины петель между остатками цистеина, а особенно петля между двумя последними остатками C^V и C^{VI} , которая, по меньшей мере, на 4 остатка длиннее у Hm-3 по сравнению с другими представителями этой группы. С-Концевая область же, наоборот, у Hm-3 содержит всего один а.о. (Рисунок 24).

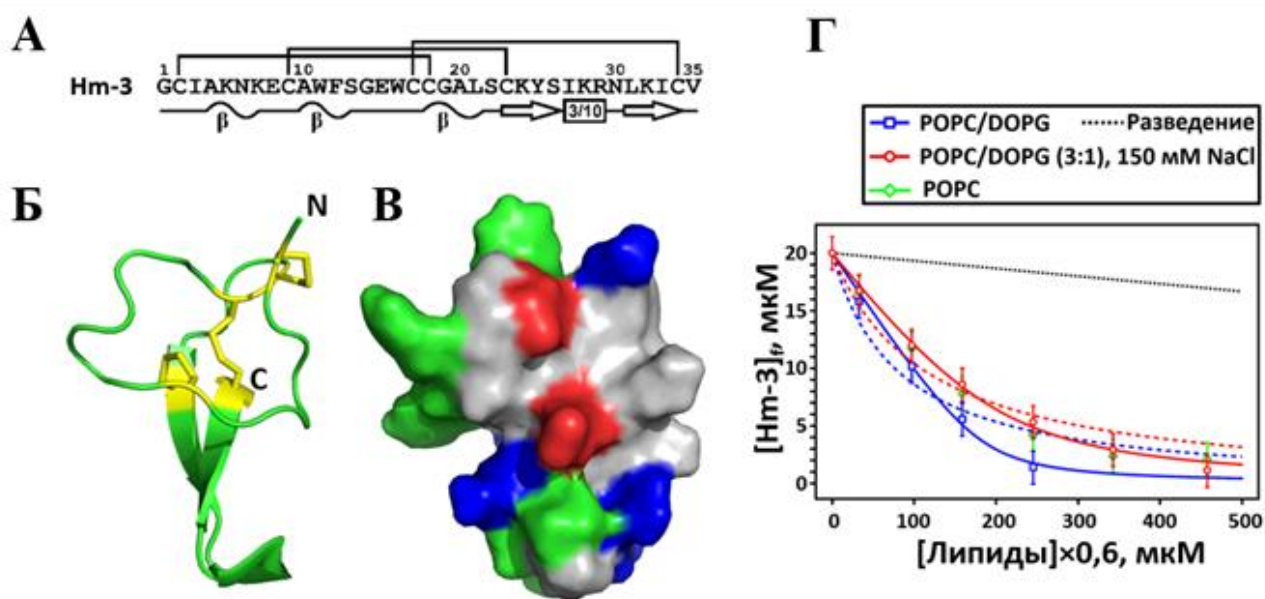


Рисунок 23. А. Аминокислотная последовательность Hm-3. Под последовательностью указаны элементы вторичной структуры токсина: β -тяжи показаны стрелками, 3_{10} -спираль – прямоугольником, β -повороты – волнистыми линиями. Б. Ленточное представление пространственной структуры Hm-3. Дисульфидные связи 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, $[Lипиды] \times 0,6$ – концентрация липидов во внешнем монослое везикул.

Анализ свойств поверхности Hm-3 позволил обнаружить амфифильную природу данного пептида: гидрофобный кластер на поверхности молекулы, образованный W11, F12, W16, Y25, I27, L31, окружен короной заряженных групп, включающих в себя два отрицательно заряженных остатка

Е8 и Е15, а также четыре положительно заряженных остатка К24, К28, R29, К32 и N-концевую аминокислотную группу (Рисунок 23В). Амфифильность молекулярной поверхности также характерна и для других ингибиторов активации Na_v [30, 295, 302, 343], что делает это свойство общей чертой представителей этой группы токсинов. Однако распределение физико-химических свойств на поверхности Hm-3 отличается от такового у других молекул. Так, гидрофобные остатки у Hm-3 сосредоточены в петлях 2 ($\text{C}^{\text{II}}-\text{C}^{\text{III}}$) и 4 ($\text{C}^{\text{V}}-\text{C}^{\text{VI}}$), в то время как у других ингибиторов активации (как Na_v , так и потенциал-чувствительных калиевых каналов) основной вклад в гидрофобный кластер вносят остатки из петли 1 ($\text{C}^{\text{I}}-\text{C}^{\text{II}}$) и 4 ($\text{C}^{\text{V}}-\text{C}^{\text{VI}}$), а также С-концевой области (Рисунок 24). Это приводит к тому, что при сопоставлении пространственных структур Hm-3 и других ингибиторов активации, гидрофобный кластер у Hm-3 оказывается с противоположной стороны молекулы.

Рисунок 24. Сравнение аминокислотных последовательностей ингибиторов активации Na_v из



пауков. Остатки цистеина показаны серым выделением, остатки, участвующие в формировании гидрофобного кластера – черным выделением и белым шрифтом. Над последовательностью Hm-3 указаны элементы его вторичной структуры. β -Тяжи показаны стрелками, 3_{10} -спираль – прямоугольником, β -повороты – волнистыми линиями.

Таким образом, подобно другим ингибиторам активации Na_v , Hm-3 образует в пространстве укладку типа цистинового узла, а для его поверхности характерна амфифильность. Однако по сравнению с другими ингибиторами активации Na_v гидрофобный кластер у Hm-3 находится с обратной стороны молекулы.

Электрофизиологическая характеристика Нм-3

Активность Нм-3 в отношении ионных каналов

Ранее в лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН совместно с лабораторией токсикологии и фармакологии Католического университета Лёвена было показано, что в концентрации 100 нМ Нм-3 способен ингибировать токи через ряд Na_v , более того в концентрации 1 мкМ этот токсин сдвигал вольтамперную характеристику канала $Na_v1.4$ вправо, что и позволило отнести токсин в группу ингибиторов активации Na_v . В рамках представленной работы, также совместно с лабораторией токсикологии и фармакологии Католического университета Лёвена, Нм-3 в концентрации 1 мкМ был протестирован на панели Na_v (Рисунок 25А). Токсин оказался активен в отношении $Na_v1.2$, $Na_v1.4-1.6$ и $DmNa_v1$. При этом выраженный сдвиг вольтамперной характеристики вправо наблюдался только для $Na_v1.4$, $Na_v1.5$ и $DmNa_v1$. Стоит отметить, что повышение концентрации Нм-3 приводило к увеличению сдвига в случае $Na_v1.2$ и $Na_v1.6$, для которых в концентрации 1 мкМ подобный эффект не наблюдался.

Далее мы оценили концентрационную зависимость действия Нм-3, для чего были построены кривые зависимости доза–ответ (показателем ответа служил процент ингибирования тока через канал) (Рисунок 25Б). Для $Na_v1.2$ полуэффективная доза EC_{50} составила 1447 ± 462 нМ ($h=0,8 \pm 0.1$), для $Na_v1.4$ – 103 ± 15 нМ ($h=0,7 \pm 0.1$), для $Na_v1.5$ – 268 ± 23 нМ ($h=0,7 \pm 0.1$), для $Na_v1.6$ – 3504 ± 608 нМ ($h=0,6 \pm 0.1$) и для $DmNa_v1$ – 555 ± 13 нМ. Стоит отметить, что эти результаты сопоставимы с данными для других ингибиторов активации Na_v . Так, для ProTx-II $EC_{50}=540$ нМ в отношении $Na_v1.2$ [297], для HWTX-IV EC_{50} составляет 150 нМ, 338 нМ и 400 нМ в отношении $Na_v1.2$, $Na_v1.3$ и $Na_v1.4$ соответственно [346], а для JZTX-III $EC_{50}=348$ нМ в отношении $Na_v1.5$ [347]. Значение коэффициента Хилла во всех случаях приблизительно равно 1, что указывает на необходимость всего одной молекулы токсина для модуляции канала.

Одним из важных свойств ингибиторов активации Na_v является низкая специфичность их действия или «промискуитет» [348]. Так, ProTx-I и ProTx-II действуют и на потенциал-чувствительные кальциевые каналы Т-типа [349], ProTx-I связывается с TRPA1 [350], а JZTX-III оказался способен ингибировать потенциал-чувствительные калиевые каналы $K_v2.1$ [296]. По этой причине мы протестировали Нм-3 в отношении потенциал-чувствительных калиевых каналов $K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v2.1$, $K_v4.2$, $K_v10.1$, а также в отношении потенциал-чувствительного кальциевого канала $Ca_v3.3$, но в концентрации 1 мкМ активности в отношении этих каналов обнаружено не было. Тем не менее, Нм-3 показывает довольно широкий спектр активности по отношению к различным натриевым каналам, что также свидетельствует о низкой специфичности его действия.

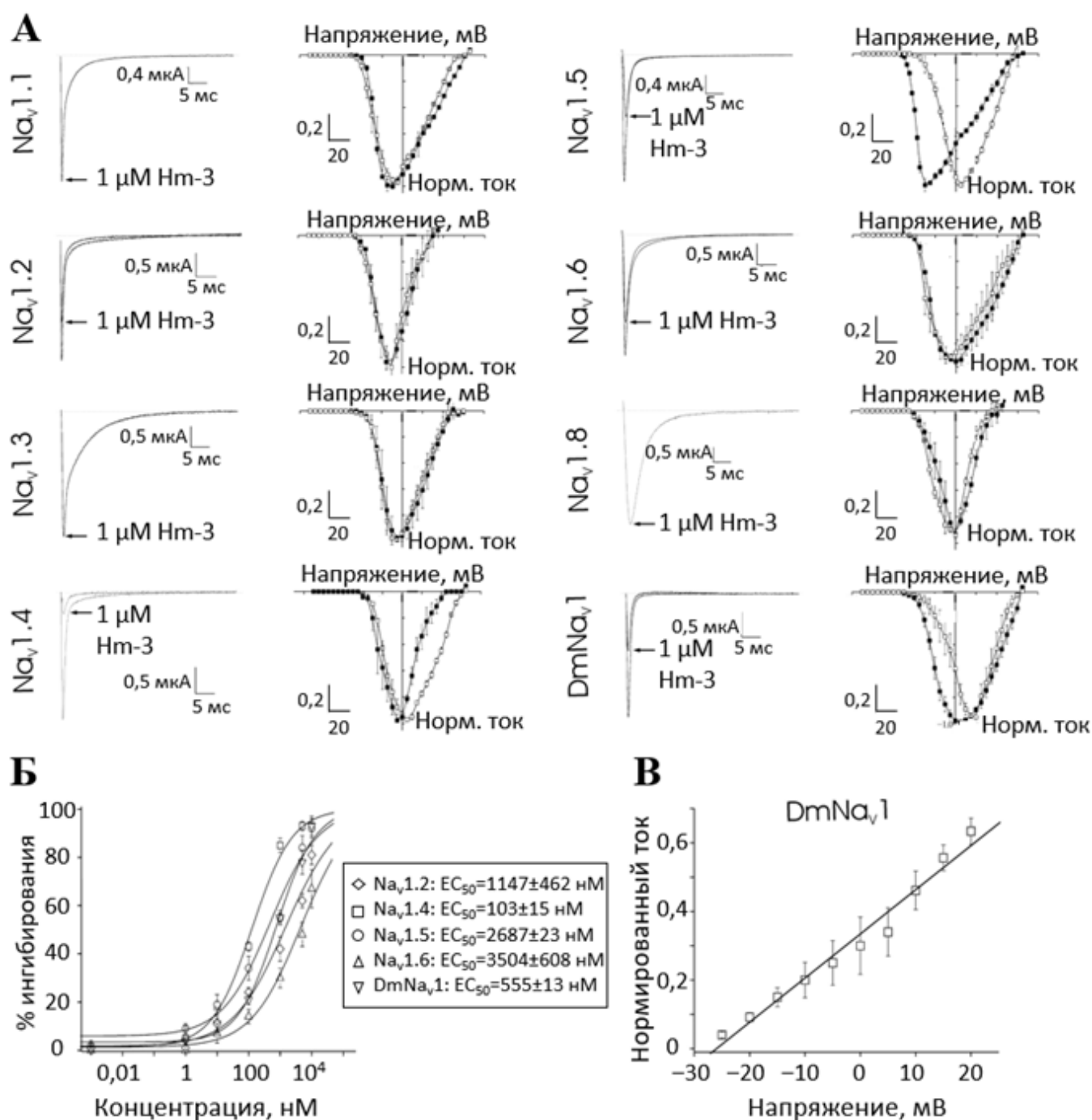


Рисунок 25. А. Эффекты Hm-3 на различные Na_v . Слева представлены записи токов в контроле и при приложении 1 мкМ Hm-3 (показано стрелочкой). Справа представлены нормализованные вольтамперные характеристики для быстрой компоненты тока в контроле (■) и в присутствии 1 мкМ Hm-3 (○). $Na_v1.1-1.6, 1.8$ – 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 (EC_{50}). В. Потенциал-зависимость действия Hm-3 на $DmNa_v1$.

Особенности действия Hm-3 на Na_v

Для анализа характера действия Hm-3 на Na_v мы изучили, является ли действие Hm-3 потенциал-зависимым. Для этого на основе вольтамперной характеристики мы вычисляли отношение тока через канал при приложении токсина к току через канал без приложения токсина при различных значениях прикладываемого напряжения. Было показано, что это отношение находится в линейной зависимости от напряжения (Рисунок 25B), что свидетельствует о потенциал-зависимости действия Hm-3.

Для двух $Na_v1.4$ и $DmNa_v1$ мы изучили также действие токсина на воротные механизмы канала (Рисунок 26). Оказалось, что в случае с $DmNa_v1$ Hm-3 приводит к значительному смещению нормированной кривой активации: $V_{1/2}$ смещается с $-21,7 \pm 0,1$ мВ в контроле до $-4,1 \pm 0,4$ мВ после приложения 1 мкМ токсина. Для $Na_v1.4$ при этом никакого существенного сдвига не наблюдалось. Обратная ситуация имела место для кривых инактивации: в то время, как для $DmNa_v1$ наблюдался незначительный сдвиг ($V_{1/2} = -49,8 \pm 2,2$ мВ в контроле и $V_{1/2} = -45,2 \pm 1,6$ мВ при приложении токсина), для $Na_v1.4$ смещение кривой было существенным ($V_{1/2} = -67,1 \pm 0,7$ мВ в контроле и $V_{1/2} = -54,0 \pm 0,3$ мВ при приложении токсина).

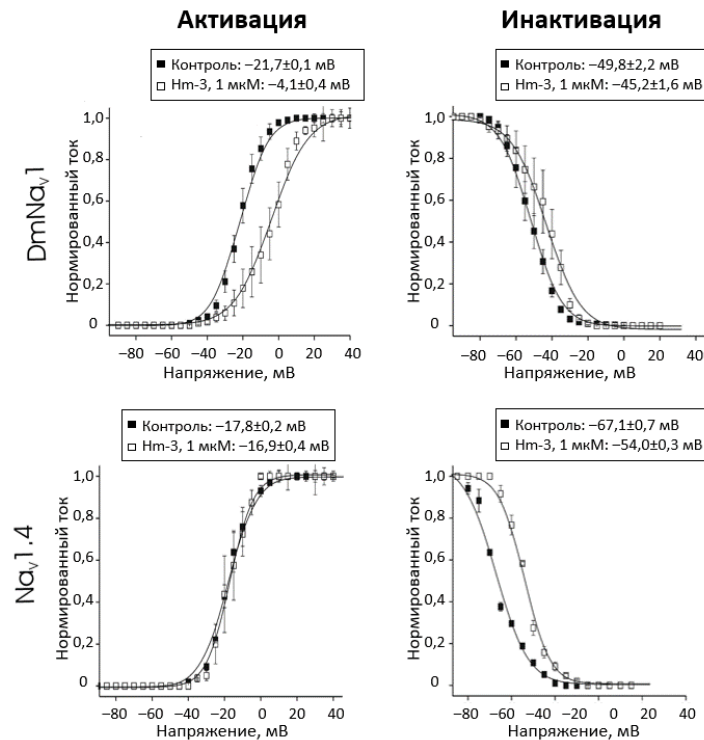


Рисунок 26. Влияние Hm-3 на свойства токов через каналы $Na_v1.4$ и $DmNa_v1$. Кривые активации и инактивации для $DmNa_v1$ и $Na_v1.4$ показаны для контрольных измерений (■) и после аппликации 1 мкМ Hm-3 (□). Вверху приведены значения напряжения, при которых достигается полумаксимальная проводимость каналов ($V_{1/2}$).

Поскольку подобные отличия в действии Hm-3 на $Na_v1.4$ и $DmNa_v1$ может быть вызвано различным сродством токсина к этим Na_v , мы изучили эффективность связывания токсина с каналами в зависимости от приложения предварительного импульса. В первой серии экспериментов мы использовали следующий протокол: после сильного деполяризирующего импульса до +100 мВ различной длительности (предимпульса) напряжение понижали до потенциала покоя -100 мВ на 20 мс и подавали тестовый импульс до 0 мВ на протяжении 100 мс (Рисунок 27А). Было показано, что для обоих каналов имеет место частичное восстановление натриевого тока (Рисунок 27Б). При этом даже при максимальной длительности предимпульса ток восстанавливается не полностью (до 68 и 90% по сравнению с контрольным для $Na_v1.4$ и $DmNa_v1$ соответственно), а «насыщение» происходит при предимпульсе длительностью 635 мс.

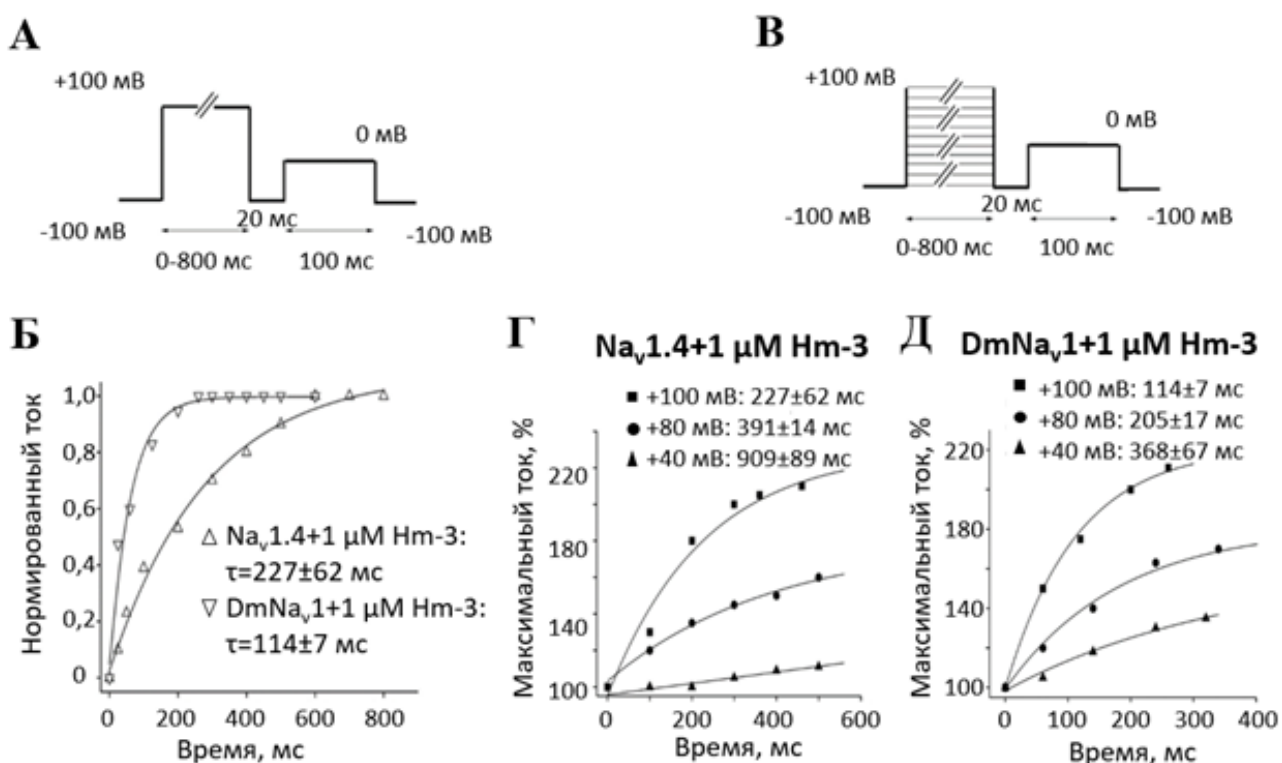


Рисунок 27. Потенциал-зависимость обратимости ингибирования Na_v , вызванного взаимодействием с Hm-3. А и В. Последовательность приложения разности потенциалов к мембране ооцитов *X. laevis* в экспериментах. Б. Увеличение амплитуды тока натрия в ответ на увеличение длительности предимпульса. τ – значения 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%.

Стоит отметить, что восстановление тока происходило экспоненциально, но при этом наблюдалась различная кинетика для $Na_v1.4$ и $DmNa_v1$. Для количественной оценки этих различий

мы варьировали также и силу предимпульса, изменяя прикладываемое напряжение от +40 до +100 мВ (Рисунок 27В). Для обоих каналов восстановление натриевого тока было самым быстрым при предимпульсе в 100 мВ и самым медленным при 40 мВ (Рисунок 27Г, Д). Тем не менее, скорость восстановления для $DmNa_v1$ была ощутимо больше (Рисунок 27Г и Д): при +100 мВ ток восстанавливался на 50% за 114 мс и 227 мс для $DmNa_v1$ и $Na_v1.4$ соответственно, а при +40 мВ – за 370 мс и 910 мс соответственно.

Все эти данные позволили уверенно отнести Нм-3 к ингибиторам активации Na_v , поскольку помимо сдвига вольтамперной характеристики вправо, действие токсина оказалось 1) потенциал-зависимым, что считается характерной особенностью ингибиторов активации Na_v [139, 297, 351]; 2) обратимо с помощью приложения деполяризующих предимпульсов, что также характерно для других ингибиторов активации Na_v [164, 297], причем 3) восстановление тока оказалось потенциал-зависимым, что было ранее описано для других ингибиторов активации Na_v , в частности, ProTx-I [297], ProTx-II [297] и HWTX-IV [352].

Кроме этого, полученные результаты позволили выдвинуть гипотезу о причинах разного влияния Нм-3 на $DmNa_v1$ и $Na_v1.4$. Напомним, что для ингибиторов активации Na_v общепринятым считается механизм действия, называемый мембрано-опосредованным захватом сенсора потенциала [246, 297]: токсины сначала связываются с липидной мембраной клетки, затем дрейфуют по мембране, связываются с натриевым каналом и фиксируют его в неактивированном состоянии. Предимпульс же дает каналу энергию, достаточную для того, чтобы «сбросить» токсин и перейти в активированное состояние. В связи с различной аффинностью токсина к $DmNa_v1$ и $Na_v1.4$, энергия и, как следствие, предимпульс, необходимый для сбрасывания токсина, больше для $Na_v1.4$. Поэтому в случае с $Na_v1.4$ в основном активируются те каналы, которые не связаны с токсином, что выражается в значительном уменьшении натриевого тока и отсутствии сдвига активационной кривой. При этом в случае с $DmNa_v1$ происходит активация как каналов, которые не связаны с токсином, так и тех, которые связаны. В результате мы фиксируем суперпозицию таких токов, что приводит к более выраженному сдвигу активационной кривой. Влияние же Нм-3 на инактивацию Na_v может быть связано либо со взаимодействием Нм-3 с IV псевдосубъединицей, ответственной за инактивацию канала, что также характерно для некоторых ингибиторов активации Na_v [300, 301], либо с опосредованным действием токсина на инактивацию канала за счет его связывания с ПЧД, ответственными за активацию Na_v . Далее будет показано, что Нм-3 не связывается с ПЧД-IV, что свидетельствует в пользу второго предположения.

Анализ взаимодействия Hm-3 с липидными мембранами

В связи с выраженной амфифильностью поверхности Hm-3 и тем фактом, что другие ингибиторы активации Na_v способны связываться с липидными мембранами, совместно с группой структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН мы решили проверить мембранную активность Hm-3. Для этого были приготовлены моноламеллярные липидные везикулы из цвитерионных (POPC), а также из смеси цвитерионных и анионных липидов (POPC/DOPG, 3:1). Титрование образца пептида липосомами приводило к уменьшению интенсивности ЯМР сигнала (Рисунок 23Г), что свидетельствовало о связывании молекул Hm-3 с поверхностью везикул. Из-за очень медленной переориентации липидных везикул в растворе связанные молекулы пептида становятся «невидимыми» для ЯМР-спектроскопии высокого разрешения, а интенсивность сигнала ЯМР прямо пропорциональна равновесной концентрации свободного пептида в растворе (C_f). Кривые, описывающие связывание Hm-3 с липидными везикулами различного состава (Рисунок 23Г) показали, что токсин способен эффективно связываться как с цвиттерионными, так и с анионными липосомами при ионной силе раствора близкой к физиологической (150 мМ NaCl). Сравнение этих данных с результатами, полученными в условиях с низким содержанием соли, показало, что добавление 150 мМ NaCl в раствор лишь незначительно влияет на связывание токсина с анионными липосомами (для цвиттерионных липосом такой эксперимент не проводился).

Коэффициенты распределения Hm-3 в липидных везикулах были рассчитаны с помощью уравнений простой изотермы и изотермы Ленгмюра (Таблица 15), причем первая классически используется для таких ситуаций, хотя вторая лучше соответствует полученным экспериментальным данным и позволяет также определить число молекул липида, участвующих во взаимодействии с пептидом. Так, вне зависимости от состава липидных везикул и концентрации соли участок связывания пептида на поверхности везикул образуется ~10 липидными молекулами. При этом отсутствие выраженной зависимости коэффициента распределения от изменения заряда липидов и концентрации соли указывает на то, что гидрофобные взаимодействия играют ключевую роль в связывании Hm-3 с мембранами.

Стоит отметить, что несмотря на расположение гидрофобного кластера с обратной стороны молекулы по сравнению с другими ингибиторами активации Na_v , Hm-3 подобно другим представителям этой группы связывается с мембранами, причем с сопоставимой аффинностью: [246, 304, 344, 353].

Таблица 15. Параметры, описывающие взаимодействие Hm-3 с липидными везикулами. K_p – коэффициент распределения, K_N – константа образования комплекса пептид–сайт связывания, образованный N молекулами липидов.

Тип липидных везикул	Равновесное распределение	Изотерма Ленгмюра	
	$K_p, \times 10^3 \cdot M^{-1}$	$K_N, \times 10^6 \cdot M^{-1}$	N
POPC/DOPG (3:1)	12.5±3.0	1.09±0.57	9.7±0.8
POPC/DOPG (3:1), 150 mM NaCl	8.6±1.3	0.29±0.09	10.6±0.8
POPC, 150 mM NaCl	9.5±1.4	0.27±0.05	9.4±0.7

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 -шпильки, аминокислотные остатки которых (W11, F12, W16, Y25, I27, L31) формируют гидрофобный кластер на поверхности токсина. Стоит также отметить, что ощутимых различий во вторичной структуре Hm-3 в воде и мицеллах не наблюдалось (1H химический сдвиг в среднем составил 0,09 ppm), что свидетельствует о том, что пространственная структура токсина не изменяется при связывании с мембраной.

Анализ взаимодействия Hm-3 с Na_v

В настоящее время основным сайтом связывания ингибиторов активации Na_v с каналом считается рецепторный сайт 4, образованный преимущественно петлями IIS1–S2 и IIS3–S4. Тем не менее, в некоторых работах показано, что S3–S4 петли других псевдосубъединиц, помимо II, также могут участвовать во взаимодействии с ингибиторами активации Na_v [300]. Поэтому мы решили выявить сайт связывания Hm-3 с Na_v . Для этого, совместно с отделом физиологии университета Джонса Хопкинса, мы провели следующие эксперименты. В потенциал-чувствительный калиевый канал $K_v2.1$ взамен собственных пересаживали S3–S4 петли различных псевдосубъединиц $Na_v1.4$ (Рисунок 28А) и затем определяли способность токсина ингибировать активность мутантного канала. Оказалось, что в концентрации 1,5 мкМ Hm-3 был способен ингибировать токи только в тех мутантных каналах, в которые была внесена петля IS3–S4 (Рисунок 28Б). Это означает, что основной сайт связывания Hm-3 находится в псевдосубъединице I.

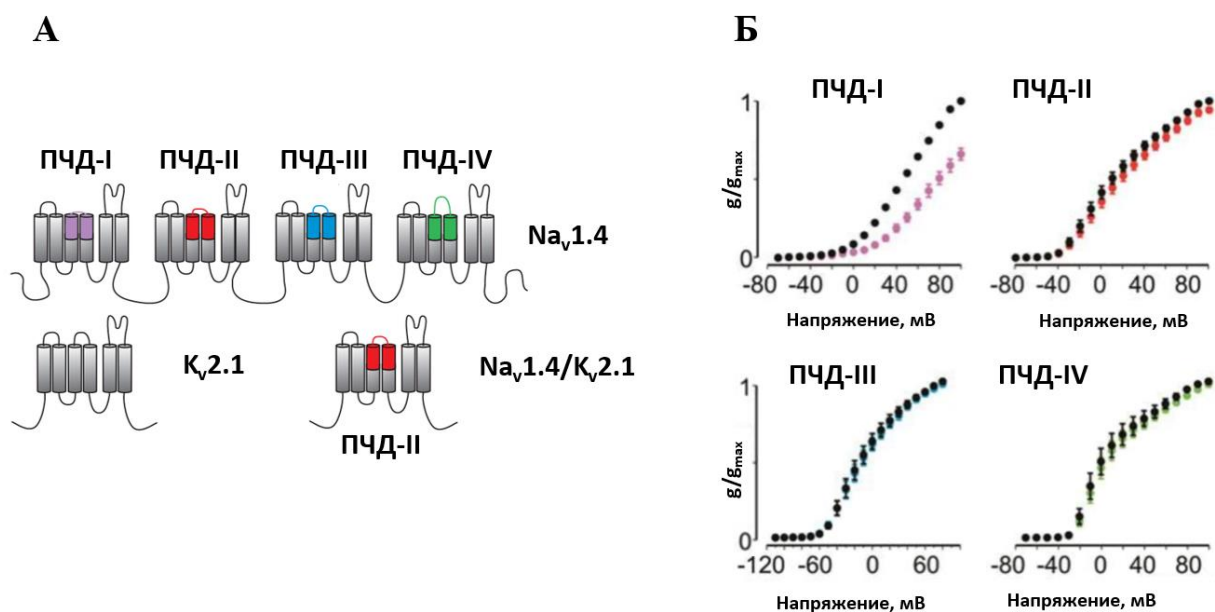


Рисунок 28. А. Схема эксперимента по связыванию Hm-3 с ПЧД разных псевдосубъединиц Na_v. Адаптировано из [300]. Б. Относительная проводимость каналов K_v2.1, в которые была пересажены петли различных ПЧД Na_v1.4 в контроле (черные кружочки) и при аппликации 1,5 мкМ Hm-3 (цветные кружочки).

Далее совместно с группой структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН с помощью метода ЯМР мы проанализировали связывание Hm-3 с ПЧД-I Na_v1.4. Титрование образца ¹⁵N-Hm-3 раствором немеченого ПЧД-I позволило установить, что токсин взаимодействует с каналом с помощью остатков, расположенных в антипараллельном β-листе (остатки С23–K28 и L31–I33) и остатков W11 и F12, участвующих во взаимодействии токсина с мицеллами (Рисунок 29). В свою очередь, путем титрования образца ПЧД-I в нанодисках токсином было показано, что Hm-3 связывается с внешней половиной спирали S3 ПЧД-I (S3b, остатки S199–T207) и С-концом петли S3–S4 (остатки L212–I215), причем комплекс токсин-канал стабилизируется, по-видимому, за счет формирования:

- солевых мостиков между остатками K24 и K28 токсина и E208 и D211 канала, соответственно;
- 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;

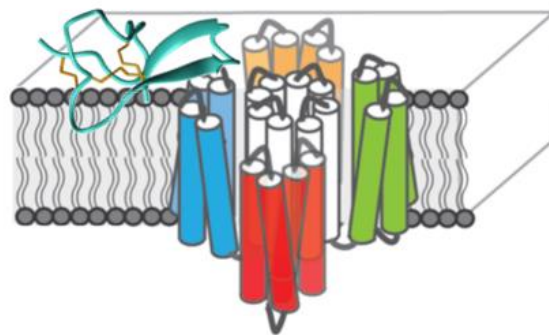


Рисунок 29 Модель связывания Hm-3 с Na_v.

- гидрофобного взаимодействия между I33 и V35 токсина и F209 канала.

Полученные данные вполне вписываются в предполагаемый механизм действия ингибиторов активации Na_v , мембрано-опосредованный захват сенсора потенциала: Hm-3, по-видимому, также связывается с липидной мембраной и далее дрейфует до встречи с каналом, с которым взаимодействует с помощью антипараллельного β -листа и нескольких остатков, лежащих в толще мембраны. Отличие же заключается в том, что Hm-3 взаимодействует с ПЧД псевдосубъединицы I, в то время как основным сайтом для других ингибиторов активации Na_v является ПЧД псевдосубъединицы II.

Ингибиторы активации Na_v – потенциальные лекарства от гипокалиемического периодического паралича

Патомеханизмом ряда мышечных каналопатий являются токи, проходящие через ПЧД (так называемые ω -токи; см. Обзор литературы, раздел «Нервно-мышечные расстройства») [135]. Одним из таких заболеваний является гипокалиемический периодический паралич, возникающий в результате мутаций положительно заряженных остатков в сенсоре потенциала мышечной изоформы потенциал-чувствительных натриевых каналов $Na_v1.4$ [134, 135]. Поскольку сайтом связывания ингибиторов активации Na_v является ПЧД $Na_v1.4$, а, в частности, петля S3–S4, мы предположили, что такие молекулы могут обладать способностью ингибировать ω -токи.

Для проверки нашего предположения совместно с отделом молекулярных нейронаук Института неврологии Университетского колледжа Лондона мы провели ряд электрофизиологических экспериментов по воздействию токсина Hm-3 на $Na_v1.4$ с мутациями в сенсоре потенциала. В ходе этих экспериментов определялась способность Hm-3 ингибировать ω -токи в $Na_v1.4$ со следующими мутациями: R219G (R1, ПЧД-I); R222W и R222G (R2, ПЧД-I); R225G (R3, ПЧД-I); R672G (R2, ПЧД-II); R1132Q (R2, ПЧД-III) (R1, R2 и так далее обозначают положительные заряды сенсора потенциала при нумерации с внеклеточной стороны). Стоит отметить, что все мутации, кроме R219G и R225G, были описаны у больных гипокалиемическим периодическим параличом.

Оказалось, что Hm-3 способен ингибировать ω -токи только через те мутантные каналы, в которых мутация находилась в R2 или R3 ПЧД-I (Рисунок 30), причем в концентрации 10 мкМ Hm-3 блокировал ω -токи через $Na_v1.4$ -R222W на $67\pm 5\%$ и $Na_v1.4$ -R222G на $64\pm 5\%$ при -80 мВ. Эти результаты подтверждают предыдущие данные, свидетельствующие о том, что именно ПЧД-I является сайтом связывания Hm-3. Кроме того, они позволяют предположить, что Hm-3 может стать

прототипом лекарственного препарата для лечения гипокалиемического периодического паралича при мутациях R2 и R3 в ПЧД-I.

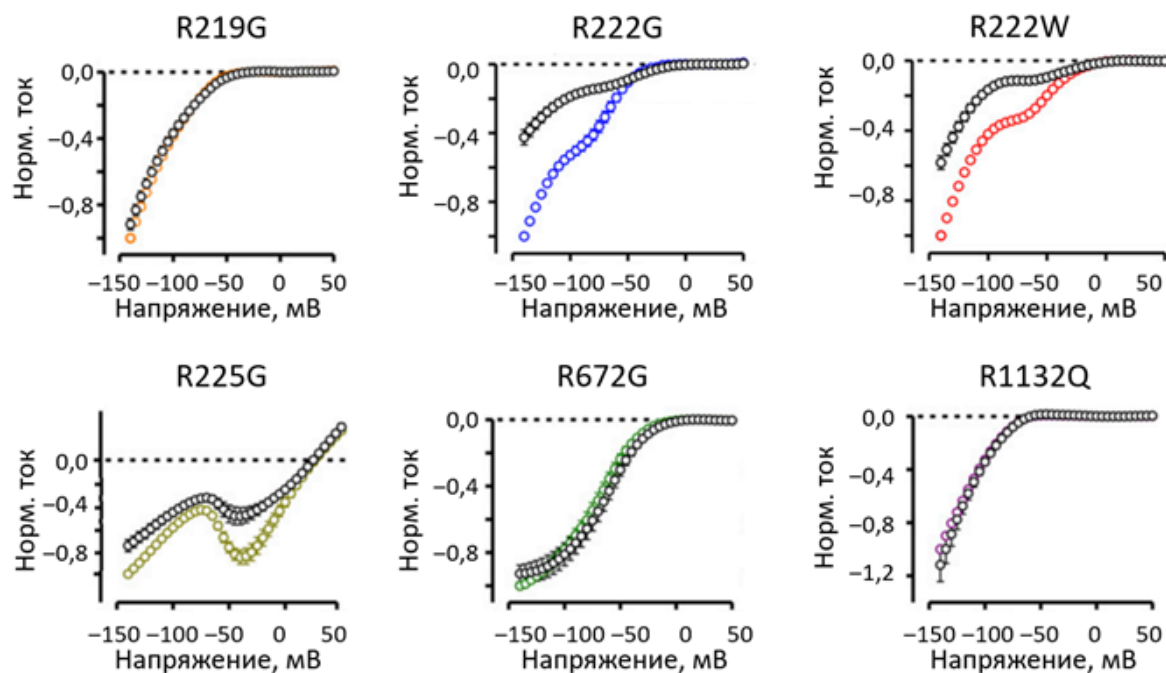


Рисунок 30. ω -Токи через $\text{Na}_v1.4$ с мутациями в сенсорах потенциала в контроле (цветные кружочки) и при приложении 10 мкМ Hm-3 (черные кружочки). Ток через ПД блокирован 1 мкМ тетродотоксином. Для увеличения амплитуды ω -токов эксперимент проводили с использованием гуанидина в омывающем растворе.

Промежуточное заключение

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.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность следующим научным коллективам за научную экспертизу и помощь в проведении экспериментов:

- сотрудникам лаборатории токсикологии и фармакологии Католического университета Лёвена, а особенно Стиву Пейнёру и руководителю лаборатории Яну Титгату, за помощь в проведении электрофизиологических экспериментов;
- сотрудникам лаборатории моделирования биомолекулярных систем ИБХ РАН Антону Чугунову и Анне Коромысловой за помощь в анализе структурных особенностей α -токсинов скорпионов;
- сотруднику лаборатории биомолекулярной ЯМР-спектроскопии ИБХ РАН Константину Минееву за установление пространственной структуры ВеМ9;
- сотрудникам группы структурной биологии ионных каналов ИБХ РАН, а особенно Захару Шенкарёву и Михаилу Мышкину, и группы биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов ИБХ РАН, а особенно Екатерине Люкмановой и Дмитрию Кульбацкому, за установление пространственной структуры Nm-3 и изучение его взаимодействия с мембранами и ПЧД Na_v с помощью ЯМР;
- сотрудникам отдела физиологии и отдела нейронаук университета Джонса Хопкинса, а особенно Фрэнку Босмансу, за изучение сайта связывания Nm-3 с Na_v ;
- сотрудникам центра нервномышечных расстройств Университетского колледжа Лондона, а особенно Роопе Маннико, за изучение влияния Nm-3 на ω -токи в Na_v .

Искренне признательна всему коллективу отдела молекулярной нейробиологии ИБХ РАН за готовность всегда помочь и поддержать словом и делом, а особенно моему научному руководителю, Александру Василевскому, за терпение и научное вдохновение при проведении данного исследования.

Благодарю также Андрея Борисовича Рубина и Александра Габибовича Габибова за ценные советы по подаче материала в диссертационной работе.

Список сокращений

а.о. – аминокислотный остаток,
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография,
ед. акт. – единица активности,
ИППГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид,
МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация,
МПП – молекулярный гидрофобный потенциал,
МД – молекулярная динамика,
ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая ВЭЖХ,
ПД – поровый домен,
ПНК – полинуклеотид киназа,
ПНС – периферическая нервная система,
ПЧД – потенциал-чувствительный домен,
СКО – среднее квадратичное отклонение,
Трис – тригидроксиметиламинометан,
ТФУ – трифторуксусная кислота,
ЦНС – центральная нервная система,
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат натрия,
ЯМР – ядерный магнитный резонанс,
ДНВ – 2,5-дигидроксибензойная кислота,
dNTPs – смесь четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов,
DOPG – 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфо-гас-(1-глицерин),
EC₅₀ – средняя эффективная концентрация,
НЕРЕС – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота,
NaMeS – метансульфонат натрия,
Na_v – потенциал-зависимые натриевые каналы,
LD₅₀ – средняя летальная доза,
MES – 2-(N-Морфолино)этансульфоновая кислота,
POPC – 1-пальмитой-2-олеойл-sn-глицеро-3-фосфохолин,
STX – сакситоксин,
TTX – тетродотоксин.

Список литературы

1. Yarov-Yarovoy, V., et al., *Structural basis for gating charge movement in the voltage sensor of a sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(2): p. E93-102.
2. de Lera Ruiz, M. and R.L. Kraus, *Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications*. Journal of medicinal chemistry, 2015. **58**(18): p. 7093-118.
3. Francis, D.G., et al., *Leaky sodium channels from voltage sensor mutations in periodic paralysis, but not paramyotonia*. Neurology, 2011. **76**(19): p. 1635-41.
4. Cannon, S.C., *Channelopathies of skeletal muscle excitability*. Comprehensive Physiology, 2015. **5**(2): p. 761-90.
5. Goldin, A.L., et al., *Nomenclature of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2000. **28**(2): p. 365-8.
6. Catterall, W.A., *From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2000. **26**(1): p. 13-25.
7. Goldin, A.L., *Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **868**: p. 38-50.
8. Black, J.A. and S.G. Waxman, *Noncanonical roles of voltage-gated sodium channels*. Neuron, 2013. **80**(2): p. 280-91.
9. Gamal El-Din, T.M., et al., *Molecular dissection of multiphase inactivation of the bacterial sodium channel NavAb*. J Gen Physiol, 2019. **151**(2): p. 174-185.
10. Gamal El-Din, T.M., et al., *Fenestrations control resting-state block of a voltage-gated sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(51): p. 13111-13116.
11. Jiang, D., et al., *Structural basis for gating pore current in periodic paralysis*. Nature, 2018. **557**(7706): p. 590-594.
12. Lenaeus, M.J., et al., *Structures of closed and open states of a voltage-gated sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(15): p. E3051-E3060.
13. Payandeh, J., et al., *Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states*. Nature, 2012. **486**(7401): p. 135-9.
14. Payandeh, J., et al., *The crystal structure of a voltage-gated sodium channel*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 353-8.
15. Sula, A., et al., *The complete structure of an activated open sodium channel*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 14205.
16. Wisedchaisri, G., et al., *Resting-State Structure and Gating Mechanism of a Voltage-Gated Sodium Channel*. Cell, 2019. **178**(4): p. 993-1003 e12.
17. Zhang, X., et al., *Crystal structure of an orthologue of the NaChBac voltage-gated sodium channel*. Nature, 2012. **486**(7401): p. 130-4.
18. Ahuja, S., et al., *Structural basis of Nav1.7 inhibition by an isoform-selective small-molecule antagonist*. Science, 2015. **350**(6267): p. aac5464.
19. Xu, H., et al., *Structural Basis of Nav1.7 Inhibition by a Gating-Modifier Spider Toxin*. Cell, 2019. **176**(4): p. 702-715 e14.
20. Clairfeuille, T., et al., *Structural basis of alpha-scorpion toxin action on Nav channels*. Science, 2019. **363**(6433).
21. Pan, X., et al., *Molecular basis for pore blockade of human Na(+) channel Nav1.2 by the muconotoxin KIIIA*. Science, 2019. **363**(6433): p. 1309-1313.
22. Pan, X., et al., *Structure of the human voltage-gated sodium channel Nav1.4 in complex with beta1*. Science, 2018. **362**(6412).
23. Shen, H., et al., *Structural basis for the modulation of voltage-gated sodium channels by animal toxins*. Science, 2018. **362**(6412).

24. Shen, H., et al., *Structures of human Nav1.7 channel in complex with auxiliary subunits and animal toxins*. Science, 2019. **363**(6433): p. 1303-1308.
25. Shen, H., et al., *Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution*. Science, 2017. **355**(6328).
26. Yan, Z., et al., *Structure of the Nav1.4-beta1 Complex from Electric Eel*. Cell, 2017. **170**(3): p. 470-482 e11.
27. Isom, L.L., et al., *Primary structure and functional expression of the beta 1 subunit of the rat brain sodium channel*. Science, 1992. **256**(5058): p. 839-42.
28. Chahine, M. and M.E. O'Leary, *Regulatory role of voltage-gated Na channel beta subunits in sensory neurons*. Front Pharmacol, 2011. **2**: p. 70.
29. Guy, H.R. and P. Seetharamulu, *Molecular model of the action potential sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(2): p. 508-12.
30. Henriques, S.T., et al., *Interaction of Tarantula Venom Peptide ProTx-II with Lipid Membranes Is a Prerequisite for Its Inhibition of Human Voltage-gated Sodium Channel NaV1.7*. The Journal of biological chemistry, 2016. **291**(33): p. 17049-65.
31. Hille, B., *Ion channels of excitable cells*. third ed. 2001.
32. Noda, M., et al., *Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence*. Nature, 1984. **312**(5990): p. 121-7.
33. Cestele, S., et al., *Structure and function of the voltage sensor of sodium channels probed by a beta-scorpion toxin*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(30): p. 21332-44.
34. Stuhmer, W., et al., *Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel*. Nature, 1989. **339**(6226): p. 597-603.
35. Rohl, C.A., et al., *Solution structure of the sodium channel inactivation gate*. Biochemistry, 1999. **38**(3): p. 855-61.
36. Kellenberger, S., et al., *Molecular analysis of potential hinge residues in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels*. J Gen Physiol, 1997. **109**(5): p. 607-17.
37. Kellenberger, S., et al., *Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels*. J Gen Physiol, 1997. **109**(5): p. 589-605.
38. Kellenberger, S., T. Scheuer, and W.A. Catterall, *Movement of the Na⁺ channel inactivation gate during inactivation*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(48): p. 30971-9.
39. Kontis, K.J. and A.L. Goldin, *Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positive charges*. J Gen Physiol, 1997. **110**(4): p. 403-13.
40. Chen, L.Q., et al., *A unique role for the S4 segment of domain 4 in the inactivation of sodium channels*. J Gen Physiol, 1996. **108**(6): p. 549-56.
41. Kontis, K.J., A. Rounaghi, and A.L. Goldin, *Sodium channel activation gating is affected by substitutions of voltage sensor positive charges in all four domains*. J Gen Physiol, 1997. **110**(4): p. 391-401.
42. Chiamvimonvat, N., et al., *Depth asymmetries of the pore-lining segments of the Na⁺ channel revealed by cysteine mutagenesis*. Neuron, 1996. **16**(5): p. 1037-47.
43. Lipkind, G.M. and H.A. Fozzard, *Voltage-gated Na channel selectivity: the role of the conserved domain III lysine residue*. J Gen Physiol, 2008. **131**(6): p. 523-9.
44. Favre, I., E. Moczydlowski, and L. Schild, *On the structural basis for ionic selectivity among Na⁺, K⁺, and Ca²⁺ in the voltage-gated sodium channel*. Biophys J, 1996. **71**(6): p. 3110-25.
45. Schlieff, T., et al., *Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain*. Eur Biophys J, 1996. **25**(2): p. 75-91.
46. Chen, C., et al., *Identification of the cysteine residue responsible for disulfide linkage of Na⁺ channel alpha and beta2 subunits*. The Journal of biological chemistry, 2012. **287**(46): p. 39061-9.

47. Isom, L.L., et al., *Structure and function of the beta 2 subunit of brain sodium channels, a transmembrane glycoprotein with a CAM motif*. Cell, 1995. **83**(3): p. 433-42.
48. Yu, F.H., et al., *Sodium channel beta4, a new disulfide-linked auxiliary subunit with similarity to beta2*. J Neurosci, 2003. **23**(20): p. 7577-85.
49. Namadurai, S., et al., *Crystal structure and molecular imaging of the Nav channel beta3 subunit indicates a trimeric assembly*. The Journal of biological chemistry, 2014. **289**(15): p. 10797-811.
50. Namadurai, S., et al., *A new look at sodium channel beta subunits*. Open biology, 2015. **5**(1): p. 140192.
51. Malhotra, J.D., et al., *Sodium channel beta subunits mediate homophilic cell adhesion and recruit ankyrin to points of cell-cell contact*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(15): p. 11383-8.
52. Shcherbatko, A., et al., *Voltage-dependent sodium channel function is regulated through membrane mechanics*. Biophys J, 1999. **77**(4): p. 1945-59.
53. Peters, C.H. and P.C. Ruben, *Introduction to sodium channels*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **221**: p. 1-6.
54. Armstrong, C.M. and F. Bezanilla, *Currents related to movement of the gating particles of the sodium channels*. Nature, 1973. **242**(5398): p. 459-61.
55. Hirschberg, B., et al., *Transfer of twelve charges is needed to open skeletal muscle Na⁺ channels*. J Gen Physiol, 1995. **106**(6): p. 1053-68.
56. Yang, N. and R. Horn, *Evidence for voltage-dependent S4 movement in sodium channels*. Neuron, 1995. **15**(1): p. 213-8.
57. Yang, N., A.L. George, Jr., and R. Horn, *Molecular basis of charge movement in voltage-gated sodium channels*. Neuron, 1996. **16**(1): p. 113-22.
58. Keynes, R.D. and F. Elinder, *The screw-helical voltage gating of ion channels*. Proceedings. Biological sciences, 1999. **266**(1421): p. 843-52.
59. Yusaf, S.P., D. Wray, and A. Sivaprasadarao, *Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel*. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 1996. **433**(1-2): p. 91-7.
60. Toib, A., V. Lyakhov, and S. Marom, *Interaction between duration of activity and time course of recovery from slow inactivation in mammalian brain Na⁺ channels*. J Neurosci, 1998. **18**(5): p. 1893-903.
61. Capes, D.L., et al., *Domain IV voltage-sensor movement is both sufficient and rate limiting for fast inactivation in sodium channels*. J Gen Physiol, 2013. **142**(2): p. 101-12.
62. Chanda, B. and F. Bezanilla, *Tracking voltage-dependent conformational changes in skeletal muscle sodium channel during activation*. J Gen Physiol, 2002. **120**(5): p. 629-45.
63. Goldschen-Ohm, M.P., et al., *Multiple pore conformations driven by asynchronous movements of voltage sensors in a eukaryotic sodium channel*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1350.
64. Ahern, C.A., et al., *The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy*. J Gen Physiol, 2016. **147**(1): p. 1-24.
65. Wang, S.Y., et al., *Tryptophan scanning of DIS6 and D4S6 C-termini in voltage-gated sodium channels*. Biophys J, 2003. **85**(2): p. 911-20.
66. McPhee, J.C., et al., *A critical role for transmembrane segment IVS6 of the sodium channel alpha subunit in fast inactivation*. The Journal of biological chemistry, 1995. **270**(20): p. 12025-34.
67. Smith, M.R. and A.L. Goldin, *Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5*. Biophys J, 1997. **73**(4): p. 1885-95.

68. McPhee, J.C., et al., *A critical role for the S4-S5 intracellular loop in domain IV of the sodium channel alpha-subunit in fast inactivation*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(2): p. 1121-9.
69. Silva, J., *Slow inactivation of Na(+) channels*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **221**: p. 33-49.
70. Balser, J.R., et al., *External pore residue mediates slow inactivation in mu 1 rat skeletal muscle sodium channels*. J Physiol, 1996. **494** (Pt 2): p. 431-42.
71. Kambouris, N.G., et al., *Mechanistic link between lidocaine block and inactivation probed by outer pore mutations in the rat micro1 skeletal muscle sodium channel*. J Physiol, 1998. **512** (Pt 3): p. 693-705.
72. O'Reilly, J.P., S.Y. Wang, and G.K. Wang, *Residue-specific effects on slow inactivation at V787 in D2-S6 of Na(v)1.4 sodium channels*. Biophys J, 2001. **81**(4): p. 2100-11.
73. Ong, B.H., G.F. Tomaselli, and J.R. Balser, *A structural rearrangement in the sodium channel pore linked to slow inactivation and use dependence*. J Gen Physiol, 2000. **116**(5): p. 653-62.
74. Vedantham, V. and S.C. Cannon, *Rapid and slow voltage-dependent conformational changes in segment IVS6 of voltage-gated Na(+) channels*. Biophys J, 2000. **78**(6): p. 2943-58.
75. Xiong, W., et al., *A conserved ring of charge in mammalian Na+ channels: a molecular regulator of the outer pore conformation during slow inactivation*. J Physiol, 2006. **576**(Pt 3): p. 739-54.
76. Bendahhou, S., et al., *Impairment of slow inactivation as a common mechanism for periodic paralysis in DIIS4-S5*. Neurology, 2002. **58**(8): p. 1266-72.
77. Hayward, L.J., G.M. Sandoval, and S.C. Cannon, *Defective slow inactivation of sodium channels contributes to familial periodic paralysis*. Neurology, 1999. **52**(7): p. 1447-53.
78. Brancati, F., et al., *Severe infantile hyperkalaemic periodic paralysis and paramyotonia congenita: broadening the clinical spectrum associated with the T704M mutation in SCN4A*. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 2003. **74**(9): p. 1339-41.
79. Cummins, T.R. and F.J. Sigworth, *Impaired slow inactivation in mutant sodium channels*. Biophys J, 1996. **71**(1): p. 227-36.
80. Webb, J. and S.C. Cannon, *Cold-induced defects of sodium channel gating in atypical periodic paralysis plus myotonia*. Neurology, 2008. **70**(10): p. 755-61.
81. Capes, D.L., et al., *Gating transitions in the selectivity filter region of a sodium channel are coupled to the domain IV voltage sensor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(7): p. 2648-53.
82. Silva, J.R. and S.A. Goldstein, *Voltage-sensor movements describe slow inactivation of voltage-gated sodium channels I: wild-type skeletal muscle Na(V)1.4*. J Gen Physiol, 2013. **141**(3): p. 309-21.
83. Townsend, C. and R. Horn, *Effect of alkali metal cations on slow inactivation of cardiac Na+ channels*. J Gen Physiol, 1997. **110**(1): p. 23-33.
84. Featherstone, D.E., J.E. Richmond, and P.C. Ruben, *Interaction between fast and slow inactivation in Skm1 sodium channels*. Biophys J, 1996. **71**(6): p. 3098-109.
85. McCollum, I.J., et al., *Negatively charged residues adjacent to IFM motif in the DIII-DIV linker of hNa(V)1.4 differentially affect slow inactivation*. FEBS letters, 2003. **552**(2-3): p. 163-9.
86. Richmond, J.E., et al., *Slow inactivation in human cardiac sodium channels*. Biophys J, 1998. **74**(6): p. 2945-52.
87. Kontis, K.J. and A.L. Goldin, *Sodium channel inactivation is altered by substitution of voltage sensor positive charges*. The Journal of general physiology, 1997. **110**(4): p. 403-13.
88. Vilin, Y.Y., et al., *Structural determinants of slow inactivation in human cardiac and skeletal muscle sodium channels*. Biophys J, 1999. **77**(3): p. 1384-93.

89. Webb, J., F.F. Wu, and S.C. Cannon, *Slow inactivation of the Nav1.4 sodium channel in mammalian cells is impeded by co-expression of the beta1 subunit*. Pflugers Archiv : European journal of physiology, 2009. **457**(6): p. 1253-63.
90. Dichgans, M., et al., *Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine*. Lancet, 2005. **366**(9483): p. 371-7.
91. Smith, K.J., *Sodium channels and multiple sclerosis: roles in symptom production, damage and therapy*. Brain pathology, 2007. **17**(2): p. 230-42.
92. Hoeijmakers, J.G., et al., *Channelopathies, painful neuropathy, and diabetes: which way does the causal arrow point?* Trends in molecular medicine, 2014. **20**(10): p. 544-50.
93. Carr, M.J., *Regulation of cough and action potentials by voltage-gated Na channels*. Pulmonary pharmacology & therapeutics, 2013. **26**(5): p. 508-9.
94. Sanders, S.J., et al., *De novo mutations revealed by whole-exome sequencing are strongly associated with autism*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 237-41.
95. Schmunk, G. and J.J. Gargus, *Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders*. Frontiers in genetics, 2013. **4**: p. 222.
96. Besson, P., et al., *How do voltage-gated sodium channels enhance migration and invasiveness in cancer cells?* Biochimica et biophysica acta, 2015. **1848**(10 Pt B): p. 2493-501.
97. Eijkelkamp, N., et al., *Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels*. Brain : a journal of neurology, 2012. **135**(Pt 9): p. 2585-612.
98. Basbaum, A.I., et al., *Cellular and molecular mechanisms of pain*. Cell, 2009. **139**(2): p. 267-84.
99. Bennett, D.L. and C.G. Woods, *Painful and painless channelopathies*. The Lancet. Neurology, 2014. **13**(6): p. 587-99.
100. Cox, J.J., et al., *An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain*. Nature, 2006. **444**(7121): p. 894-8.
101. Leipold, E., et al., *A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception*. Nature genetics, 2013. **45**(11): p. 1399-404.
102. Nassar, M.A., et al., *Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(34): p. 12706-11.
103. Weiss, J., et al., *Loss-of-function mutations in sodium channel Nav1.7 cause anosmia*. Nature, 2011. **472**(7342): p. 186-90.
104. Akopian, A.N., et al., *The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways*. Nature neuroscience, 1999. **2**(6): p. 541-8.
105. Faber, C.G., et al., *Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(47): p. 19444-9.
106. Bierhaus, A., et al., *Methylglyoxal modification of Nav1.8 facilitates nociceptive neuron firing and causes hyperalgesia in diabetic neuropathy*. Nature medicine, 2012. **18**(6): p. 926-33.
107. Hains, B.C., et al., *Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury*. J Neurosci, 2003. **23**(26): p. 8881-92.
108. Catterall, W.A., *Sodium channels, inherited epilepsy, and antiepileptic drugs*. Annual review of pharmacology and toxicology, 2014. **54**: p. 317-38.
109. Litan, A. and S.A. Langhans, *Cancer as a channelopathy: ion channels and pumps in tumor development and progression*. Frontiers in cellular neuroscience, 2015. **9**: p. 86.
110. Schwab, A. and C. Stock, *Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion*. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 2014. **369**(1638): p. 20130102.

111. Brackenbury, W.J., *Voltage-gated sodium channels and metastatic disease*. Channels, 2012. **6**(5): p. 352-61.
112. Fraser, S.P., et al., *Voltage-gated sodium channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis*. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research, 2005. **11**(15): p. 5381-9.
113. Gao, R., et al., *Expression of voltage-gated sodium channel alpha subunit in human ovarian cancer*. Oncology reports, 2010. **23**(5): p. 1293-9.
114. O'Malley, H.A. and L.L. Isom, *Sodium channel beta subunits: emerging targets in channelopathies*. Annual review of physiology, 2015. **77**: p. 481-504.
115. Roger, S., P. Besson, and J.Y. Le Guennec, *Involvement of a novel fast inward sodium current in the invasion capacity of a breast cancer cell line*. Biochimica et biophysica acta, 2003. **1616**(2): p. 107-11.
116. Yang, M., et al., *Therapeutic potential for phenytoin: targeting Na(v)1.5 sodium channels to reduce migration and invasion in metastatic breast cancer*. Breast cancer research and treatment, 2012. **134**(2): p. 603-15.
117. Lastraioli, E., J. Iorio, and A. Arcangeli, *Ion channel expression as promising cancer biomarker*. Biochimica et biophysica acta, 2015. **1848**(10 Pt B): p. 2685-702.
118. Zaklyazminskaya, E. and S. Dzemeshevich, *The role of mutations in the SCN5A gene in cardiomyopathies*. Biochimica et biophysica acta, 2016. **1863**(7 Pt B): p. 1799-805.
119. Remme, C.A., *Cardiac sodium channelopathy associated with SCN5A mutations: electrophysiological, molecular and genetic aspects*. J Physiol, 2013. **591**(17): p. 4099-116.
120. Brugada, P., *Brugada syndrome: More than 20 years of scientific excitement*. Journal of cardiology, 2016. **67**(3): p. 215-20.
121. Sieira, J., G. Dendramis, and P. Brugada, *Pathogenesis and management of Brugada syndrome*. Nature reviews. Cardiology, 2016. **13**(12): p. 744-756.
122. McNair, W.P., et al., *SCN5A mutations associate with arrhythmic dilated cardiomyopathy and commonly localize to the voltage-sensing mechanism*. Journal of the American College of Cardiology, 2011. **57**(21): p. 2160-8.
123. Zaytseva, A.K., et al., *Characterization of a novel SCN5A genetic variant A1294G associated with mixed clinical phenotype*. Biochem Biophys Res Commun, 2019. **516**(3): p. 777-783.
124. Gosselin-Badaroudine, P., et al., *A proton leak current through the cardiac sodium channel is linked to mixed arrhythmia and the dilated cardiomyopathy phenotype*. PloS one, 2012. **7**(5): p. e38331.
125. Kubota, T., et al., *A mutation in a rare type of intron in a sodium-channel gene results in aberrant splicing and causes myotonia*. Human mutation, 2011. **32**(7): p. 773-82.
126. Horga, A., et al., *Prevalence study of genetically defined skeletal muscle channelopathies in England*. Neurology, 2013. **80**(16): p. 1472-5.
127. Yang, N., et al., *Sodium channel mutations in paramyotonia congenita exhibit similar biophysical phenotypes in vitro*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(26): p. 12785-9.
128. McClatchey, A.I., et al., *Novel mutations in families with unusual and variable disorders of the skeletal muscle sodium channel*. Nature genetics, 1992. **2**(2): p. 148-52.
129. Heatwole, C.R., J.M. Statland, and E.L. Logigian, *The diagnosis and treatment of myotonic disorders*. Muscle & nerve, 2013. **47**(5): p. 632-48.
130. Jurkat-Rott, K. and F. Lehmann-Horn, *Genotype-phenotype correlation and therapeutic rationale in Hyperkalemic periodic paralysis*. Neurotherapeutics, 2007. **4**(2): p. 216-224.
131. Jurkat-Rott, K., et al., *Sodium channelopathies of skeletal muscle result from gain or loss of function*. Pflugers Archiv-European Journal of Physiology, 2010. **460**(2): p. 239-248.

132. Cannon, S.C., R.H. Brown, Jr., and D.P. Corey, *A sodium channel defect in hyperkalemic periodic paralysis: potassium-induced failure of inactivation*. *Neuron*, 1991. **6**(4): p. 619-26.
133. Fontaine, B., *Periodic paralysis*. *Adv Genet*, 2008. **63**: p. 3-23.
134. Matthews, E., et al., *Voltage sensor charge loss accounts for most cases of hypokalemic periodic paralysis*. *Neurology*, 2009. **72**(18): p. 1544-7.
135. Sokolov, S., T. Scheuer, and W.A. Catterall, *Gating pore current in an inherited ion channelopathy*. *Nature*, 2007. **446**(7131): p. 76-8.
136. Mi, W., V. Rybalchenko, and S.C. Cannon, *Disrupted coupling of gating charge displacement to Na⁺ current activation for DIIS4 mutations in hypokalemic periodic paralysis*. *J Gen Physiol*, 2014. **144**(2): p. 137-45.
137. Struyk, A.F. and S.C. Cannon, *A Na⁺ channel mutation linked to hypokalemic periodic paralysis exposes a proton-selective gating pore*. *J Gen Physiol*, 2007. **130**(1): p. 11-20.
138. Sokolov, S., T. Scheuer, and W.A. Catterall, *Depolarization-activated gating pore current conducted by mutant sodium channels in potassium-sensitive normokalemic periodic paralysis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. **105**(50): p. 19980-5.
139. Catterall, W.A., *Membrane potential-dependent binding of scorpion toxin to the action potential Na⁺ ionophore. Studies with a toxin derivative prepared by lactoperoxidase-catalyzed iodination*. *The Journal of biological chemistry*, 1977. **252**(23): p. 8660-8.
140. Catterall, W.A., *Activation of the action potential Na⁺ ionophore by neurotoxins. An allosteric model*. *The Journal of biological chemistry*, 1977. **252**(23): p. 8669-76.
141. Catterall, W.A., *Neurotoxins that act on voltage-sensitive sodium channels in excitable membranes*. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 1980. **20**: p. 15-43.
142. Fuhrman, F.A., *Tetrodotoxin. It is a powerful poison that is found in two almost totally unrelated kinds of animal: puffer fish and newts. It has been serving as a tool in nerve physiology and may provide a model for new local anesthetics*. *Sci Am*, 1967. **217**(2): p. 60-71.
143. Yasumoto, T., et al., *Interspecies distribution and possible origin of tetrodotoxin*. *Ann N Y Acad Sci*, 1986. **479**: p. 44-51.
144. Mebs, D. and K. Schmidt, *Occurrence of tetrodotoxin in the frog *Atelopus oxyrhynchus**. *Toxicon*, 1989. **27**(7): p. 819-22.
145. Schantz, E.J., *Chemistry and biology of saxitoxin and related toxins*. *Ann N Y Acad Sci*, 1986. **479**: p. 15-23.
146. Smith, F.M., et al., *First report of saxitoxin production by a species of the freshwater benthic cyanobacterium, *Scytonema Agardh**. *Toxicon*, 2011. **57**(4): p. 566-73.
147. Penzotti, J.L., et al., *Differences in saxitoxin and tetrodotoxin binding revealed by mutagenesis of the Na⁺ channel outer vestibule*. *Biophys J*, 1998. **75**(6): p. 2647-57.
148. Terlau, H., et al., *Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II*. *FEBS letters*, 1991. **293**(1-2): p. 93-6.
149. Heinemann, S.H., H. Terlau, and K. Imoto, *Molecular basis for pharmacological differences between brain and cardiac sodium channels*. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 1992. **422**(1): p. 90-2.
150. Satin, J., et al., *A mutant of TTX-resistant cardiac sodium channels with TTX-sensitive properties*. *Science*, 1992. **256**(5060): p. 1202-5.
151. Santarelli, V.P., et al., *A cation- π interaction discriminates among sodium channels that are either sensitive or resistant to tetrodotoxin block*. *The Journal of biological chemistry*, 2007. **282**(11): p. 8044-51.
152. Fozzard, H.A. and G.M. Lipkind, *The tetrodotoxin binding site is within the outer vestibule of the sodium channel*. *Marine drugs*, 2010. **8**(2): p. 219-34.

153. Sato, S., et al., *The amino acid sequences of homologous hydroxyproline-containing myotoxins from the marine snail Conus geographus venom*. FEBS letters, 1983. **155**(2): p. 277-80.
154. Cruz, L.J., et al., *Conus geographus toxins that discriminate between neuronal and muscle sodium channels*. The Journal of biological chemistry, 1985. **260**(16): p. 9280-8.
155. Chang, N.S., et al., *Predominant interactions between mu-conotoxin Arg-13 and the skeletal muscle Na⁺ channel localized by mutant cycle analysis*. Biochemistry, 1998. **37**(13): p. 4407-19.
156. Becker, S., et al., *Action of derivatives of mu-conotoxin GIIIA on sodium channels. Single amino acid substitutions in the toxin separately affect association and dissociation rates*. Biochemistry, 1992. **31**(35): p. 8229-38.
157. Zhang, M.M., et al., *Synergistic and antagonistic interactions between tetrodotoxin and mu-conotoxin in blocking voltage-gated sodium channels*. Channels, 2009. **3**(1): p. 32-8.
158. Martin-Moutot, N., et al., *Phoneutria nigriventer toxin I: a novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with micro conotoxin binding sites*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(6): p. 1931-7.
159. Silva, A.O., et al., *Inhibitory effect of the recombinant Phoneutria nigriventer Tx1 toxin on voltage-gated sodium channels*. Biochimie, 2012. **94**(12): p. 2756-63.
160. Huang, P., et al., *The activation effect of hainantoxin-I, a peptide toxin from the Chinese spider, Ornithoctonus hainana, on intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels*. Toxins (Basel), 2014. **6**(8): p. 2568-79.
161. Li, D., et al., *Function and solution structure of hainantoxin-I, a novel insect sodium channel inhibitor from the Chinese bird spider Selenocosmia hainana*. FEBS letters, 2003. **555**(3): p. 616-22.
162. Bende, N.S., et al., *The insecticidal spider toxin SFII is a knottin peptide that blocks the pore of insect voltage-gated sodium channels via a large beta-hairpin loop*. FEBS J, 2015. **282**(5): p. 904-20.
163. Peng, K., et al., *Function and solution structure of huwentoxin-IV, a potent neuronal tetrodotoxin (TTX)-sensitive sodium channel antagonist from Chinese bird spider Selenocosmia huwena*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(49): p. 47564-71.
164. Xiao, Y., et al., *Tarantula huwentoxin-IV inhibits neuronal sodium channels by binding to receptor site 4 and trapping the domain ii voltage sensor in the closed configuration*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(40): p. 27300-13.
165. Wang, S.Y. and G.K. Wang, *Point mutations in segment I-S6 render voltage-gated Na⁺ channels resistant to batrachotoxin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(5): p. 2653-8.
166. Wang, S.Y. and G.K. Wang, *Batrachotoxin-resistant Na⁺ channels derived from point mutations in transmembrane segment D4-S6*. Biophys J, 1999. **76**(6): p. 3141-9.
167. Wang, S.Y., M. Barile, and G.K. Wang, *Disparate role of Na⁽⁺⁾ channel D2-S6 residues in batrachotoxin and local anesthetic action*. Mol Pharmacol, 2001. **59**(5): p. 1100-7.
168. Wang, S.Y., C. Nau, and G.K. Wang, *Residues in Na⁽⁺⁾ channel D3-S6 segment modulate both batrachotoxin and local anesthetic affinities*. Biophys J, 2000. **79**(3): p. 1379-87.
169. Ulbricht, W., *Effects of veratridine on sodium currents and fluxes*. Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology, 1998. **133**: p. 1-54.
170. Kimura, T., et al., *Novel site on sodium channel alpha-subunit responsible for the differential sensitivity of grayanotoxin in skeletal and cardiac muscle*. Mol Pharmacol, 2001. **60**(4): p. 865-72.
171. Wright, S.N., *Comparison of aconitine-modified human heart (hH1) and rat skeletal (mu1) muscle Na⁺ channels: an important role for external Na⁺ ions*. J Physiol, 2002. **538**(Pt 3): p. 759-71.
172. Khodorov, B.I., *Batrachotoxin as a tool to study voltage-sensitive sodium channels of excitable membranes*. Progress in biophysics and molecular biology, 1985. **45**(2): p. 57-148.

173. Dumbacher, J.P., T.F. Spande, and J.W. Daly, *Batrachotoxin alkaloids from passerine birds: a second toxic bird genus (Ifrita kowaldi) from New Guinea*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(24): p. 12970-5.
174. Cao, Z., W.H. Gerwick, and T.F. Murray, *Antillatoxin is a sodium channel activator that displays unique efficacy in heterologously expressed rNav1.2, rNav1.4 and rNav1.5 alpha subunits*. BMC neuroscience, 2010. **11**: p. 154.
175. Pereira, A., et al., *Hoiamide a, a sodium channel activator of unusual architecture from a consortium of two papua new Guinea cyanobacteria*. Chemistry & biology, 2009. **16**(8): p. 893-906.
176. Du, Y., et al., *Identification of new batrachotoxin-sensing residues in segment IIIS6 of the sodium channel*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(15): p. 13151-60.
177. Tikhonov, D.B. and B.S. Zhorov, *Sodium channel activators: model of binding inside the pore and a possible mechanism of action*. FEBS letters, 2005. **579**(20): p. 4207-12.
178. Tikhonov, D.B., *Mechanisms of action of ligands of potential-dependent sodium channels*. Neurosci Behav Physiol, 2008. **38**(5): p. 461-9.
179. Wang, G.K., C. Quan, and S.Y. Wang, *Local anesthetic block of batrachotoxin-resistant muscle Na⁺ channels*. Mol Pharmacol, 1998. **54**(2): p. 389-96.
180. Du, Y., et al., *Identification of new batrachotoxin-sensing residues in segment IIIS6 of the sodium channel*. J Biol Chem, 2011. **286**(15): p. 13151-60.
181. Linford, N.J., et al., *Interaction of batrachotoxin with the local anesthetic receptor site in transmembrane segment IVS6 of the voltage-gated sodium channel*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(23): p. 13947-52.
182. Trainer, V.L., G.B. Brown, and W.A. Catterall, *Site of covalent labeling by a photoreactive batrachotoxin derivative near transmembrane segment IS6 of the sodium channel alpha subunit*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(19): p. 11261-7.
183. Tikhonov, D.B. and B.S. Zhorov, *Sodium channel activators: model of binding inside the pore and a possible mechanism of action*. FEBS Lett, 2005. **579**(20): p. 4207-12.
184. Kimura, T., et al., *On site of action of grayanotoxin in domain 4 segment 6 of rat skeletal muscle sodium channel*. FEBS letters, 2000. **465**(1): p. 18-22.
185. Ishii, H., et al., *Point-mutations related to the loss of batrachotoxin binding abolish the grayanotoxin effect in Na(+) channel isoforms*. Jpn J Physiol, 1999. **49**(5): p. 457-61.
186. Campos, F.V., et al., *Alpha-scorpion toxin impairs a conformational change that leads to fast inactivation of muscle sodium channels*. J Gen Physiol, 2008. **132**(2): p. 251-63.
187. Kopeyan, C., et al., *Disulfide bonds of toxin II of the scorpion Androctonus australis Hector*. Eur J Biochem, 1974. **47**(3): p. 483-9.
188. Rochat, H., P. Bernard, and F. Couraud, *Scorpion toxins: chemistry and mode of action*. Adv Cytopharmacol, 1979. **3**: p. 325-34.
189. Gordon, D., et al., *The differential preference of scorpion alpha-toxins for insect or mammalian sodium channels: implications for improved insect control*. Toxicon, 2007. **49**(4): p. 452-72.
190. Rodriguez de la Vega, R.C. and L.D. Possani, *Overview of scorpion toxins specific for Na⁺ channels and related peptides: biodiversity, structure-function relationships and evolution*. Toxicon, 2005. **46**(8): p. 831-44.
191. Gordon, D., et al., *Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(14): p. 8034-45.
192. Loret, E.P., et al., *An anti-insect toxin purified from the scorpion Androctonus australis Hector also acts on the alpha- and beta-sites of the mammalian sodium channel: sequence and circular dichroism study*. Biochemistry, 1991. **30**(3): p. 633-40.

193. Alami, M., et al., *Characterization of Amm VIII from Androctonus mauretanicus mauretanicus: a new scorpion toxin that discriminates between neuronal and skeletal sodium channels*. *Biochem J*, 2003. **375**(Pt 3): p. 551-60.
194. Benkhadir, K., et al., *Molecular cloning and functional expression of the alpha-scorpion toxin BotIII: pivotal role of the C-terminal region for its interaction with voltage-dependent sodium channels*. *Peptides*, 2004. **25**(2): p. 151-61.
195. Weinberger, H., et al., *Positions under positive selection--key for selectivity and potency of scorpion alpha-toxins*. *Mol Biol Evol*, 2010. **27**(5): p. 1025-34.
196. Sautiere, P., et al., *New toxins acting on sodium channels from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* suggest a clue to mammalian vs insect selectivity*. *Toxicon*, 1998. **36**(8): p. 1141-54.
197. Li, H.M., et al., *A series of bioactivity-variant neurotoxins from scorpion *Buthus martensii* Karsch: purification, crystallization and crystallographic analysis*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 1999. **55**(Pt 1): p. 341-4.
198. Cologna, C.T., et al., *Investigation of the relationship between the structure and function of Ts2, a neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom*. *FEBS J*, 2012. **279**(8): p. 1495-504.
199. Pucca, M.B., et al., *Revealing the Function and the Structural Model of Ts4: Insights into the "Non-Toxic" Toxin from *Tityus serrulatus* Venom*. *Toxins (Basel)*, 2015. **7**(7): p. 2534-50.
200. Krimm, I., et al., *NMR structures and activity of a novel alpha-like toxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus**. *J Mol Biol*, 1999. **285**(4): p. 1749-63.
201. Borchani, L., et al., *Purification, structure and activity of three insect toxins from *Buthus occitanus tunetanus* venom*. *Toxicon*, 1997. **35**(3): p. 365-82.
202. Bouhaouala-Zahar, B., et al., *A recombinant insect-specific alpha-toxin of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion confers protection against homologous mammal toxins*. *Eur J Biochem*, 1996. **238**(3): p. 653-60.
203. Arnon, T., et al., *BjalphaIT: a novel scorpion alpha-toxin selective for insects--unique pharmacological tool*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2005. **35**(3): p. 187-95.
204. Wu, H.M., et al., *Purification, characterization and structural study of the neuro-peptides from scorpion *Buthus martensii* Karsch*. *Pure and Applied Chemistry*, 1999. **71**(6): p. 1157-1162.
205. Zhu, S., et al., *Evolutionary diversification of *Mesobuthus* alpha-scorpion toxins affecting sodium channels*. *Mol Cell Proteomics*, 2012. **11**(1): p. M111 012054.
206. Little, M.J., et al., *Delta-atracotoxins from Australian funnel-web spiders compete with scorpion alpha-toxin binding on both rat brain and insect sodium channels*. *FEBS letters*, 1998. **439**(3): p. 246-52.
207. Gordon, D., et al., *Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(14): p. 8034-45.
208. Hamon, A., et al., *Characterization of scorpion alpha-like toxin group using two new toxins from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus**. *Eur J Biochem*, 2002. **269**(16): p. 3920-33.
209. Houming Wu, G.W., Xiaolin Huang, Fahu He, Shaokai Jiang, *Purification, characterization and structural study of the neuro-peptides from scorpion *Buthus martensii* Karsch*. *Pure Appl. Chem.*, 1999. **71**(6): p. 1157-1162.
210. Ye, X., et al., *Structural basis for the voltage-gated Na⁺ channel selectivity of the scorpion alpha-like toxin *BmK MI**. *J Mol Biol*, 2005. **353**(4): p. 788-803.
211. Luo, M.J., et al., *Purification and sequence determination of a new neutral mammalian neurotoxin from the scorpion *Buthus martensii* Karsch*. *Toxicon*, 1997. **35**(5): p. 723-31.
212. Cao, Z.Y., et al., *Purification and characterization of a new peptide with analgesic effect from the scorpion *Buthus martensii* Karch*. *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society*, 2004. **64**(1): p. 33-41.

213. Martin, M.F. and H. Rochat, *Purification of thirteen toxins active on mice from the venom of the North African scorpion Buthus occitanus tunetanus*. Toxicon, 1984. **22**(2): p. 279-91.
214. Corzo, G., E. Villegas, and T. Nakajima, *Isolation and structural characterization of a peptide from the venom of scorpion with toxicity towards invertebrates and vertebrates*. Protein and Peptide Letters, 2001. **8**(5): p. 385-393.
215. Guan, R.J., et al., *Purification, crystallization and initial structural solution of a new alpha-like toxin with cardiac toxicity from scorpion Buthus martensii Karsch*. Protein Pept Lett, 2002. **9**(5): p. 441-9.
216. Ji, Y.H., et al., *Two neurotoxins (BmK I and BmK II) from the venom of the scorpion Buthus martensii Karsch: purification, amino acid sequences and assessment of specific activity*. Toxicon, 1996. **34**(9): p. 987-1001.
217. Chai, Z.F., et al., *Chinese-scorpion (Buthus martensii Karsch) toxin BmK alphaIV, a novel modulator of sodium channels: from genomic organization to functional analysis*. Biochem J, 2006. **399**(3): p. 445-53.
218. Ali, S.A., et al., *Structure-activity relationship of an alpha-toxin Bs-Tx28 from scorpion (Buthus indicus) venom suggests a new alpha-toxin subfamily*. Arch Biochem Biophys, 2006. **445**(1): p. 81-94.
219. Durek, T., et al., *Chemical engineering and structural and pharmacological characterization of the alpha-scorpion toxin ODI*. ACS Chem Biol, 2013. **8**(6): p. 1215-22.
220. Jalali, A., et al., *ODI, the first toxin isolated from the venom of the scorpion Odonthobuthus doriae active on voltage-gated Na⁺ channels*. FEBS letters, 2005. **579**(19): p. 4181-6.
221. Maertens, C., et al., *Potent modulation of the voltage-gated sodium channel Nav1.7 by ODI, a toxin from the scorpion Odonthobuthus doriae*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(1): p. 405-14.
222. Pucca, M.B., et al., *Electrophysiological characterization of the first Tityus serrulatus alpha-like toxin, Ts5: Evidence of a pro-inflammatory toxin on macrophages*. Biochimie, 2015.
223. Abbas, N., et al., *Full characterization of three toxins from the Androctonus amoreuxi scorpion venom*. Toxicon, 2009. **54**(4): p. 460-70.
224. Zhu, L., et al., *Two recombinant alpha-like scorpion toxins from Mesobuthus eupeus with differential affinity toward insect and mammalian Na⁽⁺⁾ channels*. Biochimie, 2013. **95**(9): p. 1732-40.
225. Kahn, R., et al., *Molecular requirements for recognition of brain voltage-gated sodium channels by scorpion alpha-toxins*. The Journal of biological chemistry, 2009. **284**(31): p. 20684-91.
226. Karbat, I., et al., *Molecular basis of the high insecticidal potency of scorpion alpha-toxins*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(30): p. 31679-86.
227. Zilberberg, N., et al., *Identification of structural elements of a scorpion alpha-neurotoxin important for receptor site recognition*. The Journal of biological chemistry, 1997. **272**(23): p. 14810-6.
228. Zilberberg, N., et al., *Functional expression and genetic alteration of an alpha scorpion neurotoxin*. Biochemistry, 1996. **35**(31): p. 10215-22.
229. Liu, L.H., et al., *Molecular basis of the mammalian potency of the scorpion alpha-like toxin, BmK M1*. FASEB J, 2005. **19**(6): p. 594-6.
230. Sun, Y.M., et al., *Importance of the conserved aromatic residues in the scorpion alpha-like toxin BmK M1: the hydrophobic surface region revisited*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(26): p. 24125-31.
231. Wang, C.G., et al., *Exploration of the functional site of a scorpion alpha-like toxin by site-directed mutagenesis*. Biochemistry, 2003. **42**(16): p. 4699-708.
232. Karbat, I., et al., *The unique pharmacology of the scorpion alpha-like toxin Lqh3 is associated with its flexible C-tail*. FEBS J, 2007. **274**(8): p. 1918-31.

233. Zhu, L., et al., *Target-Driven Positive Selection at Hot Spots of Scorpion Toxins Uncovers Their Potential in Design of Insecticides*. Mol Biol Evol, 2016.
234. Guan, R.J., et al., *Structural mechanism governing cis and trans isomeric states and an intramolecular switch for cis/trans isomerization of a non-proline peptide bond observed in crystal structures of scorpion toxins*. J Mol Biol, 2004. **341**(5): p. 1189-204.
235. Zhang, S., B. Gao, and S. Zhu, *Target-Driven Evolution of Scorpion Toxins*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14973.
236. Zhu, S., F. Bosmans, and J. Tytgat, *Adaptive evolution of scorpion sodium channel toxins*. J Mol Evol, 2004. **58**(2): p. 145-53.
237. Gur, M., et al., *Elucidation of the molecular basis of selective recognition uncovers the interaction site for the core domain of scorpion alpha-toxins on sodium channels*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(40): p. 35209-17.
238. He, X.L., et al., *Crystal structures of two alpha-like scorpion toxins: non-proline cis peptide bonds and implications for new binding site selectivity on the sodium channel*. J Mol Biol, 1999. **292**(1): p. 125-35.
239. Ye, X., et al., *Structural basis for the voltage-gated Na⁺ channel selectivity of the scorpion alpha-like toxin BmK MI*. Journal of molecular biology, 2005. **353**(4): p. 788-803.
240. Burley, S.K. and G.A. Petsko, *Weakly polar interactions in proteins*. Adv Protein Chem, 1988. **39**: p. 125-89.
241. Bosmans, F. and J. Tytgat, *Voltage-gated sodium channel modulation by scorpion alpha-toxins*. Toxicon, 2007. **49**(2): p. 142-58.
242. Zuo, X.P. and Y.H. Ji, *Molecular mechanism of scorpion neurotoxins acting on sodium channels: insight into their diverse selectivity*. Molecular neurobiology, 2004. **30**(3): p. 265-78.
243. Wang, J., et al., *Mapping the receptor site for alpha-scorpion toxins on a Na⁺ channel voltage sensor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(37): p. 15426-31.
244. Rogers, J.C., et al., *Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel alpha subunit*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(27): p. 15950-62.
245. Thomsen, W.J. and W.A. Catterall, *Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(24): p. 10161-5.
246. Smith, J.J., et al., *Differential phospholipid binding by site 3 and site 4 toxins. Implications for structural variability between voltage-sensitive sodium channel domains*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(12): p. 11127-33.
247. Moran, Y., D. Gordon, and M. Gurevitz, *Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels--molecular and evolutionary features*. Toxicon, 2009. **54**(8): p. 1089-101.
248. Alsen, C., J.B. Harris, and I. Tesseraux, *Mechanical and electrophysiological effects of sea anemone (Anemonia sulcata) toxins on rat innervated and denervated skeletal muscle*. Br J Pharmacol, 1981. **74**(1): p. 61-71.
249. Romey, G., et al., *Sea anemone toxin: a tool to study molecular mechanisms of nerve conduction and excitation-secretion coupling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1976. **73**(11): p. 4055-9.
250. Catterall, W.A. and L. Beress, *Sea anemone toxin and scorpion toxin share a common receptor site associated with the action potential sodium ionophore*. The Journal of biological chemistry, 1978. **253**(20): p. 7393-6.
251. el-Sherif, N., H.A. Fozzard, and D.A. Hanck, *Dose-dependent modulation of the cardiac sodium channel by sea anemone toxin ATXII*. Circ Res, 1992. **70**(2): p. 285-301.

252. Hanck, D.A. and M.F. Sheets, *Site-3 toxins and cardiac sodium channels*. *Toxicon*, 2007. **49**(2): p. 181-93.
253. Richard Benzinger, G., G.S. Tonkovich, and D.A. Hanck, *Augmentation of recovery from inactivation by site-3 Na channel toxins. A single-channel and whole-cell study of persistent currents*. *J Gen Physiol*, 1999. **113**(2): p. 333-46.
254. Moran, Y., D. Gordon, and M. Gurevitz, *Sea anemone toxins affecting voltage-gated sodium channels--molecular and evolutionary features*. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*, 2009. **54**(8): p. 1089-101.
255. Norton, R.S., *Structures of sea anemone toxins*. *Toxicon*, 2009. **54**(8): p. 1075-88.
256. Seibert, A.L., et al., *Arg-14 loop of site 3 anemone toxins: effects of glycine replacement on toxin affinity*. *Biochemistry*, 2003. **42**(49): p. 14515-21.
257. Gooley, P.R., J.W. Blunt, and R.S. Norton, *Conformational heterogeneity in polypeptide cardiac stimulants from sea anemones*. *FEBS letters*, 1984. **174**(1): p. 15-9.
258. Jover, E., et al., *Scorpion toxin: specific binding to rat synaptosomes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1978. **85**(1): p. 377-82.
259. Nicholson, G.M., et al., *Characterisation of the effects of robustoxin, the lethal neurotoxin from the Sydney funnel-web spider *Atrax robustus*, on sodium channel activation and inactivation*. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 1998. **436**(1): p. 117-26.
260. Nicholson, G.M., et al., *Modification of sodium channel gating and kinetics by versutoxin from the Australian funnel-web spider *Hadronyche versuta**. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*, 1994. **428**(3-4): p. 400-9.
261. Xiao, Y., et al., *Jingzhaotoxin-I, a novel spider neurotoxin preferentially inhibiting cardiac sodium channel inactivation*. *The Journal of biological chemistry*, 2005. **280**(13): p. 12069-76.
262. Little, M.J., et al., *delta-Atracotoxins from australian funnel-web spiders compete with scorpion alpha-toxin binding but differentially modulate alkaloid toxin activation of voltage-gated sodium channels*. *The Journal of biological chemistry*, 1998. **273**(42): p. 27076-83.
263. Tao, H., et al., *Molecular determinant for the tarantula toxin Jingzhaotoxin-I slowing the fast inactivation of voltage-gated sodium channels*. *Toxicon*, 2016. **111**: p. 13-21.
264. Xiao, Y., et al., *Characterization of the excitatory mechanism induced by Jingzhaotoxin-I inhibiting sodium channel inactivation*. *Toxicon*, 2007. **50**(4): p. 507-17.
265. Konno, K., et al., *Isolation and structure of pompilidotoxins, novel peptide neurotoxins in solitary wasp venoms*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. **250**(3): p. 612-6.
266. Sahara, Y., et al., *A new class of neurotoxin from wasp venom slows inactivation of sodium current*. *Eur J Neurosci*, 2000. **12**(6): p. 1961-70.
267. Konno, K., et al., *Molecular determinants of binding of a wasp toxin (PMTXs) and its analogs in the Na⁺ channels proteins*. *Neurosci Lett*, 2000. **285**(1): p. 29-32.
268. Dufton, M.J. and H. Rochat, *Classification of scorpion toxins according to amino acid composition and sequence*. *J Mol Evol*, 1984. **20**(2): p. 120-7.
269. Coelho, V.A., et al., *Functional and structural study comparing the C-terminal amidated beta-neurotoxin Ts1 with its isoform Ts1-G isolated from *Tityus serrulatus* venom*. *Toxicon*, 2014. **83**: p. 15-21.
270. Zamudio, F., et al., *Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann*. *Eur J Biochem*, 1992. **204**(1): p. 281-92.
271. Martin, M.F., et al., *Purification and chemical and biological characterizations of seven toxins from the Mexican scorpion, *Centruroides suffusus suffusus**. *The Journal of biological chemistry*, 1987. **262**(10): p. 4452-9.

272. Loret, E.P., et al., *Neurotoxins active on insects: amino acid sequences, chemical modifications, and secondary structure estimation by circular dichroism of toxins from the scorpion *Androctonus australis Hector**. *Biochemistry*, 1990. **29**(6): p. 1492-501.
273. Froy, O., et al., *The putative bioactive surface of insect-selective scorpion excitatory neurotoxins*. *The Journal of biological chemistry*, 1999. **274**(9): p. 5769-76.
274. Gordon, D., et al., *Localization of receptor sites for insect-selective toxins on sodium channels by site-directed antibodies*. *Biochemistry*, 1992. **31**(33): p. 7622-8.
275. Bechis, G., et al., *Amino acid sequence of toxin VII, a beta-toxin from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus**. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984. **122**(3): p. 1146-53.
276. Gordon, D., et al., *An 'Old World' scorpion beta-toxin that recognizes both insect and mammalian sodium channels*. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(12): p. 2663-70.
277. Gurevitz, M., et al., *The insecticidal potential of scorpion beta-toxins*. *Toxicon*, 2007. **49**(4): p. 473-89.
278. Billen, B., F. Bosmans, and J. Tytgat, *Animal peptides targeting voltage-activated sodium channels*. *Curr Pharm Des*, 2008. **14**(24): p. 2492-502.
279. Cestele, S., et al., *Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II*. *Neuron*, 1998. **21**(4): p. 919-31.
280. Leipold, E., et al., *Subtype specificity of scorpion beta-toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3*. *Mol Pharmacol*, 2006. **70**(1): p. 340-7.
281. Cestele, S., et al., *Neutralization of gating charges in domain II of the sodium channel alpha subunit enhances voltage-sensor trapping by a beta-scorpion toxin*. *J Gen Physiol*, 2001. **118**(3): p. 291-302.
282. Skinner, W.S., et al., *Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta**. *The Journal of biological chemistry*, 1989. **264**(4): p. 2150-5.
283. Corzo, G., et al., *Solution structure and alanine scan of a spider toxin that affects the activation of mammalian voltage-gated sodium channels*. *The Journal of biological chemistry*, 2007. **282**(7): p. 4643-52.
284. Corzo, G., et al., *Distinct primary structures of the major peptide toxins from the venom of the spider *Macrothele gigas* that bind to sites 3 and 4 in the sodium channel*. *FEBS letters*, 2003. **547**(1-3): p. 43-50.
285. Billen, B., et al., *Unique bell-shaped voltage-dependent modulation of Na⁺ channel gating by novel insect-selective toxins from the spider *Agelena orientalis**. *The Journal of biological chemistry*, 2010. **285**(24): p. 18545-54.
286. Corzo, G., et al., *Isolation, synthesis and pharmacological characterization of delta-palutoxins IT, novel insecticidal toxins from the spider *Paracoelotes luctuosus* (Amaurobiidae)*. *Eur J Biochem*, 2000. **267**(18): p. 5783-95.
287. Corzo, G., et al., *A spider toxin that induces a typical effect of scorpion alpha-toxins but competes with beta-toxins on binding to insect sodium channels*. *Biochemistry*, 2005. **44**(5): p. 1542-9.
288. Terlau, H., et al., *MicroO-conotoxin MrVIA inhibits mammalian sodium channels, but not through site I*. *Journal of neurophysiology*, 1996. **76**(3): p. 1423-9.
289. Leipold, E., et al., *muO conotoxins inhibit NaV channels by interfering with their voltage sensors in domain-2*. *Channels*, 2007. **1**(4): p. 253-62.
290. Middleton, R.E., et al., *Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels*. *Biochemistry*, 2002. **41**(50): p. 14734-47.
291. Xiao, Y., et al., *Jingzhaotoxin-III, a novel spider toxin inhibiting activation of voltage-gated sodium channel in rat cardiac myocytes*. *The Journal of biological chemistry*, 2004. **279**(25): p. 26220-6.

292. Bosmans, F., et al., *Four novel tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes*. Mol Pharmacol, 2006. **69**(2): p. 419-29.
293. Chow, C.Y., et al., *Three Peptide Modulators of the Human Voltage-Gated Sodium Channel 1.7, an Important Analgesic Target, from the Venom of an Australian Tarantula*. Toxins (Basel), 2015. **7**(7): p. 2494-513.
294. Bladen, C., et al., *Block of T-type calcium channels by protoxins I and II*. Molecular brain, 2014. **7**: p. 36.
295. Gui, J., et al., *A tarantula-venom peptide antagonizes the TRPA1 nociceptor ion channel by binding to the S1-S4 gating domain*. Current biology : CB, 2014. **24**(5): p. 473-83.
296. Tao, H., et al., *Analysis of the interaction of tarantula toxin Jingzhaotoxin-III (beta-TRTX-Cj1alpha) with the voltage sensor of Kv2.1 uncovers the molecular basis for cross-activities on Kv2.1 and Nav1.5 channels*. Biochemistry, 2013. **52**(42): p. 7439-48.
297. Sokolov, S., et al., *Inhibition of sodium channel gating by trapping the domain II voltage sensor with protoxin II*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(3): p. 1020-8.
298. Rong, M., et al., *Molecular basis of the tarantula toxin jingzhaotoxin-III (beta-TRTX-Cj1alpha) interacting with voltage sensors in sodium channel subtype Nav1.5*. FASEB J, 2011. **25**(9): p. 3177-85.
299. Smith, J.J., et al., *Molecular interactions of the gating modifier toxin ProTx-II with NaV 1.5: implied existence of a novel toxin binding site coupled to activation*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(17): p. 12687-97.
300. Bosmans, F., M.F. Martin-Eauclaire, and K.J. Swartz, *Deconstructing voltage sensor function and pharmacology in sodium channels*. Nature, 2008. **456**(7219): p. 202-8.
301. Xiao, Y., et al., *Common molecular determinants of tarantula huwentoxin-IV inhibition of Na⁺ channel voltage sensors in domains II and IV*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(31): p. 27301-10.
302. Minassian, N.A., et al., *Analysis of the structural and molecular basis of voltage-sensitive sodium channel inhibition by the spider toxin huwentoxin-IV (mu-TRTX-Hh2a)*. The Journal of biological chemistry, 2013. **288**(31): p. 22707-20.
303. Deplazes, E., et al., *Membrane-binding properties of gating modifier and pore-blocking toxins: Membrane interaction is not a prerequisite for modification of channel gating*. Biochimica et biophysica acta, 2016. **1858**(4): p. 872-82.
304. Milescu, M., et al., *Tarantula toxins interact with voltage sensors within lipid membranes*. J Gen Physiol, 2007. **130**(5): p. 497-511.
305. Ozawa, S., et al., *Structural basis for the inhibition of voltage-dependent K⁺ channel by gating modifier toxin*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 14226.
306. Trainer, V.L., et al., *Photoaffinity labeling of the brevetoxin receptor on sodium channels in rat brain synaptosomes*. Mol Pharmacol, 1991. **40**(6): p. 988-94.
307. Trainer, V.L., D.G. Baden, and W.A. Catterall, *Identification of peptide components of the brevetoxin receptor site of rat brain sodium channels*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(31): p. 19904-9.
308. Bidard, J.N., et al., *Ciguatoxin is a novel type of Na⁺ channel toxin*. The Journal of biological chemistry, 1984. **259**(13): p. 8353-7.
309. Lombet, A., J.N. Bidard, and M. Lazdunski, *Ciguatoxin and brevetoxins share a common receptor site on the neuronal voltage-dependent Na⁺ channel*. FEBS letters, 1987. **219**(2): p. 355-9.
310. Baden, D.G., et al., *Natural and derivative brevetoxins: historical background, multiplicity, and effects*. Environmental health perspectives, 2005. **113**(5): p. 621-5.

311. Schreibmayer, W. and G. Jeglitsch, *The sodium channel activator Brevetoxin-3 uncovers a multiplicity of different open states of the cardiac sodium channel*. *Biochimica et biophysica acta*, 1992. **1104**(2): p. 233-42.
312. Perez, S., et al., *A comparative study of the effect of ciguatoxins on voltage-dependent Na⁺ and K⁺ channels in cerebellar neurons*. *Chemical research in toxicology*, 2011. **24**(4): p. 587-96.
313. Hogg, R.C., R.J. Lewis, and D.J. Adams, *Ciguatoxin-induced oscillations in membrane potential and action potential firing in rat parasympathetic neurons*. *Eur J Neurosci*, 2002. **16**(2): p. 242-8.
314. Fainzilber, M., et al., *A new neurotoxin receptor site on sodium channels is identified by a conotoxin that affects sodium channel inactivation in molluscs and acts as an antagonist in rat brain*. *The Journal of biological chemistry*, 1994. **269**(4): p. 2574-80.
315. Leipold, E., et al., *Molecular interaction of delta-conotoxins with voltage-gated sodium channels*. *FEBS letters*, 2005. **579**(18): p. 3881-4.
316. Butterworth, J.F.t. and G.R. Strichartz, *Molecular mechanisms of local anesthesia: a review*. *Anesthesiology*, 1990. **72**(4): p. 711-34.
317. Catterall, W.A. and T.M. Swanson, *Structural Basis for Pharmacology of Voltage-Gated Sodium and Calcium Channels*. *Mol Pharmacol*, 2015. **88**(1): p. 141-50.
318. Ragsdale, D.S., et al., *Molecular determinants of state-dependent block of Na⁺ channels by local anesthetics*. *Science*, 1994. **265**(5179): p. 1724-8.
319. Yarov-Yarovoy, V., et al., *Molecular determinants of voltage-dependent gating and binding of pore-blocking drugs in transmembrane segment IIS6 of the Na(+) channel alpha subunit*. *The Journal of biological chemistry*, 2001. **276**(1): p. 20-7.
320. Yarov-Yarovoy, V., et al., *Role of amino acid residues in transmembrane segments IS6 and IIS6 of the Na⁺ channel alpha subunit in voltage-dependent gating and drug block*. *The Journal of biological chemistry*, 2002. **277**(38): p. 35393-401.
321. Hille, B., *Local anesthetics: hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction*. *J Gen Physiol*, 1977. **69**(4): p. 497-515.
322. Binshtok, A.M., B.P. Bean, and C.J. Woolf, *Inhibition of nociceptors by TRPV1-mediated entry of impermeant sodium channel blockers*. *Nature*, 2007. **449**(7162): p. 607-10.
323. Lirk, P., S. Picardi, and M.W. Hollmann, *Local anaesthetics: 10 essentials*. *European journal of anaesthesiology*, 2014. **31**(11): p. 575-85.
324. McCormack, K., et al., *Voltage sensor interaction site for selective small molecule inhibitors of voltage-gated sodium channels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. **110**(29): p. E2724-32.
325. Leipold, E., et al., *Combinatorial interaction of scorpion toxins Lqh-2, Lqh-3, and LqhalphalIT with sodium channel receptor sites-3*. *Mol Pharmacol*, 2004. **65**(3): p. 685-91.
326. Clark, J.M. and S.B. Symington, *Advances in the mode of action of pyrethroids*. *Top Curr Chem*, 2012. **314**: p. 49-72.
327. Wang, S.Y. and G.K. Wang, *Voltage-gated sodium channels as primary targets of diverse lipid-soluble neurotoxins*. *Cell Signal*, 2003. **15**(2): p. 151-9.
328. Yamaoka, K., S.M. Vogel, and I. Seyama, *Na⁺ channel pharmacology and molecular mechanisms of gating*. *Curr Pharm Des*, 2006. **12**(4): p. 429-42.
329. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. *Bioinformatics*, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
330. Eswar, N., et al., *Comparative protein structure modeling using MODELLER*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2007. **Chapter 2**: p. Unit 2 9.
331. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2002. **58**(Pt 6 No 1): p. 899-907.
332. Van Der Spoel, D., et al., *GROMACS: fast, flexible, and free*. *J Comput Chem*, 2005. **26**(16): p. 1701-18.

333. Efremov, R.G., et al., *Molecular lipophilicity in protein modeling and drug design*. *Curr Med Chem*, 2007. **14**(4): p. 393-415.
334. Ghose, A.K., V.N. Viswanadhan, and J.J. Wendoloski, *Prediction of Hydrophobic (Lipophilic) Properties of Small Organic Molecules Using Fragmental Methods: An Analysis of ALOGP and CLOGP Methods*. *The Journal of Physical Chemistry A*, 1998. **102**(21): p. 3762-3772.
335. Pyrkov, T.V., et al., *PLATINUM: a web tool for analysis of hydrophobic/hydrophilic organization of biomolecular complexes*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(9): p. 1201-2.
336. Billen, B., et al., *Two novel sodium channel inhibitors from *Heriades melloteei* spider venom differentially interacting with mammalian channel's isoforms*. *Toxicon*, 2008. **52**(2): p. 309-17.
337. Pashkov, V.S., et al., *Solution spatial structure of 'long' neurotoxin M9 from the scorpion *Buthus eupeus* by 1H-NMR spectroscopy*. *Biophys Chem*, 1988. **31**(1-2): p. 121-31.
338. Bende, N.S., et al., *The insecticidal neurotoxin Aps III is an atypical knottin peptide that potently blocks insect voltage-gated sodium channels*. *Biochem Pharmacol*, 2013. **85**(10): p. 1542-54.
339. Gur, M., et al., *Elucidation of the molecular basis of selective recognition uncovers the interaction site for the core domain of scorpion alpha-toxins on sodium channels*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(40): p. 35209-17.
340. Prinz, W.A., et al., *The role of the thioredoxin and glutaredoxin pathways in reducing protein disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm*. *The Journal of biological chemistry*, 1997. **272**(25): p. 15661-7.
341. Jhamb, K. and D.K. Sahoo, *Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase*. *Bioresour Technol*, 2012. **123**: p. 135-43.
342. Lobstein, J., et al., *SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm*. *Microb Cell Fact*, 2012. **11**: p. 56.
343. Liao, Z., et al., *Solution structure of Jingzhaotoxin-III, a peptide toxin inhibiting both *Nav1.5* and *Kv2.1* channels*. *Toxicon*, 2007. **50**(1): p. 135-43.
344. Jung, H.J., et al., *Solution structure and lipid membrane partitioning of *VSTx1*, an inhibitor of the *KvAP* potassium channel*. *Biochemistry*, 2005. **44**(16): p. 6015-23.
345. Lee, C.W., et al., *Solution structure and functional characterization of *SGTx1*, a modifier of *Kv2.1* channel gating*. *Biochemistry*, 2004. **43**(4): p. 890-7.
346. Xiao, Y., et al., *Tarantula huwentoxin-IV inhibits neuronal sodium channels by binding to receptor site 4 and trapping the domain ii voltage sensor in the closed configuration*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(40): p. 27300-13.
347. Rong, M., et al., *Molecular basis of the tarantula toxin jingzhaotoxin-III (beta-TRTX-Cj1alpha) interacting with voltage sensors in sodium channel subtype *Nav1.5**. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2011. **25**(9): p. 3177-85.
348. Redaelli, E., et al., *Target promiscuity and heterogeneous effects of tarantula venom peptides affecting *Na+* and *K+* ion channels*. *The Journal of biological chemistry*, 2010. **285**(6): p. 4130-42.
349. Bladen, C., et al., *Block of T-type calcium channels by protoxins I and II*. *Mol Brain*, 2014. **7**(1): p. 36.
350. Gui, J., et al., *A tarantula-venom peptide antagonizes the *TRPA1* nociceptor ion channel by binding to the *S1-S4* gating domain*. *Curr Biol*, 2014. **24**(5): p. 473-83.
351. Phillips, L.R., et al., *Voltage-sensor activation with a tarantula toxin as cargo*. *Nature*, 2005. **436**(7052): p. 857-60.

352. Xiao, Y., et al., *The tarantula toxins ProTx-II and huwentoxin-IV differentially interact with human Nav1.7 voltage sensors to inhibit channel activation and inactivation*. Mol Pharmacol, 2010. **78**(6): p. 1124-34.
353. Lee, S.Y. and R. MacKinnon, *A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom*. Nature, 2004. **430**(6996): p. 232-5.