



УДК 557.112.5:557.112.6

# ПРОИЗВОДНОЕ НЕЙРОТОКСИНА ВеМ9 РАСКРЫВАЕТ ОСОБЕННОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ИЗОФОРМОЙ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ Na<sub>v</sub>1.5

© 2024 г. М. А. Черных\*, М. А. Дюжева\*, \*\*, Н. А. Кульдюшев\*, С. Пеньёр\*\*\*,  
А. А. Беркут\*, Я. Титгат\*\*\*, А. А. Василевский\*, #, А. О. Чугунов\*

\* ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\* Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева,  
Россия, 125047 Москва, Миусская площадь, 9

\*\*\* Лёвенский университет, ON II, Herestraat 49, box 922, 3000, Лёвен, Бельгия

Поступила в редакцию 02.12.2023 г.

После доработки 09.12.2023 г.

Принята к публикации 10.12.2023 г.

$\alpha$ -Нейротоксины скорпионов – классические лиганды потенциал-чувствительных натриевых каналов, ингибирующие их инактивацию. Сила этого эффекта зависит от организма и изоформы каналов, а точные механизмы, объясняющие различия в активности, пока еще не известны. Ранее мы показали, что  $\alpha$ -токсинам скорпионов свойственно модульное строение. Они состоят из консервативного, структурно устойчивого сердцевинного модуля и лабильного модуля специфичности, который обладает высокой вариабельностью и определяет селективность в отношении разных каналов. При этом у токсинов, предпочтительно воздействующих на каналы млекопитающих (“млекотоксинов”), мы отметили более высокую подвижность модуля специфичности по сравнению с инсектотоксинами, высокоактивными в отношении насекомых. Мы предположили, что эта подвижность у млекотоксинов увеличена благодаря двум консервативным остаткам глицина, ограничивающим *N*-концевую петлю модуля специфичности. Для проверки этого предположения мы получили производное нейротоксина ВеМ9 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* с двумя заменами аминокислотных остатков в соответствующих позициях на глицин (A4G и Y17G). Неожиданно оказалось, что полученный нами полипептид ВеМ9<sup>GG</sup> утратил активность в отношении изоформы каналов Na<sub>v</sub>1.5, характерной для сердечной мускулатуры млекопитающих. Сравнение двух известных структур комплексов потенциал-чувствительных натриевых каналов с токсинами скорпионов позволило объяснить наблюдаемый эффект. Мы предполагаем существенную роль мембраны во взаимодействии токсинов с изоформой Na<sub>v</sub>1.5.

**Ключевые слова:** нейротоксины, натриевые каналы, белковая инженерия, молекулярная динамика

**DOI:** 10.31857/S0132342324040095, **EDN:** MWRFGB

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение потенциал-чувствительных натриевых каналов (Na<sub>v</sub>) важно как для фундаментальной биологии, так и для фармакологии, поскольку они отвечают за формирование потенциала действия

и тем самым обеспечивают работу электровозбудимых клеток: нейронов и миоцитов. Главная  $\alpha$ -субъединица Na<sub>v</sub> – это трансмембранный псевдотетрамер из четырех гомологичных, но различающихся повторов (D I–IV) в составе единой полипептидной цепи длиной ~2000 а.о. В каждом повторе

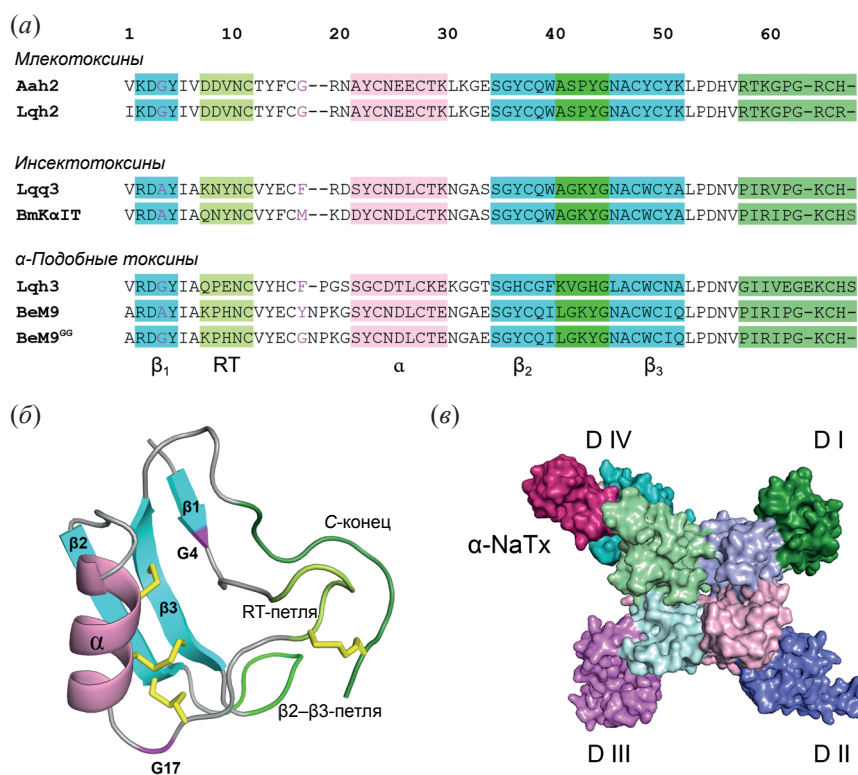
Сокращения: МД – молекулярная динамика; ПД – поровый домен; ПЧД – потенциал-чувствительный домен; ВеМ9 –  $\alpha$ -подобный нейротоксин М9 из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus*; ВеМ9<sup>GG</sup> – производное нейротоксина с двумя заменами аминокислотных остатков в соответствующих позициях на глицин (A4G и Y17G); Na<sub>v</sub> – потенциал-чувствительные натриевые каналы; VgNa<sub>v</sub>1 – Na<sub>v</sub> таракана;  $\alpha$ -NaTx –  $\alpha$ -нейротоксины скорпионов; Ttx – тиоредоксин.

# Автор для связи: (эл. почта: avas@ibch.ru).

можно выделить потенциал-чувствительный домен (ПЧД, трансмембранные спирали S1–S4), запускающий конформационные перестройки в ответ на сдвиг мембранного потенциала. При этом непосредственным сенсором потенциала служит сегмент S4, содержащий регулярно расположенные положительно заряженные остатки и переходящий при деполяризации мембраны из положения “вниз”, соответствующего неактивированному каналу, в положение “вверх” при активации. Спираль S5 и S6 из всех четырех повторов формируют единый поровый домен (ПД), способный селективно пропускать ионы натрия. Активация ПЧД I–III приводит к открытию ПД, а ПЧД IV отвечает за быструю инактивацию канала, во время которой ПД снова перестает пропускать  $\text{Na}^+$  [1, 2].

В то время как у большинства насекомых имеется лишь один ген, кодирующий  $\text{Na}_v$ , у млеко-

питающих их несколько, а соответствующие изоформы белка называются  $\text{Na}_v1.1$ – $1.9$ . Поскольку  $\text{Na}_v$  крайне важны для работы нервной системы и мышц, они служат мишенью для множества нейротоксинов, связывающихся с  $\text{Na}_v$  и имеющими изоформ-зависимую активность. Так, один из важнейших компонентов яда скорпионов – так называемые “ $\alpha$ -токсины” ( $\alpha$ - $\text{NaTx}$ ) – селективно связываются с ПЧД IV и ингибируют инактивацию канала. Это небольшие белки, состоящие из ~65 а.о., их укладка представлена  $\beta$ -листом из трех  $\beta$ -тяжей, короткой  $\alpha$ -спиралью и стабилизирована четырьмя S–S-мостиками. Некоторые  $\alpha$ - $\text{NaTx}$  действуют преимущественно на каналы насекомых (инсектотоксины), другие активны на разных изоформах каналов млекопитающих (млекотоксины), а третьи характеризуются широким профилем активности ( $\alpha$ -подобные токсины). На рис. 1 приведены аминокислотные



**Рис. 1.** Структурные особенности  $\alpha$ - $\text{NaTx}$ . (а) – Сравнение аминокислотных последовательностей представителей разных групп  $\alpha$ - $\text{NaTx}$ . Розовым обозначена  $\alpha$ -спираль, голубым –  $\beta$ -тяжи, оттенками зеленого – различные участки модуля специфичности: светлый – RT-петля, темнее –  $\beta_2$ - $\beta_3$ -петля, темный – С-концевая область. Малиновым выделены “шарнирные” глицины (остатки 4 и 17 по нумерации Aah2); (б) – пространственная организация  $\alpha$ - $\text{NaTx}$  на примере млекотоксина Aah2. Цветовые обозначения аналогичны панели (а). Желтым показаны дисульфидные мостики; (в) – общий вид взаимодействия  $\alpha$ - $\text{NaTx}$  с натриевыми каналами на примере комплекса Lqh3-hNav1.5 [7].  $\text{Na}_v$  изображен цветной поверхностью с индивидуально раскрашенными гомологичными повторами D I–IV (ПД более блеклый, ПЧД – яркий). Бордовым показан Lqh3.

последовательности нескольких  $\alpha$ -NaTx, относящихся к трем группам (а), и общая укладка этих токсинов (б). Некоторые млекотоксины селективны в отношении отдельных изоформ  $\text{Na}_v$ : к примеру,  $\text{MeuNaTx}\alpha$ -2 селективен к  $\text{Na}_v1.4$  [3], а OD1 – к  $\text{Na}_v1.7$  [4].

Несмотря на большой массив данных, до сих пор не ясно, как управлять селективностью  $\alpha$ -NaTx, получая с помощью рационального дизайна производные токсинов с заданными свойствами – молекулярные зонды для исследований нервной системы и прототипы лекарств. Ранее мы показали наличие у  $\alpha$ -NaTx модульной структуры, в которой к жесткой основе – так называемому “сердцевинному” модулю – прикрепляется “модуль специфичности”, отвечающий за селективное узнавание конкретной изоформы  $\text{Na}_v$  и состоящий из N-концевой RT-петли,  $\beta_2$ – $\beta_3$ -петли и C-концевой области, соединенной с RT-петлей дисульфидной связью (рис. 1б) [5]. Последовавшее определение структуры комплексов  $\text{Na}_v$  с  $\alpha$ -NaTx (рис. 1в) подтвердило, что взаимодействует с каналом именно модуль специфичности [6, 7].

Расчеты молекулярной динамики (МД) и анализ гидрофобных свойств выявили, что модуль специфичности млекотоксинов более подвижный и гидрофильный в сравнении с токсинами, активными в отношении  $\text{Na}_v$  насекомых. В той же работе мы указали, что более высокая подвижность всего модуля может быть обусловлена парой консервативных для млекотоксинов остатков глицина (G4 и G17, нумерация по Aah2, отмечены малиновым цветом на рис. 1), выступающих для RT-петли подобно шарниру. *In silico* мутагенез этой пары остатков показал снижение подвижности, а встречная замена на глицин в структуре инсектотоксина, напротив, ее повышала, позволив предложить направление дизайна специфических вариантов  $\alpha$ -NaTx.

На основе представления о модульном строении  $\alpha$ -NaTx мы продолжаем серию работ по мутагенезу одного из наиболее изученных  $\alpha$ -подобных токсинов M9 (ВеM9) из яда скорпиона *Mesobuthus eupeus* [8]. Ранее специфичность ВеM9 удалось изменить, получив селективный инсектотоксин [9]. С целью получения селективных млекотоксинов мы синтезировали производное ВеM9 с введением указанных выше “шарнирных”

глицинов: A4G и Y17G (ВеM9<sup>GG</sup>) и изучили его активность. Неожиданная специфическая утрата активности ВеM9<sup>GG</sup> в отношении  $\text{Na}_v1.5$  и нюансы строения комплекса  $\alpha$ -NaTx с этой изоформой позволили нам предположить особую роль мембраны.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Дизайн и получение ВеM9<sup>GG</sup>.** Анализ аминокислотных последовательностей  $\alpha$ -NaTx (рис. 1) показывает, что у млекотоксинов RT-петля чаще всего ограничена двумя консервативными остатками глицина, предположительно придающими ей более высокую подвижность. Это G4 в  $\beta_1$ -тяже и G17 сразу после второго остатка цистеина и перед  $\alpha$ -спиралью. У  $\alpha$ -подобного токсина ВеM9 в аналогичных позициях расположены остатки A4 и Y17. Мы предположили, что замена обоих этих остатков на глицин увеличит подвижность RT-петли и всего модуля специфичности, уменьшив сродство к  $\text{Na}_v$  насекомых и сдвинув профиль специфичности в сторону млекотоксинов [5].

ДНК, кодирующую ВеM9 с заменами A4G и Y17G (ВеM9<sup>GG</sup>), синтезировали с помощью ПЦР из перекрывающихся олигонуклеотидов, после чего клонировали в составе бактериального экспрессионного вектора с целью получения рекомбинантного продукта. Мы использовали традиционный подход к получению дисульфидбогатых полипептидов: ВеM9<sup>GG</sup> был наработан в составе гибридного белка с тиоредоксином (Trx), необходимым для корректного формирования дисульфидных связей. Trx-ВеM9<sup>GG</sup> получили в бактериальной системе и выделили с помощью аффинной хроматографии, после чего целевой продукт отделили от Trx с использованием бромциана. Хроматографической чистоты > 95% достигали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Выход составил 2 мг с 1 л среды LB. Очищенный образец характеризовали с помощью MALDI масс-спектрометрии: измеренная средняя молекулярная масса ВеM9<sup>GG</sup> составила 7215.2 Да (расчетное значение 7215.1 Да).

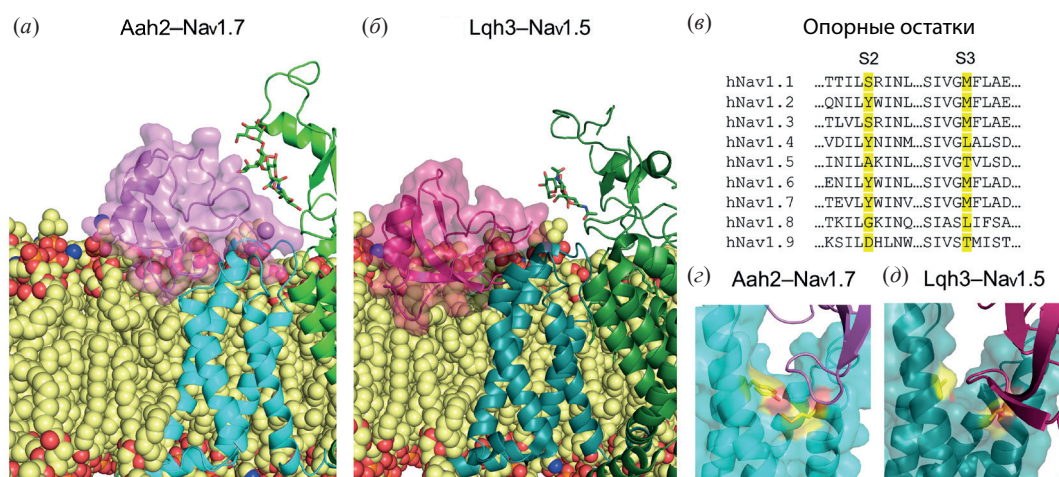
**Активность ВеM9<sup>GG</sup> в отношении  $\text{Na}_v$ .** Эффекты ВеM9<sup>GG</sup> были изучены в сравнении с исходным токсином в концентрации 1 мкМ в отношении ряда  $\text{Na}_v$ . Мы применили стандартный

подход, подразумевающий экспрессию генов каналов ( $\alpha$ -субъединиц и соответствующих вспомогательных  $\beta$ -субъединиц) в ооцитах *Xenopus laevis*. Мы оценили активность ВеМ9<sup>GG</sup> на четырех изоформах  $\text{Na}_v$  млекопитающих (rNav<sub>v</sub>1.2, rNav<sub>v</sub>1.4, hNav<sub>v</sub>1.5 и mNav<sub>v</sub>1.6) и в отношении канала таракана BgNav<sub>v</sub>1 (табл. 1). Активность ВеМ9<sup>GG</sup> оказалась снижена по сравнению с исходным токсином, при этом в отношении Nav<sub>v</sub>1.5 в концентрации 1 мкМ активность не наблюдалась вовсе.

**Модель комплекса  $\alpha$ -NaTx– $\text{Na}_v$  подсказывает причину утраты активности ВеМ9<sup>GG</sup> на Nav<sub>v</sub>1.5.** Для того чтобы объяснить наблюдаемый эффект, мы обратились к известным структурам комплексов  $\text{Na}_v$  с токсинами, построили модели комплексов с ВеМ9 и провели МД. В 2019 г. методом криоэлектронной микроскопии была получена первая структура комплекса химерного  $\text{Na}_v$  (ПЧД IV от hNav<sub>v</sub>1.7, каркас от канала таракана Nav<sub>v</sub>Pas) с млеко-

токсином Aah2 (PDB ID: 6NT4) [6]. Эта структура наглядно подтвердила нашу гипотезу модульного строения  $\alpha$ -NaTx: модуль специфичности токсина и оказался той частью, которая связывается с  $\text{Na}_v$ : RT-петля направлена в сторону ПД I,  $\beta_2$ – $\beta_3$ -петля – в сторону спиралей S2 и S3 ПЧД IV, а С-конец – в сторону ПД I и петли S3–S4 ПЧД IV; остальная часть токсина (сердцевинный модуль) с каналом не взаимодействует (рис. 1в, 2а).

В 2021 г. была получена еще одна структура – комплекса  $\alpha$ -подобного токсина Lqh3 с Nav<sub>v</sub>1.5 человека (PDB ID: 7K18; рис. 2б) [7]. В общем похожая, в деталях она заметно отличается от комплекса Aah2–Nav<sub>v</sub>1.7: в ней модуль специфичности не дотягивается до ПД I и S4 ПЧД IV, а сам токсин глубже погружается в “ложбину” между спиральями S2 и S3 ПЧД IV, вероятно активно взаимодействуя при этом с мембраной сердцевинным модулем (а именно N-концевой частью  $\alpha$ -спирали). Возможно, это связано с тем, что в спирали S2 ПЧД IV



**Рис. 2.** Различия структуры комплексов  $\text{Na}_v$  с  $\alpha$ -NaTx. (а, б) – Сайт связывания  $\alpha$ -NaTx с  $\text{Na}_v$  в мембране. Голубым выделен ПЧД IV канала, зеленым – ПД I (виден гликан), розовым и малиновым показаны токсины; (в) – сравнение фрагментов аминокислотных последовательностей S2 и S3 ПЧД IV. Желтым выделены так называемые “опорные” остатки, определяющие характер посадки  $\beta_2$ – $\beta_3$ -петли  $\alpha$ -NaTx; (г, д) – посадка  $\beta_2$ – $\beta_3$ -петли  $\alpha$ -NaTx на “опорные” остатки S2–S3 ПЧД IV. Цветовые обозначения аналогичны панелям (а, б), желтым показаны “опорные” остатки.

**Таблица 1.** Активность ВеМ9 и ВеМ9<sup>GG</sup> в отношении  $\text{Na}_v$

Токсин	rNav <sub>v</sub> 1.2	rNav <sub>v</sub> 1.4	hNav <sub>v</sub> 1.5	mNav <sub>v</sub> 1.6	BgNav <sub>v</sub> 1
ВеМ9	Н/а (3)	0.23 ± 0.03 (4)	0.46 ± 0.03 (3)	0.60 ± 0.04 (8)	1.93 ± 0.05 (7)
ВеМ9 <sup>GG</sup>	Н/а (4)	0.07 ± 0.01 (3)	Н/а (2)	0.17 ± 0.04 (4)	0.52 ± 0.01 (2)

Примечание: для каналов млекопитающих первая буква означает организм: r – крыса, h – человек, m – мышь. Н/а – нет активности. Указаны значения  $I_{50 \text{ мс}}/I_{\text{реак}}$  или  $I_5 \text{ мс}/I_{\text{реак}}$  (для Nav<sub>v</sub>1.5; см. пояснения в “Эксперим. части”). Приведены средние значения ± стандартные отклонения, в скобках указано число независимых экспериментов (n).

у  $\text{Na}_v1.5$  остаток, формирующий “опору” для петли  $\beta_2$ - $\beta_3$ , намного меньше (аланин), чем в ряде других каналов (обычно тирозин; рис. 2*в*). В результате токсин садится глубже между S2 и S3 (рис. 2*г, д*), предположительно более интенсивно при этом взаимодействуя с мембраной. Мы предполагаем, что различия в структуре комплексов Aah2- $\text{Na}_v1.7$  и Lqh3- $\text{Na}_v1.5$  смогут указать причину потери активности ВеМ9<sup>GG</sup> в отношении  $\text{hNa}_v1.5$ .

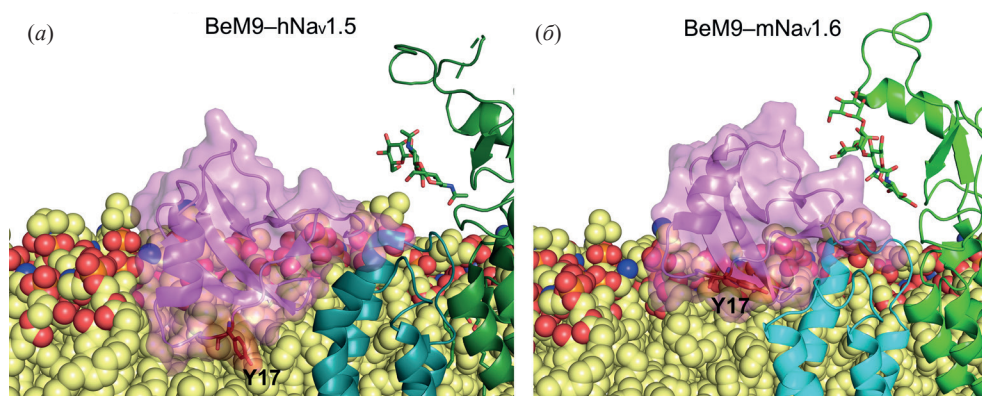
Lqh3, активный в отношении  $\text{Na}_v1.5$ , имеет G4, как и ВеМ9<sup>GG</sup>, однако при этом в 17-м положении у него расположен ароматический остаток, как у нативного ВеМ9 (рис. 1*а*). Согласно структуре комплекса Lqh3- $\text{Na}_v1.5$  (PDB ID: 7K18), F17 у Lqh3 глубоко погружен в мембрану (рис. 2*б*). Сродство этого остатка к мембране может быть важно именно в случае  $\text{hNa}_v1.5$  ввиду особой посадки токсина в ложбине между S2 и S3. В этом случае потеря гидрофобного остатка (замена Y17G) снижает сродство к мембране и не позволяет сформировать высокоаффинный комплекс (рис. 3).

Мы собрали данные по активности различных токсинов в отношении  $\text{Na}_v1.5$ , чтобы проиллюстрировать нашу гипотезу о важности их взаимодействия с мембраной (табл. 2). В большинстве случаев выраженная активность в отношении  $\text{Na}_v1.5$  у  $\alpha$ -NaTx коррелирует с наличием в 17-й позиции гидрофобного остатка.

К наиболее важным контрпримерам отнесем Lqh2, MeuNaTx $\alpha$ -4 и токсины из рода скорпионов *Tityus*. Lqh2, несмотря на сравнительно высокую активность, все же более активен на каналах  $\text{Na}_v1.2$  и 1.4 [12]. MeuNaTx $\alpha$ -4 вообще не активен на каналах млекопитающих, что, вероятно, связано с другими отличиями его структуры. Токсины Ts2-5 сильно отличаются от классических  $\alpha$ -NaTx из-за короткой  $\beta_2$ - $\beta_3$ -петли, поэтому к ним общая модель связывания не применима.

Для более основательной проверки гипотезы роли взаимодействия  $\alpha$ -NaTx с мембраной (посредством остатков в позициях 17, 41 и, возможно, других) в связывании с  $\text{Na}_v1.5$  потребуются дополнительные эксперименты. Среди таких экспериментов можно назвать получение следующих производных: 1) ВеМ9<sup>Y17G</sup> с единичной заменой (должен потерять аффинность к  $\text{Na}_v1.5$ ); 2) Lqh2<sup>G17F/Y</sup> (взаимодействие должно усилиться); 3) Lqh3<sup>F17G</sup> (взаимодействие должно ослабнуть). Кроме того, необходимо проведение МД моделей комплексов  $\alpha$ -NaTx- $\text{Na}_v1.5$  в явно заданной липидной мембране для детальной характеристики взаимодействий токсина с каналом и мембраной.

Помимо этого выявленное отличие в строении “ложбины” между S2 и S3 в ПЧД IV различных  $\text{Na}_v$  (рис. 2*в-д*) позволяет предсказать различный способ взаимодействия токсинов с каналами млекопитающих: с  $\text{Na}_v1.7$ , а также  $\text{Na}_v1.2$ , 1.4 и 1.6 (тирозин в “ложбине”) токсин будет рас-



**Рис. 3.** Влияние мутации Y17G на связывание ВеМ9 с  $\text{Na}_v$ . Голубым выделен ПЧД IV канала, зеленым – ПД I, розовым – токсин ВеМ9, темно-красным показан остаток Y17, направленный в сторону мембраны у ВеМ9 и замещенный на глицин у ВеМ9<sup>GG</sup>. (а) – Модель комплекса ВеМ9- $\text{hNa}_v1.5$ , полученная пространственным совмещением с Lqh3 из комплекса 7K18. Видно, что остаток Y17 у ВеМ9 заглублен в мембрану; (б) – модель комплекса ВеМ9- $\text{mNa}_v1.6$  (построение модели см. в “Эксперим. части”).

**Таблица 2.** Активность  $\alpha$ -NaTx в отношении Na<sub>v</sub>1.5

Токсин	Активность	Остаток 17	Комментарии
ВеМ9	Активен при 1 мкМ [5]	Y	–
ВеМ9 <sup>GG</sup>	Не активен при 1 мкМ	G	–
ВеМ9 <sup>E</sup>	Активен при 1 мкМ [9]	Y	Активность слабая, но в отношении других каналов млекопитающих упала сильнее
ВеМ9 <sup>EG</sup>	Не активен при 1 мкМ [9]	G	–
msВеМ9	Не активен при 1 мкМ [10]	G	–
Lqh2	EC <sub>50</sub> = 11.5 нМ [11]	G	На порядок более активен в отношении других каналов [12]
Lqh3	EC <sub>50</sub> = 2.5 нМ [11]	F	–
Lqh6	Активен при 1 мкМ [13]	I	–
Lqh7	Активен при 1 мкМ [13]	F	–
LqhaIT	EC <sub>50</sub> = 32.9 нМ [11]	F	Инсектотоксин
MeuNaTx $\alpha$ -1	Не активен при 1 мкМ [3]	G	–
MeuNaTx $\alpha$ -2	Не активен при 1 мкМ [3]	A	–
MeuNaTx $\alpha$ -4	Не активен при 2 мкМ [3]	F	Инсектотоксин
MeuNaTx $\alpha$ -5	Активен при 2 мкМ [3]	F	–
MeuNaTx $\alpha$ -12	Не активен при 10 мкМ [14]	A	–
MeuNaTx $\alpha$ -13	Не активен при 10 мкМ [14]	F	Отличается последовательность $\beta_2$ – $\beta_3$
VmK M1	EC <sub>50</sub> = 195 нМ [15]	A	–
OD1	Активен при 4 мкМ [4]	A	–
Ts2	Активен при 1 мкМ [16]	F	Короткая $\beta_2$ – $\beta_3$ -петля, вероятно, другой паттерн связывания
Ts3	Не активен при 500 нМ [17]	F	
Ts4	Не активен при 500 нМ [18]	F	
Ts5	Активен при 1 мкМ [19]	F	

Примечание: EC<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация, означает концентрацию лиганда, которая вызывает эффект, равный половине максимального возможного для этого лиганда. В данном случае подразумевается ингибирование инактивации.

полагаться “выше” (как на рис. 2б), слабее взаимодействуя – с мембраной; а с Na<sub>v</sub>1.5, а также Na<sub>v</sub>1.1, 1.3, 1.8 и 1.9 (“ложбина” образована остатками S, A, G или D) токсин получает возможность опуститься “ниже” в ПЧД, одновременно слабее взаимодействуя с ним и сильнее – с мембраной. Наличие заряженного остатка аспарагиновой кислоты у Na<sub>v</sub>1.9 открывает дополнительные перспективы по созданию действующих на эту изоформу полипептидов, несущих положительный заряд.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Получение рекомбинантных производных ВеМ9. Синтез нуклеотидной последователь-

ности, кодирующей ВеМ9<sup>GG</sup>, проведен с помощью лигирования олигонуклеотидных фрагментов (табл. 3) и ПЦР аналогично описанной ранее процедуре [5, 20]. Полученную полноразмерную последовательность клонировали в составе экспрессионного вектора pET-32b (Novagen, США; вставка по сайтам рестрикции KpnI и BamHI). В результате в составе вектора pET-32b-ВеМ9<sup>GG</sup> имеется химерный ген гибридного белка Trx-ВеМ9<sup>GG</sup>.

Экспрессию химерных генов проводили в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3) [21]. Культуру бактерий, трансформированных с использованием экспрессионного вектора, выращивали на среде LB с добавлением ампициллина (100 мкг/мл) при

**Таблица 3.** Олигонуклеотиды для синтеза гена *VeM9<sup>GG</sup>*

Название	Последовательность
M9 <sup>GG</sup> f1	ATATGGTACCATGGCTCGTGACGGTTACATCGCA
M9 <sup>GG</sup> f2	AACCGCACAACCTGCGTTTACGAATGCGGCAACCCGAAAGGTTCTT
M9f3	ACTGCAACGACCTGTGCACCGAAAACGGTGCTGAATCTGGTACT
M9f4	GCCAGATCCTGGGTAATAACGGTAACGCTTGCTGGTGCATCCA
M9f5	GCTGCCGGACAACGTTCCGATCCGATCCCGGGTAAATGCC
M9 <sup>GG</sup> r1/2	AAACGCAGTTGTGCGGTTTAGCGATGTAACCGTCAC
M9 <sup>GG</sup> r2/3	TGCACAGGTCGTTGCAGTAAGAACCSTTTTCGGGTTGC
M9r3/4	ATTTACCCAGGATCTGGCAGTAACCAGATTCAGCAC
M9r4/5	GAACGTTGTCCGGCAGCTGGATGCACCAGCAAGC
M9r	GCATGGATCCCTAGTGGCATTACCCGGGATAC

Примечание: полужирным шрифтом выделены старт- и стоп-кодоны, подчеркнуты сайты рестрикции для последующей вставки в плазмиду.

37°C и интенсивном перемешивании до достижения средней логарифмической фазы. Индукцию экспрессии целевого гена осуществляли добавлением в среду 0.2 мМ изопронил-β-D-1-тио-галактопиранозида, после чего культуру инкубировали еще 4 ч. По истечении этого времени бактерии осаждали, ресуспендировали в стартовом буфере для аффинной хроматографии (300 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 7.5) и лизировали с помощью ультразвука.

Слитные белки имели в своем составе гексагистидиновую последовательность, которая позволяла проводить их очистку с помощью металл-хелатной хроматографии [22] на сорбенте TALON Superflow Metal Affinity Resin (Clontech, США). Элюцию сорбированных белков проводили буфером, содержащим имидазол (150 мМ имидазол, 300 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl, pH 7.5). *VeM9<sup>GG</sup>* не содержит остатков метионина, поэтому целевой полипептид отщепляли от Tгх с помощью бромциана по описанной методике [23]. Для этого в последовательность химерного гена был специально введен метиониновый кодон непосредственно перед геном токсина. Очистку от нецелевых продуктов реакции проводили с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ, как описано для *VeM9* [5].

**Масс-спектрометрия.** Полипептиды анализировали с помощью времяпролетной MALDI масс-спектрометрии. Использовали спектрометр

Ultraflex TOF-TOF (Bruker Daltonik, Германия), анализ проводили как описано ранее [24]. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту (Sigma-Aldrich, США). Измерения проводили в линейном режиме. Масс-спектры анализировали с помощью программного обеспечения Data Analysis 4.3 (Bruker, Германия).

**Электрофизиология.** Активность полученного производного сравнивали с исходным токсином *VeM9* по эффекту в отношении  $Na_v$ , экспрессированных в ооцитах лягушки *X. laevis*. Выделение ооцитов, получение РНК, а также сбор и анализ данных проводили, как описано ранее [5, 10]. Использовали гены ряда изоформ  $Na_v$  млекопитающих ( $Na_v1.2$  и  $1.4$  крысы (r),  $Na_v1.5$  человека (h),  $Na_v1.6$  мыши (m), вспомогательных субъединиц  $\beta1$  и  $\beta1$ ), а также  $\alpha$ -субъединицы  $VgNa_v1$  и вспомогательной субъединицы *TipE* таракана *Blattella germanica* и дрозофилы соответственно. Для оценки эффективности токсинов мы использовали величину, равную отношению регистрируемого тока через мембрану ооцита спустя 30 мс после подачи тестового импульса к пиковому току ( $I_{30\text{ мс}}/I_{\text{peak}}$ ). В случае канала  $Na_v1.5$  из-за особой кинетики его работы использовали отношение тока через 5 мс после тестового импульса к пиковому току ( $I_{5\text{ мс}}/I_{\text{peak}}$ ). Все данные анализировали с помощью программного обеспечения pClamp Clampfit версии 10.4 (Molecular

Devices, США) и Origin Pro версии 8.0 (OriginLab, США).

**Молекулярное моделирование.** Внутримолекулярные эффекты от замен в структуре ВеМ9 оценивали с помощью сравнительного моделирования токсина дикого типа (PDB ID: 5MOU) и его производного. Модель ВеМ9<sup>GG</sup> была получена с помощью моделирования по гомологии в программе MODELLER v. 9.19 [25]. Три лучшие модели из 20 по внутренней оценке программы использовали как стартовые конформации для проведения трех реплик МД, а для нативного ВеМ9 – первую из ЯМР-ансамбля конформаций также в трех независимых запусках МД.

Для МД использовали программу GROMACS 5.1.2 [26] и силовое поле Amber99sb-ildn.ff [27]. Радиус отсечки ван-дер-ваальсовых и электростатических взаимодействий составил 10 и 12 Å соответственно. Для МД построили кубические ячейки ( $55 \times 55 \times 55 \text{ \AA}^3$  для токсинов и  $120 \times 120 \times 120 \text{ \AA}^3$  для комплексов) с моделью воды SPC [28], содержащие противоионы для электронейтральности и уравновешенные по энергии путем нагревания до 300 К в течение 100 пс. МД проводили в периодических граничных условиях при  $T = 300 \text{ K}$ ,  $P = 1 \text{ бар}$ , поддерживаемых при помощи термостата V-rescale [29] и баростата Берендсена [30] соответственно. Длина и шаг траектории составили 100 нс и 2 фс соответственно. Для каждой изучаемой молекулы было проведено по три расчета для накопления статистических данных. Для сравнения объектов между собой использовали *t*-критерий Стьюдента.

Для объяснения эффекта мутации Y17G в ВеМ9 строили модели комплексов токсина с  $\text{Na}_v$ , использованными для измерения токов –  $\text{hNa}_v1.5$  и  $\text{mNa}_v1.6$ . Комплекс ВеМ9– $\text{hNa}_v1.5$  получали прямой заменой токсина Lqh3 на ВеМ9 после пространственного совмещения в структуре 7K18. Модель ВеМ9– $\text{mNa}_v1.6$  строили следующим образом: сначала с использованием метода гомологии и программы MODELLER строили полную модель  $\text{mNa}_v1.6$  по структуре канала  $\text{hNa}_v1.6$  (PDB ID: 8FHD). Однако, поскольку для  $\text{Na}_v1.6$  пока не была определена структура комплекса ни с одним  $\alpha\text{-NaTx}$ , его ПЧД IV находится в активированном состоянии ввиду отсутствия потенциала (положение S4-сенсора “вверх”). Далее

неактивированное состояние ПЧД IV  $\text{mNa}_v1.6$  было смоделировано отдельно по гомологии со структурой комплекса Aah2 с химерой  $\text{hNa}_v1.7\text{-Na}_v\text{Pas}$ , S4-сенсор которой в связи с ингибированием токсином Aah2 находится в нужном нам положении “вниз”. На последнем шаге активированный ПЧД IV из первой модели заменяли на неактивированный из второй, после чего структуру релаксировали. Полученная таким образом модель  $\text{mNa}_v1.6$  имеет неактивированный S4-сенсор в ПЧД IV, пригодный для моделирования комплексов с  $\alpha\text{-NaTx}$ . ВеМ9 в этот комплекс помещали путем пространственного совмещения с Aah2 в оригинальной структуре 6NT4, оставляя вместо структуры “химерного” канала полученную модель  $\text{mNa}_v1.6$  с неактивированным ПЧД IV.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для проверки гипотезы о важности “шарнирных” глицинов в воздействии  $\alpha\text{-NaTx}$  на  $\text{Na}_v$  млекопитающих мы получили производное  $\alpha$ -подобного токсина ВеМ9 с заменами A4G и Y17G. Для этого мы использовали бактериальную систему экспрессии и белок-помощник Ttx. Мы оценили активность ВеМ9<sup>GG</sup> в отношении каналов млекопитающих и насекомого по сравнению с исходным токсином. Вопреки нашим ожиданиям, ВеМ9<sup>GG</sup> оказался менее активным на каналах млекопитающих и вовсе утратил активность по отношению к изоформе  $\text{Na}_v1.5$ . Для объяснения такого эффекта мы обратились к компьютерному моделированию. Анализ структуры комплексов  $\text{Na}_v$  с токсинами позволил предположить вероятный механизм, учитывающий роль мембранного окружения каналов. Наша работа открывает дополнительные возможности рационального дизайна селективных лигандов  $\text{Na}_v$ , которые могут быть использованы для разработки фармацевтических препаратов и инструментов для изучения нейронов на молекулярном уровне.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00395).

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции с лягушками проводили в соответствии с принципами ARRIVE (Animal Research:



Reporting of *In Vivo* Experiments) и Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (ETS123, Страсбург, 18.III.1986).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jiang D., Zhang J., Xia Z. // *Front Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 908867.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.908867>
- Catterall W.A. // *Channels (Austin)*. 2023. V. 17. P. 2281714.  
<https://doi.org/10.1080/19336950.2023.2281714>
- Zhu S., Peigneur S., Gao B., Lu X., Cao C., Tytgat J. // *Mol. Cell Proteomics*. 2012. V. 11. P. M111.012054.  
<https://doi.org/10.1074/mcp.m111.012054>
- Durek T., Vetter I., Wang C.-I.A., Motin L., Knapp O., Adams D.J., Lewis R.J., Alewood P.F. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. P. 1215–1222.  
<https://doi.org/10.1021/cb400012k>
- Chugunov A.O., Koromyslova A.D., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Polyansky A.A., Pentkovsky V.V., Vassilevski A.A., Grishin E.V., Efremov R.G. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 19014–19027.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.m112.431650>
- Clairfeuille T., Cloake A., Infield D.T., Llongueras J.P., Arthur C.P., Li Z.R., Jian Y., Martin-Eauclaire M.-F., Bougis P.E., Ciferri C., Ahern C.A., Bosmans F., Hacks D.H., Rohou A., Payandeh J. // *Science*. 2019. V. 363. P. eaav8573.  
<https://doi.org/10.1126/science.aav8573>
- Jiang D., Tonggu L., Gamal El-Din T.M., Banh R., Pomès R., Zheng N., Catterall W.A. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. P. 128.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-20078-3>
- Волкова Т.М., Гарсия А.Ф., Тележинская И.Н., Потапенко Н.А., Гришин Е.В. // *Биоорг. химия*. 1984. Т. 10. С. 979–982.
- Chernykh M.A., Kuldyushev N.A., Berkut A.A., Efremov R.G., Vassilevski A.A., Chugunov A.O., Peigneur S., Tytgat J. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2021. V. 47. P. 854–863.  
<https://doi.org/10.1134/S1068162021040063>
- Kuldyushev N.A., Berkut A.A., Peigneur S., Tytgat J., Grishin E.V., Vassilevski A.A. // *FEBS Lett.* 2017. V. 591. P. 3414–3420.  
<https://doi.org/10.1002/1873-3468.12839>
- Chen H., Heinemann S.H. // *J. Gen. Physiol.* 2001. V. 117. P. 505–518.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.117.6.505>
- Chen H., Lu S., Leipold E., Gordon D., Hansel A., Heinemann S.H. // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 16. P. 767–770.  
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.2002.02142.x>
- Hamon A., Gilles N., Sautière P., Martinage A., Kopyan C., Ulens C., Tytgat J., Lancelin J.-M., Gordon D. // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. P. 3920–3933.  
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.03065.x>
- Zhu L., Peigneur S., Gao B., Tytgat J., Zhu S. // *Biochimie*. 2013. V. 95. P. 1732–1740.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2013.05.009>
- Goudet C., Huys I., Clynen E., Schoofs L., Wang D.C., Waelkens E., Tytgat J. // *FEBS Lett.* 2001. V. 495. P. 61–65.  
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(01\)02365-1](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(01)02365-1)
- Cologna C.T., Peigneur S., Rustiguel J.K., Nonato M.C., Tytgat J., Arantes E.C. // *FEBS J.* 2012. V. 279. P. 1495–1504.  
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08545.x>
- Kirsch G.E., Skattebøl A., Possani L.D., Brown A.M. // *J. Gen. Physiol.* 1989. V. 93. P. 67–83.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.93.1.67>
- Pucca M.B., Cerni F.A., Peigneur S., Bordon K.C.F., Tytgat J., Arantes E.C. // *Toxins (Basel)*. 2015. V. 7. P. 2534–2550.  
<https://doi.org/10.3390/toxins7072534>
- Pucca M.B., Peigneur S., Cologna C.T., Cerni F.A., Zoccal K.F., Bordon K. de C.F., Faccioli L.H., Tytgat J., Arantes E.C. // *Biochimie*. 2015. V. 115. P. 8–16.  
<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.010>
- Shlyapnikov Y.M., Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // *Protein Expr. Purif.* 2008. V. 60. P. 89–95.  
<https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.03.011>
- Studier F.W., Moffatt B.A. // *J. Mol. Biol.* 1986. V. 189. P. 113–130.  
[https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2)
- Hochuli E., Bannwarth W., Döbeli H., Gentz R., Stüber D. // *Nat. Biotechnol.* 1988. V. 6. P. 1321–1325.  
<https://doi.org/10.1038/nbt1188-1321>
- Andreev Y.A., Kozlov S.A., Vassilevski A.A., Grishin E.V. // *Anal. Biochem.* 2010. V. 407. P. 144–146.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.07.023>

24. Kuzmenkov A.I., Sachkova M.Y., Kovalchuk S.I., Grishin E.V., Vassilevski A.A. // *Biochem. J.* 2016. V. 473. P. 2495–2506. <https://doi.org/10.1042/bcj20160436>
25. Webb B., Sali A. // *Curr. Protoc. Bioinformatics.* 2016. V. 54. P. 5.6.1–5.6.37. <https://doi.org/10.1002/cpbi.3>
26. Abraham M.J., Murtola T., Schulz R., Páll S., Smith J.C., Hess B., Lindahl E. // *SoftwareX.* 2015. V. 1. P. 19–25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>
27. Lindorff-Larsen K., Piana S., Palmo K., Maragakis P., Klepeis J.L., Dror R.O., Shaw D.E. // *Proteins.* 2010. V. 78. P. 1950–1958. <https://doi.org/10.1002/prot.22711>
28. Jorgensen W.L., Chandrasekhar J., Madura J.D., Impey R.W., Klein M.L. // *J. Chem. Phys.* 1983. V. 79. P. 926–935.
29. Bussi G., Donadio D., Parrinello M. // *J. Chem. Phys.* 2007. V. 126. P. 014101. <https://doi.org/10.1063/1.2408420>
30. Berendsen H.J.C., Postma J.P.M., van Gunsteren W.F., DiNola A., Haak J.R. // *J. Chem. Phys.* 1984. V. 81. P. 3684–3690. <https://doi.org/10.1063/1.448118>

## Scorpion Neurotoxin BeM9 Derivative Uncovers Unique Interaction Mode with Na<sub>v</sub>1.5 Sodium Channel Isoform

M. A. Chernykh\*, M. A. Duzheva\*, \*\*, N. A. Kuldyushev\*, S. Peigneur\*\*\*, A. A. Berkut\*, J. Tytgat\*\*\*, A. A. Vassilevski\*, #, and A. O. Chugunov\*

# E-mail: [avas@ibch.ru](mailto:avas@ibch.ru)

\* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\* D.I. Mendeleev Russian University of Chemical Technology, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

\*\*\* KU Leuven, ON II, Herestraat 49, box 922, 3000, Leuven, Belgium

Scorpion  $\alpha$ -neurotoxins are classical ligands of voltage-gated sodium channels that inhibit their inactivation. The strength of this effect depends on the organism and channel isoform, and the precise mechanisms explaining the differences in activity are still unknown. Previously, we have shown that scorpion  $\alpha$ -toxins are characterized by a modular structure. They consist of a conserved and structurally stable core module and a variable and mobile specificity module, which determines the selectivity for different channels. We noted a higher mobility of the specificity module in toxins active against mammals compared to insect-active toxins. We then hypothesized that the enhanced mobility in mammal toxins was provided by two conserved glycine residues that enclose the *N*-terminal loop of the specificity module. To test this assumption, we obtained a derivative of the neurotoxin BeM9 from the venom of the scorpion *Mesobuthus eupeus* with two replacements of amino acid residues in the corresponding positions with glycine (A4G and Y17G). Unexpectedly, it turned out that BeM9<sup>GG</sup> lost its activity against Na<sub>v</sub>1.5 channel isoform, characteristic of mammalian cardiac muscle. A comparison of two known structures of voltage-gated sodium channel complexes with scorpion toxins made it possible to explain the observed effect. We hypothesize an essential role of the membrane in the interaction of toxins with the Na<sub>v</sub>1.5 isoform.

*Keywords:* neurotoxins, voltage-gated sodium channels, protein engineering, molecular dynamics