ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.29

Рекомбинантные пептиды Ce1 и Ce4 из яда скорпиона *Centruroides elegans* и их взаимодействие с гибридными каналами KcsA-K_v1.X (x = 1, 3, 6)

Н.А. Орлов^{1, 2, 3, *} , С.А. Якимов², О.В. Некрасова², А.В. Феофанов^{1, 2}

¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,

Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;

³School of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, No. 1, International University Park Road, Dayun New Town, Longgang

District, Shenzhen, Guangdong Province, 518172, China

*e-mail: n.orlov858@yandex.ru

Разработана методика получения рекомбинантных функционально-активных пептидов Cel и Ce4 из яда скорпиона *Centruroides elegans* в системе экспрессии *Escherichia coli*. Выходы Cel и Ce4 составили соответственно 6,5 и 12 мг с литра культуры (плотность клеток около 5 оптических единиц). Свойства полученных пептидов исследованы с применением биоинженерных систем на основе гибридных каналов KcsA-K_v1.x (x = 1, 3, 6), содержащих сайты связывания блокаторов соответствующих эукариотических калиевых каналов семейства K_v1. Показано, что рекомбинантные Cel и Ce4 вплоть до микромолярных концентраций не проявляют сродства к сайтам связывания каналов K_v1.1 и K_v1.6 и, подобно природным пептидам, селективно взаимодействуют с сайтом связывания канала K_v1.3: кажущиеся константы диссоциации комплексов KcsA-K_v1.3 с рекомбинантными Cel и Ce4 равны, соответственно, 50 ± 10 и 200 ± 30 нМ (среднее ± стандартная ошибка среднего).

Ключевые слова: потенциал-зависимые калиевые каналы, K_v1, гибридный калиевый канал KcsA-Kv1.3, лазерная конфокальная микроскопия, пептидные блокаторы, аффинность

Потенциал-зависимые калиевые каналы семейства К, 1 – сложные тетрамерные мембранные белки, в которых каждая субъединица содержит N- и С-концевые цитоплазматические домены, а также шесть трансмембранных альфа-спиралей, окружающих центральный ион-проводящий канал [1]. В ответ на изменение трансмембранного потенциала каналы К, переходят из закрытого в открытое состояние, обеспечивая транспорт ионов калия через клеточную мембрану. Каналы К,1 участвуют в реполяризации клеточной мембраны и регулируют процессы проведения нервного импульса и мышечного сокращения [1], пропролиферации и миграции клеток, цессы секреции гормонов и нейромедиаторов [2, 3].

Усиление активности и/или повышение уровня экспрессии K_v 1-каналов играет ключевую роль в патогенезе ряда заболеваний, а ингибирование их активности рассматривается в качестве возможной терапии данных заболеваний [4]. Гиперактивность K_v 1.1 при рассеянном склерозе и травматическом повреждении спинного мозга может быть терапевтически значимо снижена блокаторами этого канала [5]. Повышенная экспрессия канала K_v 1.3 способствует развитию аутоиммунных заболеваний [6] и играет роль в процессах нейровоспаления, характерных для ишемического инсульта, болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и черепно-мозговой травмы [7]. Повышенную экспрессию канала $K_v 1.6$ в интернейронах связывают с возникновением эпиактивности, а его ингибирование позволяет нормализовать проводимость нейронов [3].

Многие пептидные токсины из ядов животных (скорпионов, змей, морских анемон и улиток семейства конусов) способны с высокой аффинностью и селективностью связываться с определенными типами K_v 1-каналов, блокируя их [8]. Пептидные блокаторы широко используют для изучения структуры, свойств и механизмов функционирования K_v 1-каналов, картирования их тканевой локализации [9–11]. Высокая избирательность взаимодействия с каналами-мишенями и низкая токсичность позволяют рассматривать некоторых представителей этих пептидов в качестве перспективных лекарственных средств [12–14].

Взаимодействие пептидных блокаторов с внешним сайтом связывания K_v1-каналов сопровождается закупориванием их поры, а также образованием множественных межмолекулярных контактов, включающих гидрофобные и электростатические взаимодействия, а также водородные связи, что определяет специфичность и устойчивость образующегося комплекса [15–17]. Изучение пептидов-блокаторов, определение их аффинности к разным типам K_v 1-каналов и уточнение роли отдельных аминокислотных остатков в стабилизации комплексов с каналами открывает возможность направленного дизайна пептидов с заданными свойствами с потенциальным лекарственным действием.

Обнаруженные в яде скорпиона Centruroides elegans Ce-пептиды из подсемейства α-КТх2 были охарактеризованы как блокаторы канала К, 1.3 человека, не взаимодействующие с кальций-активируемым каналом К_{Са}3.1, калиевым каналом Shaker и каналом К 2.1 крысы [18]. Пептидные блокаторы могут проявлять кросс-активность в отношении ряда каналов семейства К, 1, однако взаимодействия Се-пептидов с другими К_v1-каналами, в частности, с каналами К 1.1 и К 1.6, имеющими важное физиологическое значение в центральной нервной системе [19, 20], не исследовались. Изучение активности Се-пептидов в отношении К 1-каналов важно для выявления молекулярных детерминант, определяющих аффинность и селективность пептидов семейства α-КТх2 по отношению к отдельным представителям К.1-каналов.

В настоящей работе представлены результаты изучения свойств пептидов Ce1 и Ce4, которые первыми из пяти известных Ce-пептидов удалось получить в рекомбинантной форме (далее rCe1 и rCe4). Эти пептиды (рисунок, A) длиной 39 а.о. с тремя дисульфидными связями имеют высокую гомологию с известными блокаторами K_v 1-каналов семейства α -KTx2 – хонготоксином 1 (HgTx1) [21], маргатоксином (MgTx) [22] и ноксиустоксином (NTx) [23]. Природные Ce1 и Ce4 имеют сходную субнаномолярную аффинность к каналу K_v 1.3, но отличаются семью аминокислотными остатками (гомология 82%) и аминогруппой на C-конце Ce4 [18].

Свойства rCe1 и rCe4 были исследованы с применением разработанных нами ранее аналитических систем на основе гибридных каналов KcsA-K_v1.x (x = 1, 3, 6), содержащих сайты связывания блокаторов соответствующих эукариотических каналов [17, 24, 25].

Материалы и методы

В работе использовали реагенты фирмы Merck (Германия), эндонуклеазы рестрикции KpnI и HindIII, Таq-ДНК-полимеразу, ДНК-лигазу, маркеры молекулярных масс белков фирмы Thermo Fisher Scientific (США), Ni-Сефарозу (Ni Sepharose Fast Flow, США) и колонки для обессоливания белков PD-10 фирмы GE Healthcare (США), штаммы клеток *Escherichia coli* BL21(DE3) и Rosetta-gami B(pLysS) фирмы Novagen (Merck, Германия).

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ. 2022. Т. 77. № 2

Цистеиновую протеазу вируса гравировки табака (протеазу TEV) выделяли, как описано ранее [26]. Рекомбинантные пептиды хонготоксин 1 (HgTx1), агитоксин 2 (AgTx2) и харибдотоксин (ChTx) были получены по описанной ранее методике [27], основанной на экспрессии в *E. coli* целевого пептида в составе гибрида с мальтоза-связывающим белком (MBP). HgTx1, меченный по N-концу флуорофором Atto488 (A-HgTx1), был получен методом химического синтеза фирмой Smartox Biotechnology (Франция). AgTx2, меченный карбокситетраметилродамином (R-AgTx2), был получен, как описано ранее [24].

Гены пептидов Cel и Ce4, слитых на N-конце с сайтом расщепления протеазой TEV (CS_{TEV}), были получены методом полимеразной цепной реакции (ПЩР) с использованием олигонуклеотидных праймеров, содержащих 5'-концевые сайты рестрикции KpnI и 3'-концевые сайты HindIII. После гидролиза эндонуклеазами рестрикции KpnI и HindIII ПЦР-фрагменты ДНК клонировали по соответствующим сайтам в экспрессионную плазмиду pET-23d-MalE, также обработанную KpnI и HindIII [27]. Нуклеотидную последовательность целевых генов в составе плазмид pET-23d-MalE-CS_{TEV}-Ce1 и pET-23d-MalE-CS_{TEV}-Ce4 подтверждали секвенированием. Секвенирование выполнялось компанией «Евроген» (Россия).

Экспрессию и выделение пептидов проводили, как описано в работе [27]. Клетки E. coli Rosetta-gami B(DE3)pLysS, трансформированные полученными плазмидами, выращивали в среде LB (так называемая лизогенная среда), содержащей ампициллин (100 мкг/мл), канамицин (15 мкг/мл), хлорамфеникол (34 мкг/мл) и тетрациклин (12,5 мкг/мл). Культуру, выращенную при 37 °С до оптической плотности $O\Pi_{560} = 1,0-1,5$ о.е., индуцировали изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом (100 мкг/мл) и продолжали выращивать при 20 °С в течение 22 ч. Клеточную биомассу разрушали ультразвуком, нерастворимую фракцию удаляли центрифугированием при 36000g в течение 20 мин, а гибридный белок выделяли из растворимой фракции клеточного лизата хроматографией на колонке Ni Sepharose Fast Flow и обессоливали на колонке PD-10 в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4). Для контроля процедуры выделения целевых белков проводили электрофорез в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (рисунок, Б, В). Выделенные гибридные белки MBP-CS_{теу}-Ce1 и MBP-CS_{TEV}-Ce4 гидролизовали TEV-протеазой в присутствии 0,5 мМ дитиотреитола при 20 °С в течение 16 ч. Концентрация гибридного белка в реакционной смеси составляла 2 мг/мл, концентрация TEV-протеазы – 0,5 мг/мл. Пептиды очищали методом обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на колонке Discovery Bio Wide Pore C18 ($15 \text{ cm} \times 4,6 \text{ mm}, 5 \text{ mkm}$, Supelco, США) с использованием линейного градиента ацетонитрила (0–35%) в 0,1%-ной трифторуксусной кислоте (рисунок, Г, Д), лиофилизовали, растворяли в воде и хранили при -18 °C.

Массы rCe1 и rCe4 измеряли методом MALDI-TOF-спектрометрии. Концентрацию пептидов измеряли методом спектрофотометрии в растворе 20%-ного ацетонитрила и 0,1%-ной трифторуксусной кислоты на длине волны 214 нм, используя рассчитанные по ранее опубликованно-

му методу [28] коэффициенты молярной экстинкции 55787 и 54719 М⁻¹см⁻¹ для rCe1 и rCe4 соответственно.

Выращивание клеток *E. coli*, экспрессирующих гибридные каналы KcsA-K_v1.x (x = 1, 3, 6), и приготовление сферопластов проводили, как описано ранее [17, 24]. Полученные сферопласты хранили в растворе 10 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 0,25 М сахарозы, 10 мМ MgCl₂ при +4°C и использовали для измерений в течение двух недель.



Рисунок. Получение и свойства рекомбинантных пептидов rCe1 и rCe4.

А. Сравнение аминокислотных последовательностей HgTx1, rCe1 и rCe4. Красным выделен закупоривающий пору канала а.о. лизина. Синим выделены образующие дисульфидные связи цистеины. * и # – идентичные и вариабельные а.о. пептидов rCe1 и rCe4. **Б**, **В**. Анализ выделения MBP-CS_{TEV}-Ce1 (Б) и MBP-CS_{TEV}-Ce4 (В) из биомассы клеток *E. coli* методом электрофореза в денатуриующих условиях. М – белки-стандарты, Дорожки: 1 – клеточный лизат, 2 – очищенный целевой продукт. Стрелка отмечает положение целевого продукта.

Г, Д. Очистка rCe1 (Г) и rCe4 (Д), полученных гидролизом MBP-CS_{TEV}-Ce1 и MBP-CS_{TEV}-Ce4 TEV-протеазой, методом обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии. Время выхода пептидов rCe1 и rCe4 (обозначены стрелкой) – 26 и 36 мин соответственно.

E. Концентрационная зависимость конкурентного ингибирования связывания A-HgTx1 (20 нM) с KcsA-K_v1.3-пептидами rCe1, rCe4, HgTx1, AgTx2 и ChTx.

Ж. Анализ способности пептидов HgTx1 (100 нМ), rCe1 (7 мкМ) и rCe4 (6 мкМ) вытеснять A-HgTx1 (100 нМ) из комплекса с KcsA-K_v1.1.

3. Анализ способности пептидов AgTx2 (10 нМ), rCe1 (9 мкМ) и rCe4 (10 мкМ) вытеснять R-AgTx2 (0,5 нМ) из комплекса с KcsA-Kv1.6.

Конкурентное связывание немеченых пептидов с КсsA-К, 1.х в присутствии флуоресцентномеченых лигандов A-HgTx1 или R-AgTx2 проводили в соответствии с описанным ранее протоколом [24]. Концентрация A-HgTx1 в реакционной смеси с каналами KcsA-K, 1.1 и KcsA-К 1.3 составляла 100 нМ и 20 нМ соответственно. Концентрация R-AgTx2 в экспериментах с KcsA-К, 1.6 составляла 0,5 нМ. Растворы немеченых пептидов готовили методом двукратных разведений в буфере С (20 мМ Трис-HCl, 0,25 М сахароза, 0,3 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты, 4 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1% бычьего сывороточного альбумина, pH 7,5), смешивали с суспензией сферопластов в буфере С (до конечной концентрации 10⁴ клеток на мкл) и с флуоресцентно-меченым пептидом. Смеси инкубировали в течение 1 ч при 37 °С на шейкере (350 об./мин) и переносили в 12-луночные силиконовые кюветы flexiPERM (Perbio, Бельгия), прикрепленные к покровному стеклу. Кюветы центрифугировали при 15 °C и 200g в течение 5 мин для иммобилизации сферопластов на стекле. Концентрации пептидов варьировали в диапазоне: 16 нМ – 10 мкМ (rCe1), 0,1-10 мкМ (rCe4), 1-100 нМ (AgTx2), 0,9–230 нМ (HgTx1), 0,3–20 нМ (ChTx).

Измерения проводили на инвертированном лазерном сканирующем микроскопе LSM710 (Zeiss, Германия) с использованием масло-иммерсионного объектива αPlan-Apochromat (×100, NA 1,46) с латеральным и аксиальным разрешением 0,2 и 2 мкм соответственно. Флуоресценцию A-HgTx возбуждали на длине волны 488 нм и регистрировали в диапазоне 493–600 нм. Флуоресценцию R-AgTx2 возбуждали на длине волны 543 нм и регистрировали в диапазоне 550–685 нм.

Полученные изображения анализировали, как описано ранее [24]: рассчитывали показатели интенсивности флуоресценции для лигандов, связанных с каналами на поверхности сферопластов, и усредняли по выборке из 80-100 клеток для каждого измеренного образца. По средним значениям интенсивности строили зависимости вытеснения флуоресцентных лигандов из комплексов с KcsA-K_v1.x от концентрации конкурирующих немеченых пептидов и определяли концентрации пептидов, вытесняющих флуоресцентные лиганды из комплексов на 50% (IC_{50}).

Значения кажущихся констант диссоциации комплексов немеченых пептидов с KcsA- K_v 1.x (K_{ap}) рассчитывали по формуле Ченга-Прусоффа:

$$K_{ap} = \frac{IC_{50}}{1 + L/K_d},$$
 (1)

где L — концентрация флуоресцентного лиганда, а K_d — константа диссоциации его комплекса с сайтом связывания исследуемого канала KcsA-K_v1.x. Соответствующие константы K_d были определены для A-HgTx1 или R-AgTx2 ранее [29, 17]. Величины K_d комплексов A-HgTx1 с KcsA-K_v1.1 и KcsA-K_v1.3 составили 44±6 нМ и 8,4±0,7 нМ соответственно [29]. Значение K_d комплекса R-AgTx2 с KcsA-K_v1.6 определено как 0,14±0,04 нМ [17] (среднее ± стандартная ошиб-ка среднего).

Исследования проводили в трех независимых повторностях. Рассчитанные по результатам экспериментов константы K_{ap} усредняли и представляли как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

Пептиды rCe1 и rCe4 были получены в рекомбинантной форме путем экспрессии в клетках Е. coli гибридных белков MBP-CS_{TEV}-Ce1 и MBP- CS_{TEV} -Ce4 по разработанному нами методу [27]. Он позволяет обеспечить высокий уровень экспрессии целевых пептидов в растворимой форме с правильно замкнутыми дисульфидными связями и исключить процедуру ренатурации пептидов in vitro. Эффективной экспрессии rCe1 и rCe4 способствовали использование шапероноподобного белка-партнера МВР, снижение температуры культивации до 20 °C, а также использование штамма Rosetta-gami B(pLysS), в котором облегчено замыкание дисульфидных связей в цитоплазме. В этих условиях был обеспечен высокий уровень продукции гибридных белков (рисунок, Б и В) – около 200 мг с 1 л культуры (плотность около 5 оптических единиц)

При разделении реакционной смеси после ТЕV-гидролиза методом ОФ ВЭЖХ пики пептидов на хроматограмме имели симметричную форму и характерные для ренатурированных пептидов времена выхода – 26 и 36 мин для rCe1 и rCe4 соответственно (рисунок, Г, Д). Наличие множественных пиков на хроматограмме rCe1 с временами выхода более 26 мин свидетельствует о присутствии в гидролизате TEV денатурированных форм пептида, образующихся, по-видимому, из-за чувствительности rCe1 к дитиотреитолу – компоненту реакции гидролиза.

Выходы rCe1 и rCe4 составили 6,5 и 12 мг соответственно с литра культуры клеток. Молекулярные массы rCe1 и rCe4, измеренные методом MALDI-TOF-спектрометрии, были равны 4253 Да и 4296 Да, что с точностью до 1 Да соответствовало их расчетным массам (4252 и 4295 Да соответственно) с 3 дисульфидными связями. Таким образом, результаты ОФ ВЭЖХ пептидов и измерения их молекулярной массы свидетельствуют о получении rCe1 и rCe4 в ренатурированной форме.

Для изучения способности rCe1 и rCe4 взаимодействовать с внешними сайтами связывания блокаторов каналов K_v 1.1, K_v 1.3 и K_v 1.6 применяли биоинженерные тест-системы [24], основанные на экспрессии гибридных каналов KcsA-K_v1.x (x = 1, 3, 6) в плазматической мембране *E. coli* и использовании флуоресцентно меченого лиганда. Удаление клеточной стенки обеспечивает доступ лигандов к гибридным каналам на поверхности мембраны. Образование комплексов лигандов с гибридными каналами в условиях конкурентного связывания позволяет провести сравнение аффинностей меченого и изучаемого (немеченого) лиганда. Надежность такого подхода подтверждена ранее в сравнительных исследованиях методами электрофизиологии [25, 30].

Взаимодействие rCe1 и rCe4 с каналом KcsA-K_1.3 изучали с помощью гомологичного флуоресцентно-меченого А-HgTx1 и сравнивали с активностью известных пептидных блокаторов AgTx2, ChTx и HgTx1. Обнаружено, что rCe1 и rCe4 вытесняют A-HgTx1 из комплексов с KcsA-K,1.3, но уступают по активности блокаторам AgTx2, ChTx и HgTx1 (рисунок, E). Измерения показали, что кажущиеся константы диссоциации комплексов KcsA-K 1.3 с rCe1 и rCe4 равны соответственно 50±10 и 200±30 нМ. Аналогичные константы для AgTx2, ChTx и HgTx1, измеренные в параллельных экспериментах, составили соответственно $0,6\pm0,1,$ 1,1±0,1 и 1,07±0,03 нМ.

Для природных пептидов Ce1 и Ce4 константы K_d , измеренные на эукариотическом канале K_v1.3, равны 0,7 и 0,98 нМ соответственно [18]. Измеренные в электрофизиологических экспериментах K_d комплексов ChTx с каналом K_v 1.3 составляют 0,19 нМ при экспрессии К 1.3 в ооцитах лягушки [31] и 2,6 нМ при его экспрессии в клетках млекопитающих [32]. Для AgTx2 значение K_d по данным электрофизиологических исследований на канале К, 1.3 равно 0,2 нМ [33]. Соответствующая K_d для HgTx1, измеренная методом радиолигандного анализа при низкой ионной силе, равна 0,086 нМ [21]. Таким образом, при связывании с гибридными каналами значения К_д для токсинов ChTx и AgTx2 сопоставимы со значениями, измеренными другими методами, а К_d пептидов Ce1, Ce4 и HgTx1 – представителей семейства токсинов α-КТх 2 – существенно отличаются.

Известно, что на величину измеренных K_d пептидов могут влиять выбор системы экспрессии K_v 1.3-канала (ооциты лягушки, линия эукариотических клеток), условия реакции связывания (ионная сила, температура) и метод измерений (методы электрофизиологии или радиолигандный анализ [24]). Причина отличий, измеренных нами и опубликованных ранее [18] величин K_d пептидов rCe1 и rCe4 пока не ясна. Для уточнения этих величин планируется провести исследования альтернативными методами. Снижение аффинности rCe4 по сравнению с природным пептидом может быть связано также с отсутствием C-концевой аминогруппы у rCe4. Известно, что посттрансляционное амидирование может значительно влиять на аффинность пептидных блокаторов калиевых каналов [34].

Изучение взаимодействия rCe1 и rCe4 с сайтом связывания K_v 1.1 показало, что rCe4 не вытесняет A-HgTx1 (100 нМ) из комплексов с KcsA- K_v 1.1 при концентрациях до 6 мкМ, а rCe1 при концентрации 7 мкМ вытесняет лишь 40% A-HgTx1 (рисунок, Ж). В контрольном эксперименте HgTx1 (100 нМ) вытеснял из комплексов 90% A-HgTx1 (рисунок, Ж). Согласно оценке по формуле (1), аффинность rCe1 к сайту связывания K_v 1.1 приблизительно в 40 раз меньше, чем к сайту Связывания K_v 1.1 более чем в 10 раз меньше, чем к сайту K_v1.3.

Поскольку A-HgTx1 не связывается с КсsA-K_v1.6 [27] (как следствие низкой аффинности HgTx1 к каналу K_v1.6 [21]), изучение гСе1 и гСе4 в отношении КсsA-K_v1.6 проводили с помощью флуоресцентного лиганда R-AgTx2, имеющего высокое сродство к этому каналу [17]. Исследования показали, что гСе1 и гСе4 не конкурируют с R-AgTx2 (0,5 нМ) за связывание с каналом КсsA-K_v1.6 вплоть до концентрации 9–10 мкМ (рисунок, 3). В тоже время AgTx2 (10 нМ) полностью вытеснял R-AgTx2 (0,5 нМ) из этих комплексов (рисунок, 3). Согласно оценке, показатели аффинности гСе1 и гСе4 к сайту связывания K_v1.6 меньше, чем к сайту K_v1.3, по крайней мере, в 40 и 10 раз соответственно.

По аффинности к сайтам связывания каналов $K_v 1.1$ и $K_v 1.3$ пептиды rCe1 и rCe4 качественно похожи на гомологичные α -KTx2-блокаторы MgTx и NTx, для которых показано повышенное, соответственно, в 400 и в более чем 25 раз сродство к $K_v 1.3$, чем к $K_v 1.1$ [22, 23]. Однако для гомологичного HgTx1 аффинность к $K_v 1.1$, наоборот, в 3 раза выше, чем к $K_v 1.3$ [21]. К $K_v 1.6$ -каналу HgTx1 имеет очень низкую аффинность, что согласуется со свойствами rCe1 и rCe4. Сродство MgTx и NTx к $K_v 1.6$ по информации в базе данных Kaliumdb (https://kaliumdb.org) неизвестно.

Полученные результаты дополняют данные о свойствах пептидных блокаторов потенциалзависимых калиевых каналов, относящихся к подсемейству α -КТх2. Выявленная селективность пептидов rCe1 и rCe4 к сайту связывания канала K_v 1.3, возможно, связана с наличием в центральной петле пептидов отрицательно заряженных аминокислотных остатков D19 у Ce1 и E19 у Ce4, затрудняющих взаимодействие с KcsA-K_v1.1.

Отметим, что E19 присутствует также в NTx, который уступает HgTx1 по аффинности к каналу K_v 1.3 и не взаимодействует с K_v 1.1. Еще одним фактором, способным модулировать аффинность α -КTx2-пептидов к Kv1-каналам, могут быть отличия в аминокислотной последовательности С-концевых участков пептидов (рисунок, A).

По данным молекулярного моделирования С-конец играет важную роль при взаимодействии пептидов α-КТх2 с каналом K_v1.3 [35].

Планируемые в дальнейшем исследования свойств Се-пептидов методом сайт-направленного мутагенеза позволят выяснить роль конкретных аминокислотных остатков и их комбинаций в специфике взаимодействия изучаемых блокаторов с K_v1-каналами.

Авторы благодарят Ю.В. Королькову за предоставление R-AgTx2, а также М.В. Серебрякову

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jan L.Y., Jan Y.N. Voltage-gated potassium channels and the diversity of electrical signalling // J. Physiol. 2012. Vol. 590. N 11. P. 2591–2599.

2. González C., Baez-Nieto D., Valencia I., Oyarzún I., Rojas P., Naranjo D., Latorre R. K⁺ channels: functionstructural overview // Compr. Physiol. 2012. Vol. 2. N 3. P. 2087–2149.

3. *Chow L.W.C., Leung Y.M.* The versatile Kv channels in the nervous system: actions beyond action potentials // Cell. Mol. Life Sci. 2020. Vol. 77. N 13. P. 2473–2482.

4. *Wulff H., Castle N.A., Pardo L.A.* Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets // Nat. Rev. Drug Discov. 2009. N 12. P. 982–1001.

5. Beraud E., Viola A., Regaya I., Confort-Gouny S., Siaud P., Ibarrola D., le Fur Y., Barbaria J., Pellissier J.F., Sabatier J.M., Medina I., Cozzone P.J. Block of neural Kv1.1 potassium channels for neuroinflammatory disease therapy // Ann. Neurol. 2006. Vol. 60. N 5. P. 586–596.

6. *Cañas C.A., Castaño-Valencia S., Castro-Herrera F.* Pharmacological blockade of KV1.3 channel as a promising treatment in autoimmune diseases // J. Transl. Autoimmun. 2022. Vol. 5: 100146.

7. Fomina A.F., Nguyen H.M., Wulff H. Kv1.3 inhibition attenuates neuroinflammation through disruption of microglial calcium signaling // Channels. 2021. Vol. 15. N 1. P. 67–78.

8. *Kuzmenkov A.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A.* Diversity of potassium channel ligands: focus on scorpion toxins // Biochemistry (Mosc). 2015. Vol. 80. N 13. P. 1764–1799.

9. Banerjee A., Lee A., Campbell E., Mackinnon R. Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltagedependent K^+ channel // Elife. 2013. N 2: e00594.

10. *Hu L., Pennington M., Jiang Q., Whartenby K.A., Calabresi P.A.* Characterization of the functional properties of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 in human CD4⁺ T lymphocytes // J. Immunol. 2007. Vol. 179. N 7. P. 4563–4570.

11. Doczi M.A., Morielli A.D., Damon D.H. Kv1.3 channels in postganglionic sympathetic neurons: Expression, function, and modulation // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2008. Vol. 295. N 3. P. R733–R740.

12. Pennington M.W., Czerwinski A., Norton R.S. Peptide therapeutics from venom: Current status and

за измерения масс пептидов методом массспектрометрии. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 19-74-30014). Исследования были частично выполнены с использованием инфраструктурных возможностей Междисциплинарной научно-образовательной школы Московского университета «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология». Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

potential // Bioorganic Med. Chem. 2018. Vol. 26. N. 10. P. 2738–2758.

13. Gubič Š., Hendrickx L.A., Toplak Ž., Sterle M., Peigneur S., Tomašič T., Pardo L.A., Tytgat J, Zega A., Mašič L.P. Discovery of KV1.3 ion channel inhibitors: Medicinal chemistry approaches and challenges // Med. Res. Rev. 2021 Vol. 41. N 4. P. 2423–2473.

14. Tarcha E.J., Olsen C.M., Probst P., Peckham D., Muñoz-Elías E.J., Kruger J.G., Iadonato S.P. Safety and pharmacodynamics of dalazatide, a Kv1.3 channel inhibitor, in the treatment of plaque psoriasis: A randomized phase 1b trial // PLoS One. 2017. Vol. 12. N 7: e0180762.

15. Rodríguez De La Vega R.C., Merino E., Becerril B., Possani L.D. Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins // Trends Pharmacol. Sci. 2003. Vol. 24. N 5. P. 222–227.

16. *Giangiacomo K.M., Ceralde Y., Mullmann T.J.* Molecular basis of alpha-KTx specificity // Toxicon. 2004. Vol. 43. N 8. P. 877–886.

17. Nekrasova O.V., Volyntseva A.D., Kudryashova K.S., Novoseletsky V.N., Lyapina E.A., Illarionova A.V., Yakimov S.A., Korolkova Y.V., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Complexes of peptide blockers with Kv1.6 pore domain: molecular modeling and studies with KcsA-Kv1.6 channel // J. Neuroimmune Pharmacol. 2017. Vol. 12. N 2. P. 260–276.

18. Olamendi-Portugal T., Somodi S., Fernández J.A., Zamudio F.Z., Becerril B., Varga Z., Panyi G., Gáspár R., Possani L.D. Novel α -KTx peptides from the venom of the scorpion Centruroides elegans selectively blockade Kv1.3 over IKCa1 K⁺ channels of T cells // Toxicon. 2005. Vol. 46. N 4. P. 418–429.

19. D'adamo M.C., Liantonio A., Rolland J.F., Pessia M., Imbrici P. Kv1.1 channelopathies: Pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches // Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21. N 8: 2935.

20. Peck L.J., Patel R., Diaz P., Wintle Y.M., Dickenson A.H., Todd A.J., Calvo M., Bennett D.L.H. Studying independent Kcna6 knock-out mice reveals toxicity of exogenous LacZ to central nociceptor terminals and differential effects of Kv1.6 on acute and neuropathic pain sensation // J. Neurosci. 2021. Vol. 41. N 44. P. 9141–9162.

21. Koschak A., Bugianesi R.M., Mitterdorfer J., Kaczorowski G.J., Garcia M.L., Knaus H.G. Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom // J. Biol. Chem. 1998. Vol. 273. N 5. P. 2639–2644.

22. Bartok A., Toth A., Somodi S., Szanto T.G., Hajdu P., Panyi G., Varga Z. Margatoxin is a non-selective inhibitor of human Kv1.3 K^+ channels // Toxicon. 2014. Vol. 87. P. 6–16.

23. Grissmer S., Nguyen A.N., Aiyar J., Hanson D.C., Mather R.J., Gutman G.A., Karmilowicz M.J., Auperin D.D., Chandy K.G. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K+ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines // Mol. Pharmacol. 1994. Vol. 45. N 6. P. 1227–1234.

24. Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A., Ignatova A.A., Korolkova Y.V., Grishin E.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Fluorescent system based on bacterial expression of hybrid KcsA channels designed for Kv1.3 ligand screening and study // Anal. Bioanal. Chem. 2013. Vol. 405. N 7. P. 2379–2389.

25. Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A., Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tytgat J., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V. Variability of potassium channel blockers in *Mesobuthus eupeus* scorpion venom with focus on Kv1.1: an integrated transcriptomic and proteomic study // J. Biol. Chem. 2015. Vol. 290. N 19. P. 12195–12209.

26. *Tropea J.E., Cherry S., Waugh D.S.* Expression and purification of solubleHis₆-tagged TEV protease // High throughput protein expression and purification. Methods in Molecular Biology, vol. 498. / Ed. S.A. Doyle. Humana press, 2009. P. 297–307.

27. Nekrasova O., Kudryashova K., Fradkov A., Yakimov S., Savelieva M., Kirpichnikov M., Feofanov A. Straightforward approach to produce recombinant scorpion toxins— Pore blockers of potassium channels // J. Biotechnol. 2017. Vol. 241. P. 127–135.

28. *Kuipers B.J.H., Gruppen H.* Prediction of molar extinction coefficients ofproteins and peptides using UV absorption of the constituent amino acids at214 nm to enable quantitative reverse phase high-performance liquidchromatography-mass spectrometry analysis // J. Agric. Food Chem. 2007. Vol. 55. N 14. P. 5445–5451.

29. Orlov N., Nekrasova O., Feofanov A. Fluorescent ligands of Kv1 channels on the basis of hongotoxin: Atto488-hongotoxin // Microsc. Microanal. 2019. Vol. 25. Suppl. 2. P. 1278–1279.

30. Kuzmenkov A.I., Nekrasova O.V., Kudryashova K.S., Peigneur S., Tytgat J., Stepanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V., Feofanov A.V., Vassilevski A.A. Fluorescent protein-scorpion toxin chimera is a convenient molecular tool for studies of potassium channels // Sci. Rep. 2016. Vol. 6: 33314.

31. Denisova K.R., Orlov N.A., Yakimov S.A., Kryukova E.A., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Nekrasova O.V. GFP-margatoxin, a genetically encoded fluorescent ligand to probe affinity of Kv1.3 channel blockers // Int. J. Mol. Sci. 2022.Vol. 23. N 3: 1724.

32. Garcia M.L., Garcia-Calvo M., Hidalgo P., Lee A., MacKinnon R. Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus* quinquestriatus var. hebraeus venom // Biochemistry. 1994. Vol. 33. N. 22. P. 6834–6839.

33. George Chandy K., Cahalan M., Pennington M., Norton R.S., Wulff H., Gutman G.A. Potassium channels in T lymphocytes: Toxins to therapeutic immunosuppressants // Toxicon. 2001. Vol. 39. N 9. P. 1269–1276.

34. Legros C., Pollmann V., Farrell A.M., Bougis P.E., Martin-eauclaire M., Pongs O. Generating a high affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels // Biochemistry. 2000. Vol. 275. N 22. P. 16918–16924.

35. Chen R., Chung S.H. Binding modes of two scorpion toxins to the voltage-gated potassium channel Kv1.3 revealed from molecular dynamics // Toxins. 2014. Vol. 6. N 7. P. 2149–2161.

Поступила в редакцию 17.04.2022 После доработки 06.05.2022 Прията в печать 23.05.2022

RESEARCH ARTICLE

Recombinant peptides Ce1 and Ce4 from venom of scorpion *Centruroides elegans* and their interactions with hybrid channels KcsA-Kv1.x (x = 1, 3, 6)

N.A. Orlov^{1, 2, 3, *}, S.A. Yakimov², O.V. Nekrasova², A.V. Feofanov^{1, 2}

¹Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;

²Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 16/10 Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117997, Russia;

³School of Biology, Shenzhen MSU-BIT University, No. 1, International University Park Road, Dayun New Town, Longgang

District, Shenzhen, Guangdong Province, 518172, China

*e-mail: n.orlov858@yandex.ru

A technique has been developed for obtaining recombinant functionally-active peptides Ce1 and Ce4 from the venom of the scorpion *Centruroides elegans* in the *E. coli* expression system. The yields of peptides Ce1 and Ce4 were 6.5 and 12 mg per liter of culture, respectively. The properties of the obtained peptides were studied using bioengineered systems based on hybrid

channels KcsA-K_v1.x (x=1, 3, 6) containing blocker binding sites of the corresponding eukaryotic potassium channels of K_v1-family. It has been shown that recombinant Ce1 and Ce4 do not exhibit affinity to the binding sites of Kv1.1 and Kv1.6 channels up to micromolar concentrations and, like natural peptides, selectively interact with the binding site of Kv1.3 channel: the apparent dissociation constants of KcsA-Kv1.3 complexes with recombinant Ce1 and Ce4 are 50 ± 10 and 200 ± 30 nM, respectively.

Keywords: potential-dependent potassium channels, K_v 1, hybrid potassium channel KcsA-Kv1.3, laser confocal microscopy, peptide blockers, affinity

Funding: The research was funded by Russian Science Foundation, project number 19-74-30014. The research was partially performed using facilities of the Interdisciplinary Scientific and Educational School of Moscow University "Molecular Technologies of the Living Systems and Synthetic Biology".

Сведения об авторах

Орлов Никита Александрович — аспирант, вед. инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, инженер лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел. 8-495-336-64-55; e-mail: n.orlov858@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0003-0693-7091

Якимов Сергей Александрович – инженер-исследователь группы нанобиоинженерии ИБХ РАН. Тел. 8-495-330-66-38; e-mail: sa-yakimov@yandex.ru; OCRID: https://orcid.org/0000-0002-1586-3349

Некрасова Оксана Васильевна – канд. биол. наук, руководитель группы нанобиоинженерии отдела биоинженерии ИБХ РАН. Тел. 8-495-330-66-38; e-mail: okatja@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-7216-1618

Феофанов Алексей Валерьевич – докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел. 8-495-336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-1596-9506