

РАЗНООБРАЗИЕ ЛИГАНДОВ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ И МЕСТО ТОКСИНОВ СКОРПИОНОВ СРЕДИ НИХ

©2015 г. А. И. КУЗЬМЕНКОВ, Е. В. ГРИШИН,
А. А. ВАСИЛЕВСКИЙ

*Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук*

I. Введение. II. Суперсемейство K^+ каналов. III. Лиганды K^+ каналов. IV. Практическое применение полипептидных лигандов K^+ каналов. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Калиевые (K^+) каналы – суперсемейство интегральных мембранных белков, обеспечивающих селективный пассивный транспорт ионов K^+ через клеточную мембрану. K^+ каналы встречаются у всех живых организмов – от бактерий до высших многоклеточных животных, включая человека. Основные функции K^+ каналов состоят в поддержании мембранного потенциала (покоя), а также в формировании потенциала действия в электровозбудимых клетках. Сложно переоценить значение этих белков во многих физиологических процессах, включая обеспечение ионного транспорта, нервную передачу, клеточную коммуникацию и пролиферацию, гуморальную регуляцию и иммунный ответ. Поэтому изучение строения, механизмов работы и модуляции K^+ каналов – одна из важнейших задач

Принятые сокращения: 4-АП – 4-аминопиридин; ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография; ТЭА – тетраэтиламмоний; $CS\alpha/\alpha$ – цистеин-стабилизированные спираль-петля-спираль; $CS\alpha/\beta$ – цистеин-стабилизированные α -спираль и β -слой, ИСК – цистинный узел; K^+ каналы – калиевые каналы; $K_{\text{в}}$ – K^+ каналы входящего выпрямления; $K_{2\text{п}}$ – K^+ каналы с двумя поровыми участками; $K_{\text{в}}$ – потенциал-чувствительные K^+ каналы; SK_{Ca} – Ca^{2+} -активируемые K^+ каналы малой проводимости; IK_{Ca} – Ca^{2+} -активируемые K^+ каналы средней проводимости; BK_{Ca} – Ca^{2+} -активируемые K^+ каналы большой проводимости; КТх – полипептиды из яда скорпионов, блокирующие K^+ каналы; Р-петля – поровая петля; ТМ – трансмембранный.

Адрес для корреспонденции: aleksey.kuzmenkov@gmail.com; avas@ibch.ru.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-01180).

современной биоорганической химии. Кроме того, многими работами подтверждена вовлеченность этих белков в различные патологические процессы, что делает их перспективной мишенью фармакологического поиска.

Традиционно изучение K^+ каналов тесно сопряжено с исследованием лигандов этих мембранных белков и дальнейшим использованием их как инструмента для изучения основ работы каналов, а также идентификации новых представителей суперсемейства. По механизму действия все лиганды делятся на поровые блокаторы и модуляторы. Представители первой группы «затыкают» пору канала, подобно пробке в бутылке, а лиганды из второй группы изменяют работу канала без непосредственного физического препятствования току ионов. Пожалуй, главным источником лигандов K^+ каналов выступают яды скорпионов – сложные смеси десятков и даже сотен компонентов, как правило, коротких полипептидов. Интересно, что широкое разнообразие известных в настоящее время лигандов K^+ каналов из яда скорпионов представлено исключительно поровыми блокаторами.

Сегодня известно порядка 250 блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов, что составляет всего лишь 0,5% от предполагаемого природного разнообразия этих соединений. Интенсивные исследования позволяют, с одной стороны, расширить наши представления о структурных и функциональных особенностях K^+ каналов, а с другой – найти высокоселективные молекулы, которые могут быть использованы для создания лекарственных препаратов.

II. СУПЕРСЕМЕЙСТВО K^+ КАНАЛОВ

K^+ каналы присутствуют у всех живых организмов, а у человека обнаружено 78 генов, кодирующих главные (α -) субъединицы (см. ниже) этих трансмембранных белков. В настоящее время считается, что K^+ каналы появились приблизительно с момента зарождения жизни на Земле, в пользу чего свидетельствует обнаружение более 200 канал-подобных белков у архей и бактерий, родственных K^+ каналам эукариот [1].

K^+ каналы состоят из α - и β -субъединиц: первые, являясь главными, определяют структуру и основные функции канала, а вторые влияют на кинетику его работы. В структурно-функциональном отношении все K^+ каналы млекопитающих можно разделить на пять классов, основываясь на строении α -субъединиц (рис. 1):

1. K^+ каналы входящего выпрямления (K_v) представляют собой гомо- и гетеротетрамеры, каждая субъединица которых состоит из двух

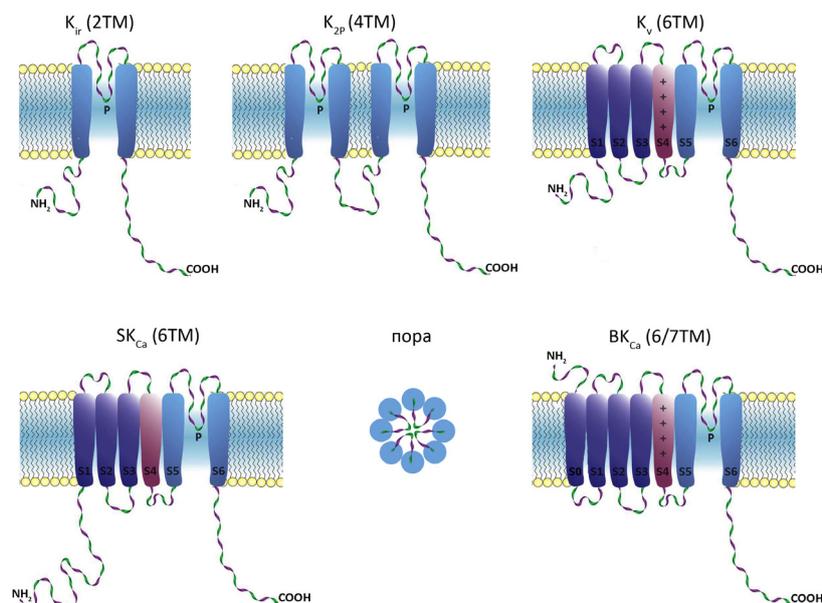


Рис. 1. Структурные семейства K^+ каналов.

На рисунке приведены топологические диаграммы. В центре нижнего ряда схематично изображена пора, образованная четырьмя поровыми участками отдельных субъединиц. ТМ – трансмембранный сегмент, P – поровая петля. S0-S6 – ТМ сегменты. S4 – сенсор потенциала (для K_v и BK_{Ca}).

трансмембранных (ТМ) сегментов с поровым участком (P) между ними. Работа этих каналов модулируется нуклеотидами (АТФ, АДФ), фосфорилированием, G-белками и фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфатом. У человека K_{ir} каналы кодируются 15 различными генами [2, 3].

2. K^+ каналы, имеющие два поровых участка (K_{2p}), построены из четырех ТМ сегментов, а при формировании канала α -субъединицы димеризуются. Эти каналы регулируются широким спектром факторов: рН, температурой, натяжением клеточной мембраны. У человека обнаружено 15 генов K_{2p} каналов [4, 5].

3. α -Субъединицы потенциал-зависимых (или потенциал-чувствительных) K^+ каналов (K_v) состоят из шести ТМ сегментов (S1-S6) с одним поровым участком (P) между S5 и S6. Зрелый канал формирует тетрамер α -субъединиц. Важной особенностью K_v каналов является наличие потенциал-чувствительного домена (ПЧД), состоящего из четырех ТМ сегментов (S1-S4). S4 содержит регулярно расположенные положительно заряженные аминокислотные остатки

и выполняет роль сенсора потенциала. Это самая обширная группа K^+ каналов: у человека обнаружено 40 генов [6].

4. Ca^{2+} -Активируемые K^+ каналы малой (SK_{Ca}) и средней (IK_{Ca}) проводимости построены из субъединиц, имеющих шесть ТМ сегментов с поровым участком между S5 и S6, как и в случае K_v каналов. Однако, сегмент S4 в этом случае нечувствителен к изменению потенциала. Активация Ca^{2+} является кальмодулин-опосредованной. Семейство этих каналов кодируются четырьмя генами у человека [7, 8].

5. Ca^{2+} -Активируемые K^+ каналы большой проводимости (BK_{Ca}) включают каналы, кодирующиеся четырьмя *slo* генами. Два представителя, в отличие от других, содержат семь ТМ сегментов. Интересная особенность этих каналов состоит в том, что они могут быть активированы изменением потенциала и некоторыми ионами (в зависимости от изоформы канала активаторами могут выступать Ca^{2+} , Na^+ , Cl^-) [9].

K^+ каналы высших растений можно разделить на три группы: Shaker-подобные, ТРК (от англ. tandem-pore K^+) и K_{ir} -подобные каналы [10]. Shaker-подобные каналы растений построены, как и K_v , из шести ТМ сегментов и активируются потенциалом. ТРК и K_{ir} -подобные каналы имеют четыре и два ТМ сегмента и являются родственными K_{2p} и K_{ir} каналам человека, соответственно [11, 12].

Самая маленькая α -субъединица K^+ канала (94 аминокислотных остатков) найдена у вируса РБСВ-1, паразитирующего на зеленых водорослях рода *Chlorella* [13]. У прокариотических организмов K^+ каналы чаще всего имеют в составе одной субъединицы два (MthK, K_{VB} и KcsA) или шесть (Kch, K_{VAP} и Mlo1) ТМ сегментов. Очень часто эти каналы имеют дополнительные цитоплазматические Ca^{2+} -связывающие или нуклеотид-связывающие домены [14]. У грибов найдена K^+ канал-образующая α -субъединица с нестандартной топологией: S1-S2-S3-S4-S5-P-S6-S7-P-S8, которая, по-видимому, не встречается у представителей других царств [15]. Удивительным кажется тот факт, что в геноме инфузории *Paramecium tetraurelia* найдено 298 генов K^+ каналов, что в 3,8 раз больше, чем у человека [14].

ДОМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ K^+ КАНАЛОВ

Мембранные части α -субъединиц K_v каналов состоят из двух частей (рис. 2): поровой, образованной двумя трансмембранными сегментами (S5-S6) с поровой (P) петлей между ними, и потенциал-чувствительной, образованной четырьмя трансмембранными сегментами (S1-S4). У зрелого K_v канала можно выделить поровый домен, образованный четырьмя поровыми частями каждой α -субъединицы, четыре

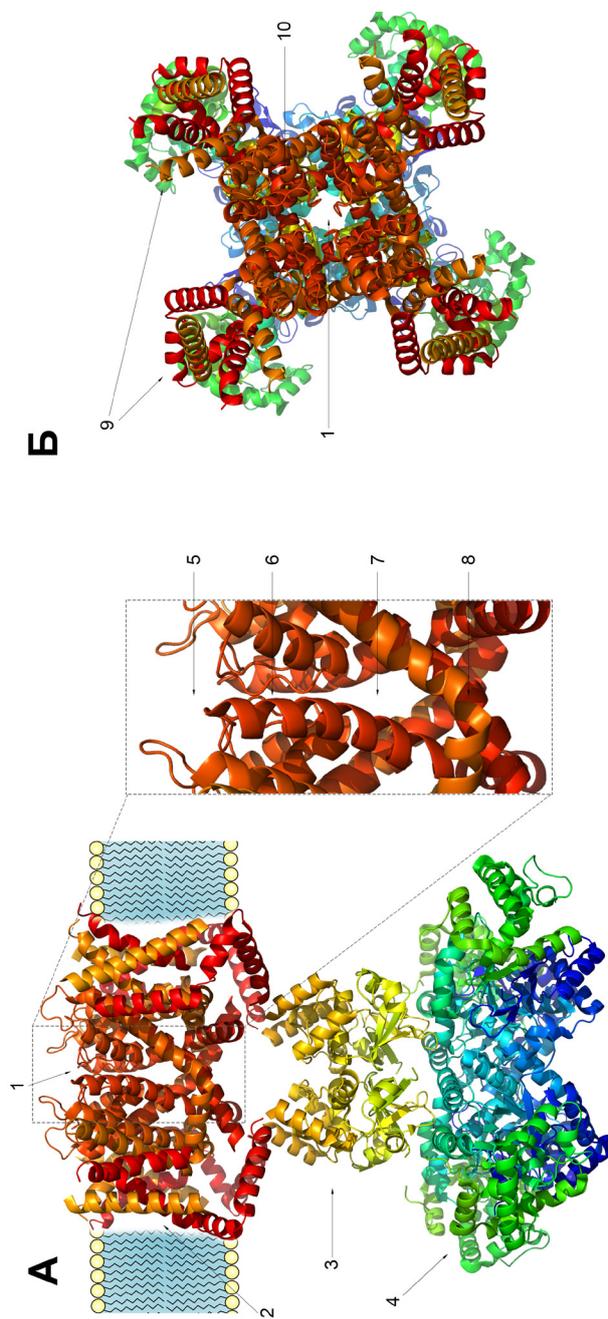


Рис. 2. Пространственная организация потенциал-зависимого K⁺ канала на примере K_v1.2 (код в базе данных пространственных структур полипептидов (PDB ID): 2A79).

А – вид сбоку, Б – вид с внеклеточной стороны.

1 – пора, 2 – гомотетрамер мембранных частей α-субъединиц, 3 – цитоплазматический домен α-субъединиц, 4 – β-субъединицы, 5 – внешний вестибуль, 6 – селективный фильтр, 7 – внутренняя полость, 8 – внутренние ворота, 9 – потенциально чувствительные домены, 10 – поровый домен.

потенциал-чувствительных домена, а также четыре цитоплазматических домена [16].

Поровый домен K_v каналов устроен так же, как у потенциал-зависимых Na^+ и Ca^{2+} каналов, и имеет похожий принцип работы, позволяющий пропускать примерно 10^6 – 10^8 ионов K^+ в секунду в открытом состоянии [17, 18]. K_v каналы – одно из самых разнообразных семейств мембранных белков [19], но все его представители имеют высококонсервативный участок из семи аминокислотных остатков TTVGYGD [20], который формирует структуру селективного фильтра. Благодаря ему K_v каналы пропускают ионы K^+ с высокой избирательностью, по сравнению, например, с Na^+ , радиус которых всего лишь на $0,4 \text{ \AA}$ меньше. Такая высокая селективность обеспечивается атомами кислорода внутри поры, которые координируют ионы K^+ , лишённые гидратной оболочки. При этом радиус Na^+ слишком мал для того, чтобы образовывать устойчивые координационные связи. Карбонильные атомы кислорода полипептидной цепи с четырех сторон стабилизируют дегидратированные ионы K^+ , выполняя функцию заместителя гидратной оболочки во время движения ионов через пору [21]. Когда в лаборатории МакКиннона была получена кристаллическая структура бактериального K^+ канала KcsA [22], было доказано, что гипотеза, предложенная Ходжкиным в 1955 году для калиевого тока в гигантском аксоне кальмара, верна: ионы двигаются в пору друг за другом по очереди [23]. При движении извне внутрь клетки ионы K^+ сначала попадают во внешний вестибюль, затем, лишаясь гидратной оболочки, проходят через селективный фильтр, во внутренней полости канала обратно гидратируются и выходят через внутренние ворота. Также ионы могут двигаться и в обратном направлении [24].

Потенциал-чувствительный домен отвечает за способность K_v каналов реагировать на изменение потенциала на мембране клетки. Происходит своеобразная конверсия энергии электрического поля, накопленной на мембране, в механическую энергию, которая передается на поровый домен, заставляя его менять конформацию и открывать пору. S4 при этом выполняет функцию сенсора потенциала из-за обилия положительно заряженных аминокислотных остатков [25]. Движение сенсора потенциала, делающее возможным открытие поры канала, требует физического взаимодействия между некоторыми аминокислотными остатками ТМ S6 и примембранной спирали между S4 и S5 [26, 27]. Цитоплазматический домен принимает важное участие в регуляции работы канала, например, в инактивации N-типа (см. ниже), а также в некоторых случаях в тетрамеризации α -субъединиц [28].

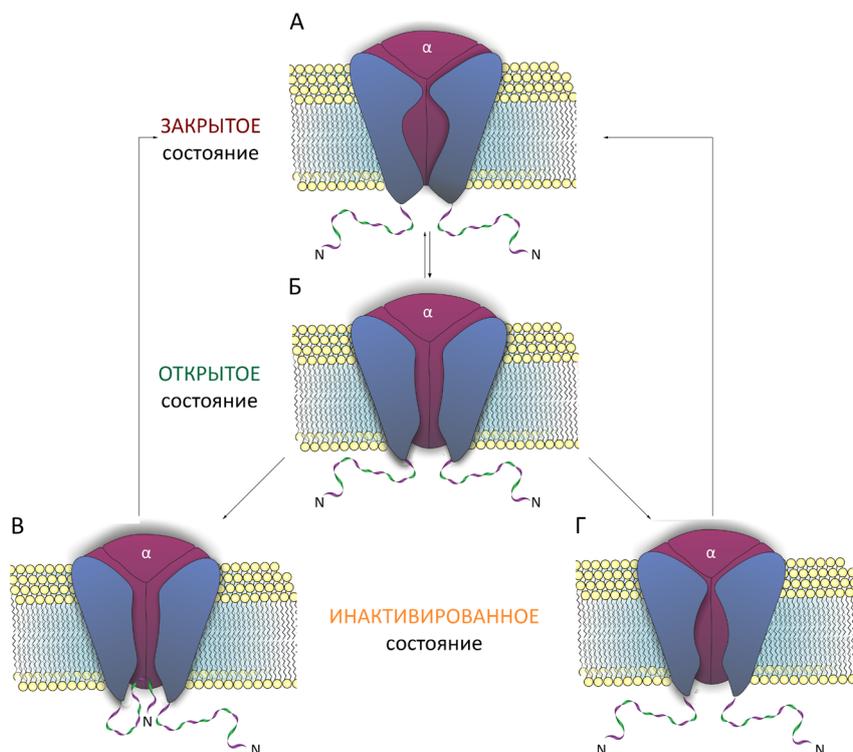


Рис. 3. Схематическое изображение механизма работы потенциал-зависимого K^+ канала.

А – закрытое состояние, Б – открытое (активированное) состояние, В – инактивация N-типа, Г – инактивация С-типа.

МЕХАНИЗМ РАБОТЫ K^+ КАНАЛОВ

Механизм работы K_v каналов подразумевает переход этих белков в различные конформационные состояния (рис. 3). При потенциале покоя K_v каналы находятся в закрытом состоянии, через такие каналы ток ионов не проходит. Открытие каналов возможно в ответ на рост мембранного потенциала (деполяризацию) [29], который действует на заряженные аминокислотные остатки сенсора потенциала [30]. Трансмембранный сегмент S4 реагирует на эти изменения, что приводит к конформационным изменениям потенциал-чувствительного домена, передающимся на поровый домен [31]. Изменения потенциала могут быть незначительными, но за счет исключительной чувствительности сенсора канал реагирует даже на них [32]. Пора открывается тогда, когда активируются все четыре сенсора потенциала [33]. В открытом

состоянии канал начинает пропускать ионы, пока не перейдет в фазу инактивации.

Инактивация K_v возможна по двум различным сценариям, которые получили названия инактивации N- и C-типа. Инактивация N-типа заключается в том, что подвижный N-концевой участок α -субъединицы канала блокирует пору с внутренней стороны. Конформация канала при этом соответствует открытому состоянию [34]. Удаление этого участка приводит к тому, что инактивация перестает протекать по механизму N-типа, а возвращение его в систему в виде отдельной пептидной молекулы нормализует инактивацию [35, 36]. Более медленная инактивация C-типа протекает даже без N-концевого цитоплазматического участка канала [37]. Структурные детерминанты, отвечающие за этот тип инактивации, расположены во внешнем вестибуле селективного фильтра [38], а также недалеко от N-конца S6 [39]. Инактивация C-типа происходит за счет конформационных изменений во внешнем вестибуле канала и сужения устья, что приводит к остановке тока ионов [40]. Понижение потенциала до состояния покоя (реполяризация) приводит к тому, что каналы переходят из инактивированного в закрытое состояние.

III. ЛИГАНДЫ K^+ КАНАЛОВ

Лиганды, связывающиеся с K^+ каналами, можно разделить на несколько групп, основными из которых являются: ионы металлов [41], небольшие органические молекулы [42] и полипептидные токсины [43]. Все лиганды K^+ каналов по своей функциональной природе можно разделить на поровые блокаторы и модуляторы. Первые, как следует из названия, блокируют ионный ток, проходящий через канал, путем взаимодействия с поровой областью мембранного белка [44]. Модуляторы не блокируют ток напрямую, а могут взаимодействовать с другими участками канала (например, с сенсорным доменом или вспомогательной β -субъединицей) и, например, модифицировать его функциональные свойства (рис. 4) [45, 46].

Помимо указанных основных групп лигандов, для некоторых изоформ K^+ каналов были получены антитела, способные селективно блокировать ионный ток [47]. Были обнаружены лиганды K^+ каналов в секрете паразитических червей [48], а также показан эффект дефензинов из различных источников на калиевый ток [49, 50].

Ионы таких металлов, как Cs^+ , Ba^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} и другие, выступают в роли неселективных блокаторов большинства изоформ K^+ каналов, действуя в миллимолярных концентрациях [51]. Ионы металлов главным образом использовались на ранних этапах

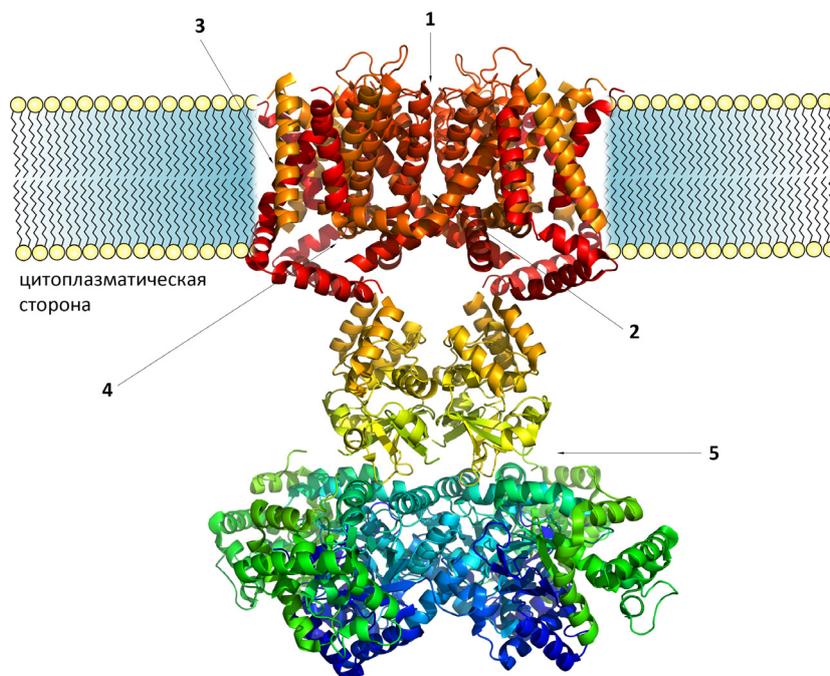


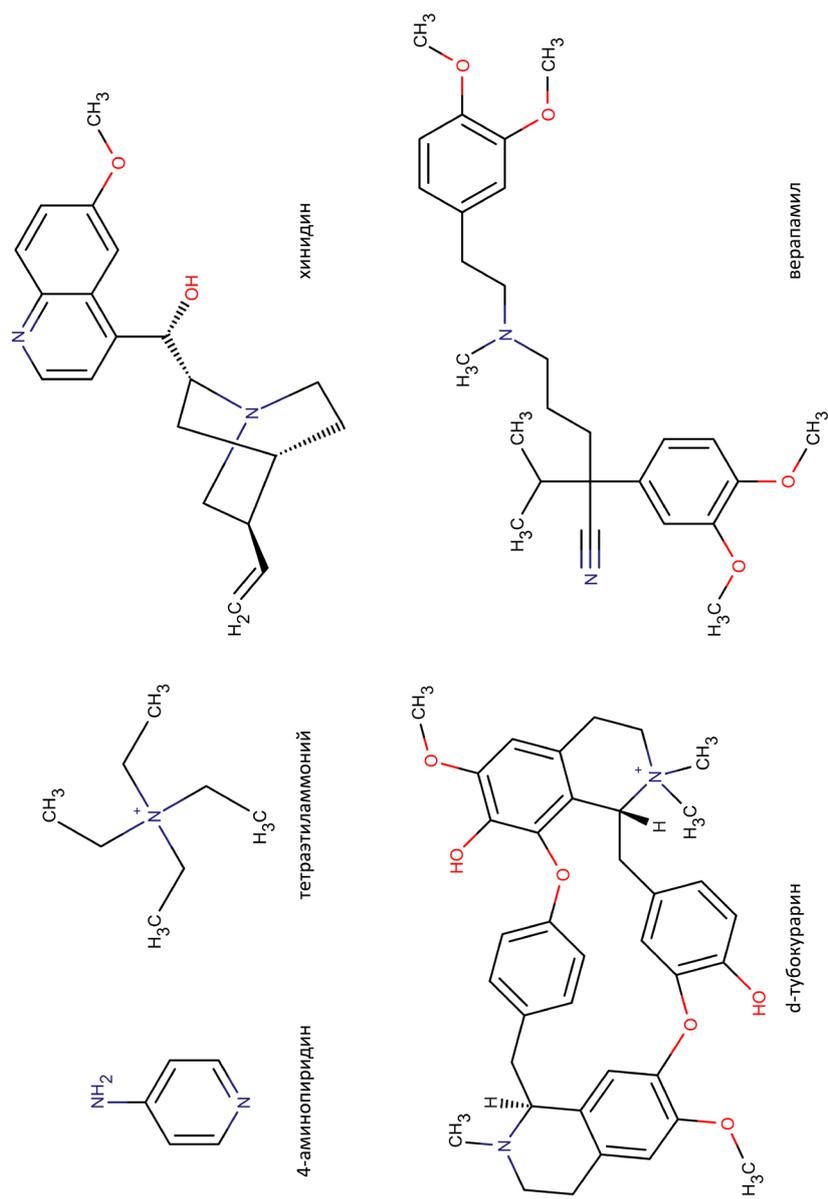
Рис. 4. Сайты взаимодействия различных лигандов с K^+ каналами.

1 – блокаторы внешней части поры, 2 – блокаторы внутренней части поры, 3, 4 – модуляторы, действующие с наружной и внутренней стороны мембраны, 5 – ингибиторы инактивации.

изучения основ работы K^+ каналов [52], а в настоящее время это место принадлежит более аффинным и селективным лигандам [53].

НЕБОЛЬШИЕ ОРГАНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЫ

На раннем этапе изучения ионных токов для фармакологической идентификации K^+ каналов использовались, в основном, два агента: 4-аминопиридин (4-АП) и тетраэтиламмоний (ТЭА), ингибирующие большинство K^+ каналов в миллимолярных концентрациях без воздействия на Na^+ и Ca^{2+} каналы [54, 55]. Для некоторых K^+ каналов, таких как $K_v3.1$ или $K_v4.1$, не было найдено ни одного другого низкомолекулярного лиганда [53]. Органические соединения (хинидин, d-тубокурарин и верапамил), связывающиеся с внутренней частью поры канала, также действуют на широкий спектр K^+ каналов [56–58]. Некоторые низкомолекулярные лиганды K^+ каналов показаны на рис. 5.

Рис. 5. Неселективные блокаторы K^+ каналов: 4-АП и ТЭА, хининдин, d-тубокурарин и верапамил.

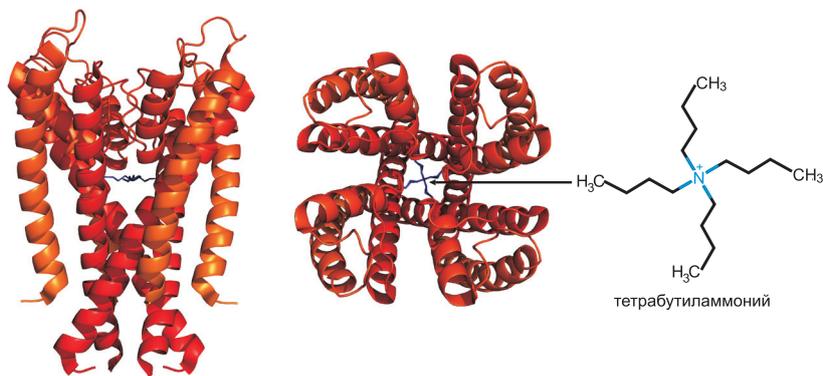


Рис. 6. Пространственная структура комплекса KcsA с тетрабутиламмонием (PDB ID: 2JK5), канал находится в закрытом состоянии.

Представлены проекции канала сбоку и с внеклеточной стороны; справа продемонстрирована структурная формула блокатора.

ТЭА и молекулы с похожим типом строения блокируют K^+ каналы как с внеклеточной, так и с цитоплазматической стороны [59]. Другие гидрофобные катионы (d-тубокурарин и верапамил), также «затыкают» своей аммониевой или аминной группой внутреннюю часть поры, что блокирует калиевый ток (рис. 6) [60]. Несколько другой механизм описан для 4-АП, который обладает весьма сходными с гидрофобными катионами молекулярными характеристиками: взаимодействует с каналом в открытом состоянии, конкурирует с ТЭА за сайт связывания в открытом канале и остается связанным с каналом в закрытом состоянии. Однако маленький размер 4-АП не позволяет молекуле «закупоривать» пору. Согласно современным представлениям, сайт 4-АП располагается в полости между ТМ сегментами S6 [61]. Когда канал открывается, блокатор достигает своего сайта и связывается с ним, что стабилизирует канал в закрытом состоянии, при котором ток ионов невозможен [62].

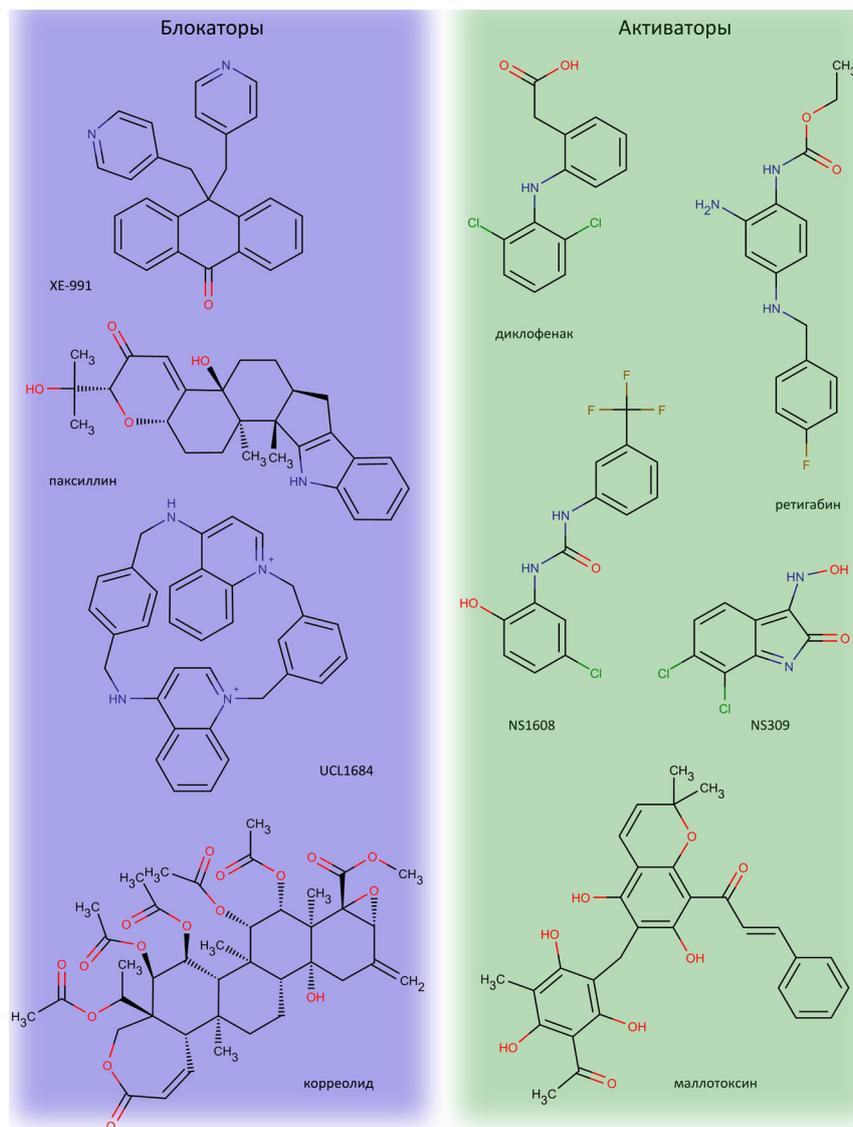
В дополнение к описанным выше неселективным соединениям добавился внушительный список блокаторов и активаторов K^+ каналов, действующих с высокой избирательностью. Такие вещества изначально разрабатывались как прототипы лекарственных препаратов, а некоторые из них уже находятся в клинической практике [53]. Ниже в табл. 1 представлен список наиболее «популярных» блокаторов и активаторов K^+ каналов, известных в настоящее время, а на рис. 7 изображены структурные формулы некоторых из них.

Таблица 1. Наиболее известные блокаторы и активаторы
K⁺ каналов

K ⁺ канал	Блокаторы	Активаторы
K_{ir}		
K _{ir} 1.1		–
K _{ir} 2.1	спермин, спермидин, путресцин	–
K _{ir} 2.2	спермин, спермидин	–
K _{ir} 2.3	спермин, спермидин	тенидап, арахидоновая кислота
K _{ir} 2.4	–	–
K _{ir} 3.1	–	–
K _{ir} 3.2	галотан, флуоксетин, SCH23390, верапамил ¹	–
K _{ir} 3.3	–	–
K _{ir} 3.4	4-АП ¹ , ТЭА ¹	–
K _{ir} 4.1	–	–
K _{ir} 4.2	–	–
K _{ir} 5.1	–	–
K _{ir} 6.1	глибенкламид	диазоксид, пинацидил, никорандил
K _{ir} 6.2	глибенкламид	диазоксид, пинацидил, никорандил, кромакалин
K _{ir} 7.1	–	–
K_{2P}		
K _{2P} 1.1	–	–
K _{2P} 2.1	хинидин ¹	рилузол, арахидоновая кислота
K _{2P} 3.1	анандамид	галотан, изофлуран
K _{2P} 4.1	–	арахидоновая кислота, рилузол
K _{2P} 5.1	лидокаин, хинидин	галотан
K _{2P} 6.1	хинидин	арахидоновая кислота
K _{2P} 9.1	рутениевый красный	–
K _{2P} 10.1	хинидин	арахидоновая кислота, рилузол, галотан, изофлуран
K _{2P} 13.1	галотан	арахидоновая кислота
K _{2P} 16.1	хинидин, хлороформ	изофлуран
K _{2P} 17.1	хлороформ	местные анестетики
K _{2P} 18.1	хинидин	местные анестетики
K_v		
K _v 1.1	ТЭА, 4-АП, дилтиазем, капсаицин	–
K _v 1.2	ТЭА, 4-АП, дилтиазем, капсаицин	–
K _v 1.3	ТЭА, 4-АП, корреолид ² , РАР-1, налтрексон, СР339818	–
K _v 1.4	ТЭА, 4-АП, UK78282, рилузол, хинидин, никардипин	–
K _v 1.5	ТЭА, 4-АП, AVE0118, S9947, флекаинид, хинидин	–
K _v 1.6	ТЭА, 4-АП	–

K _v 1.7	ТЭА, 4-АП, флекаинид, хинидин, верапамил, амиодарон	–
K ⁺ канал	Блокаторы	Активаторы
K _v 1.8	ТЭА, 4-АП, кетоконазол, пимозид, верапамил	цГМФ
K _v 2.1	ТЭА, 4-АП, галотан	линолевая кислота
K _v 2.2	ТЭА, 4-АП, хинин, фенциклидин	–
K _v 3.1	ТЭА, 4-АП, флекаинид, дилтиазем	–
K _v 3.2	ТЭА, 4-АП, верапамил, 8-бром-цГМФ	–
K _v 3.3	ТЭА, 4-АП	–
K _v 3.4	ТЭА, 4-АП	–
K _v 4.1	ТЭА, 4-АП	–
K _v 4.2	ТЭА, 4-АП, арахидоновая кислота	–
K _v 4.3	4-АП, никотин	–
K _v 7.1	ХЕ-991 ² , линопирдин L735821, хроманол 293Б, мефлохин	L364373, мефенамовая кислота
K _v 7.2	ХЕ-991, линопирдин	ретигабин ² , BMS204352, S-1
K _v 7.3	ХЕ-991, линопирдин	ретигабин, BMS204352, диклофенак ²
K _v 7.4	ХЕ-991, линопирдин, бепридил	ретигабин, BMS204352, S-1
K _v 7.5	ХЕ-991, линопирдин	ретигабин, BMS204352, S-1
K _v 10.1	хинидин	–
K _v 10.2	хинидин	–
K _v 11.1	астемизол, E4031, сертиндол, дофетилид, терфенадин	маллотоксин ² , RPR260243
K _v 11.2	сипатригин	–
K _v 11.3	сертиндол, пимозид	–
K _v 12.1	–	–
K _v 12.2	–	–
K _v 12.3	–	–
BK_{Ca}		
K _{Ca} 1.1	ТЭА, паксиллин ²	NS16082, NS1619, BMS204352, DHS-1, эстрадиол
K _{Ca} 4.1	ТЭА, хинидин, бепридил	битионол
K _{Ca} 4.2	ТЭА, хинидин	–
K _{Ca} 5.1	ТЭА	–
SK_{Ca}		
K _{Ca} 2.1	UCL1684 ² , NS8593, флуоксетин, d-тубокурарин ¹ ,	NS309 ² , DC-EBIO, рилузол, EBIO
K _{Ca} 2.2	UCL1684, NS8593, d-тубокурарин	NS309, DC-EBIO, рилузол, EBIO, CyPPA
K _{Ca} 2.3	UCL1684, NS8593	NS309, DC-EBIO, рилузол, EBIO, CyPPA
K _{Ca} 3.1	TRAM-3, TRAM-34, ICA-17043, клотримазол	NS309, DC-EBIO, рилузол, EBIO

¹ – неселективные блокаторы, изображенные на рис. 5,
² – блокаторы и активаторы, представленные на рис. 7.
Информация по данным Международного союза фундаментальной и клинической фармакологии (IUPHAR) [2, 4, 6, 7].

Рис. 7. Некоторые низкомолекулярные блокаторы и активаторы K^+ каналов.

ПОЛИПЕПТИДНЫЕ ТОКСИНЫ

Большое количество полипептидных лигандов K^+ каналов было идентифицировано в яде целого ряда животных, таких как пчелы, змеи, морские анемоны, улитки конусы, пауки и скорпионы. Эти вещества, часто называемые токсинами, синтезируются в ядовитых железах в виде предшественников, которые после процессинга превращаются в активные молекулы [63, 64].

В настоящее время описано огромное количество ядовитых животных, но яды лишь немногих изучались, а детальную характеристику получили только некоторые из них. Это связано с тем, что яды представляют собой сложные смеси множества компонентов, изучение которых может занимать несколько десятков лет [65, 66]. Существуют две основные стратегии в исследовании яда (рис. 8): первая, традиционная, основывается на непосредственной работе с ядом и выделением из него активных соединений с помощью различных хроматографических методов [67]; вторая, более молодая, сопряжена со стремительным развитием технологий секвенирования ДНК и базируется на конструировании и анализе библиотек кДНК на основе мРНК из ядовитых желез животного [68, 69].

Для реализации первой стратегии необходимо достаточное количество цельного яда, полученного из ядовитых желез, например, электростимуляцией. Яд подвергают серии хроматографических разделений: на начальных стадиях обычно используют эксклюзионную хроматографию, а затем полученные фракции разделяют с помощью нескольких раундов ионообменной и/или обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). И наконец, полипептидные компоненты, выделенные в индивидуальном состоянии, секвенируют посредством N-концевой ступенчатой деградации по Эдману [70].

Часто основными действующими компонентами яда животных являются пептиды. Их первичная структура может быть установлена в результате секвенирования мРНК, выделенной из ядовитых желез. На основе этих мРНК с помощью обратной транскрипции получают соответствующую кДНК и секвенируют ее. После этого анализируют всю библиотеку кДНК или отдельные последовательности [71]. С помощью трансляции *in silico* получают аминокислотные последовательности, а соответствующие им пептиды производят химическим синтезом или в рекомбинантных системах [72]. Богатая информация может быть получена в результате секвенирования всего генома ядовитых животных, однако в настоящее время полноразмерные геномы расшифрованы лишь для ограниченного числа видов [73–76].

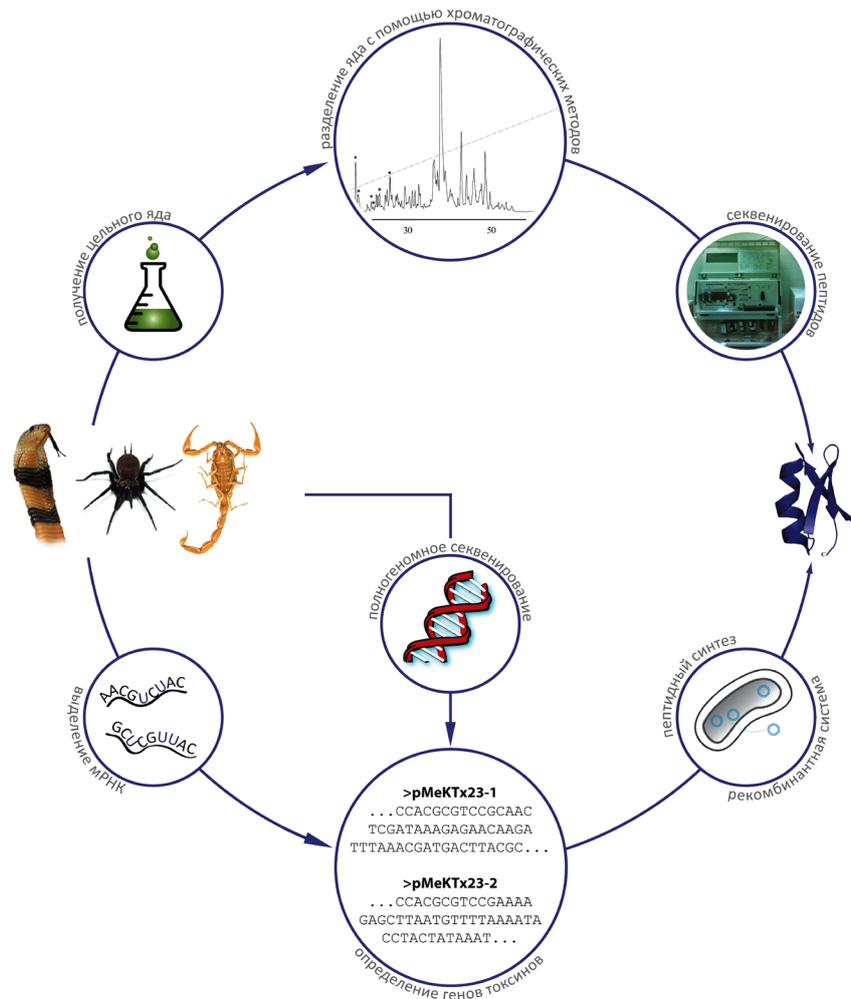


Рис. 8. Основные стратегии идентификации активных пептидов в яде животных.

Первая основывается на работе с цельным ядом и непосредственном выделении из него активных компонентов, вторая предполагает исследование компонентов яда посредством конструирования библиотек кДНК из мРНК ядовитых животных и последующего получения интересных молекул химическим синтезом или в рекомбинантных системах.

Традиционные подходы поиска и характеристики лигандов K^+ каналов основываются на электрофизиологических измерениях (методы локальной или двухэлектродной фиксации потенциала) [77, 78] или на радиолигандном анализе [79, 80]. При использовании электрофизиологических методов измерения проводятся на искусственных мембранах, эукариотических клетках или ооцитах лягушки *Xenopus laevis*, экспрессирующих гены канальных белков. В радиолигандном анализе используются меченные радиоактивными изотопами лиганды к определенным каналам, а активность исследуемых образцов анализируется по вытеснению ими радиоактивных меток из комплекса. В последнее время широкое развитие получили подходы, основанные на использовании флуоресцентно-меченых лигандов вместо лигандов с радиоактивной меткой [81]. Исследователи используют такие методы как флуоресцентная проточная цитометрия [82] и флуоресцентная микроскопия отдельных молекул [83].

Группы животных, в ядах которых в настоящее время идентифицированы лиганды K^+ каналов, далее будут рассматриваться в следующем порядке: позвоночные, морские беспозвоночные и наземные беспозвоночные.

Змеи

В настоящее время известно порядка 2650 видов змей, из которых 500 считаются ядовитыми [84]. Наиболее опасные представители относятся к семействам Viperidae (гадюки и гремучие змеи) и Elapidae (кобры и крайты) [85]. В состав яда змей входит широкое разнообразие биоактивных компонентов: ферменты, полипептиды с антикоагулянтной, гемолитической, гипотензивной и прочими активностями, а также другие органические молекулы, например, нуклеотиды [86]. Среди этого многообразия найдены полипептидные токсины, воздействующие на мембранные белки, в частности K^+ каналы [87]. Блокаторы K^+ каналов были обнаружены в яде змей рода *Dendroaspis* (мамбы) и получили название дендротоксинов (рис. 9А) [88]. Молекулы, состоящие из 57–60 аминокислотных остатков (табл. 2), шесть из которых остатки цистеина, формирующие в пространстве укладку типа Кунитца. Расположение дисульфидных связей следующее: C^1-C^6 , C^2-C^4 и C^3-C^5 [89]. Для дендротоксинов было отмечено наличие только одной посттрансляционной модификации – циклизации N-концевого глутамина в пироглутамат.

Дендротоксины активны по отношению к K_v каналам ($K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.6$) и действуют в диапазоне от пико-/наномолярных концентраций [90, 91].

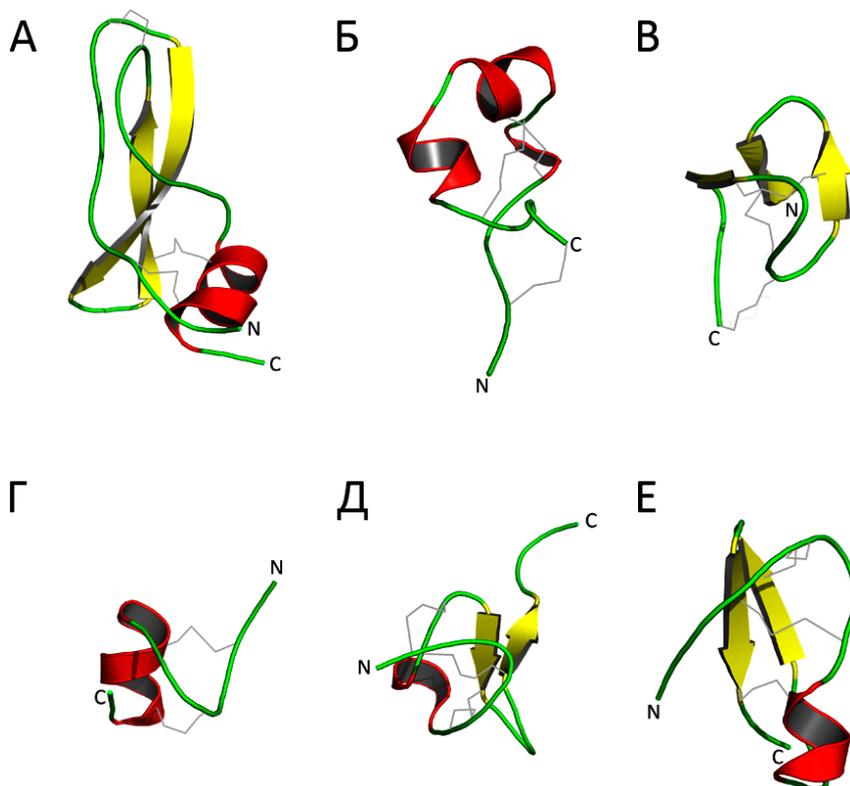


Рис. 9. Пространственные структуры лигандов калиевых каналов.

А – Блокатор K_v каналов I-DTX (PDB ID: 1DEM), выделенный из яда змеи *Dendroaspis polylepis polylepis*.

Б – Высокоаффинный блокатор K^+ каналов ShK (PDB ID: 1ROO), выделенный из яда морской анемоны *Stichodactyla helianthus*.

В – Блокатор K_v каналов κ -PVIIA (PDB ID: 1AV3), выделенный из яда моллюска *Conus purpurascens*.

Г – Пептидный лиганд K^+ каналов – тертиапин (PDB ID: 1TER), выделенный из яда пчелы *Apis mellifera*.

Д – Ханатоксин (PDB ID: 1D1H), выделенный из яда чилийского паука птицеда *Grammostola rosea*.

Е – Ноксиустоксин (PDB ID: 1SXM), выделенный из яда скорпиона *Centruroides noxius*.

Таблица 2. Основные представители токсинов змей, действующих на K⁺ каналы

Токсин	ID [#]	Аминокислотная последовательность	Активность
<i>Dendroaspis angusticeps</i>			
α -DTX	P00980	ZPRRKLСІІLHRNPGRCYDKI PAFYYNQKKKQСERFDWSGGGNSNRFKTEECRRRTСIG	I
δ -DTX	P00982	AAKYСKLPVRYGFCCKKKI PSFYWKWKAQСLPPFDYSGGGNANRFKTEECRRRTСVG	I
E-DTX	P00984	LQHRTFCKLPAEFGPCSKASI PAFYYNWAAKKСQLFHYGGCKGNANRFSTIEKСRHAСVG	I
<i>Dendroaspis polylepis polylepis</i>			
I-DTX	P00979	ZLRKLCІІLHRNPGRCYQKI PAFYYNQKKKQСEGFTWSGGGNSNRFKTEECRRRTСIRK	I
B-DTX	P00983	RPYACELIYAAAGPCMFFFISA FYYSKGANKСYRFFYSGCRGNANRFKTEECRRRTСVV	I
K-DTX	P00981	AAKYСKLPRLRIGFCCKRKKI PSFYWKWKAQСLPPFDYSGGGNANRFKTEECRRRTСVG	I

[#] – код в базе данных UniProt. Z – остаток пироглутаминовой кислоты.

Здесь и далее цифрами будет обозначаться активность по отношению к различным K⁺ каналам. I – активность в отношении K_v. Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом.

Морские анемоны

Морские анемоны, также называемые актиниями (Actiniaria), принадлежат к классу коралловых полипов (Anthozoa). Большинство представителей – одиночные сидячие организмы, обитающие на твердом морском грунте [92].

Цельный яд морских анемонов – это, как и в случае со змеями, смесь множества компонентов: актинопоринов (~20 кДа), формирующих поры в липидном бислое [93], лигандов потенциал-зависимых Na^+ каналов [94], блокаторов K^+ каналов [95] и других полипептидов, например, лигандов кислоточувствительных каналов [96] и термо-рецепторов [97].

В настоящее время известно более 25 полипептидов из яда анемонов, действующих на K^+ каналы [98]. В структурном отношении все эти молекулы можно разделить на три группы [99]. К первой принадлежат полипептиды AeK, BgK, HmK и ShK, состоящие из 34–37 аминокислотных остатков, шесть из которых – остатки цистеина, а расположение дисульфидных связей следующее: $\text{C}^1\text{--C}^6$, $\text{C}^2\text{--C}^4$ и $\text{C}^3\text{--C}^5$ [95, 100–102]. В результате в пространстве формируются структуры, представленные комбинацией α - и/или 3_{10} -спиралей (рис. 9Б) [85]. Вторая группа включает молекулы AsKC1 и APETx1, имеющие 58–65 аминокислотных остатков, шесть из которых цистеины, а расположение дисульфидных связей следующее: $\text{C}^1\text{--C}^6$, $\text{C}^2\text{--C}^4$ и $\text{C}^3\text{--C}^5$ [103, 104]. Пространственная структура таких полипептидов представлена укладкой типа Кунитца [99]. Наконец, молекулы третьей группы блокаторов K^+ каналов из яда анемонов (BDS-I, Am II и APETx1) состоят из 42–48 аминокислотных остатков, также имеют три дисульфидные связи, но располагаются они следующим образом: $\text{C}^1\text{--C}^5$, $\text{C}^2\text{--C}^4$ и $\text{C}^3\text{--C}^6$ [105–107]. Пространственная укладка полипептидов данной группы образована несколькими β -тяжами [85]. Аминокислотные последовательности некоторых блокаторов приведены в табл. 3. У активных полипептидов из яда морских анемонов иногда встречаются посттрансляционные модификации, такие как образование 4-гидроксипролина из пролина, а также амидирование С-концевого аминокислотного остатка [106]. Как правило, полипептиды из яда актиний действуют на K_v , в том числе на K_v11 и $\text{K}_v3.4$ [105, 107], а также на IK_{Ca} [108] в пико- и наномолярных концентрациях.

Таблица 3. Основные представители токсинов морских анемонов, действующих на K⁺ каналы

Токсин	ID	Аминокислотная последовательность	Активность
AcK	P81897	GCKDNFSANTCKHVKANNNCGSQKYATNCAKTCGGK <i>Actinia equina</i>	1
AETX K	Q0EAE5	ACKDYLPKSECTQFRCTSMKYKUTNCKKTCGTC <i>Anemonia erythraea</i>	1
BDS-I	P11494	AAPFCSSGKPRGDLWILRGTCPPGGYGTSNCKWPNICCCYPRH <i>Anemonia sulcata</i>	1
AsKS	Q9TWG1	ACKDNFAAATCKHVKENKNCSSQKYATNCAKTCGGK	1
AsK1	Q9TWG0	INKDCLLPMDVGRCSRASHPRYYNSSSKRCEKFIYGGCRGNANFHTLEECCKYCCVVR <i>Antheopsis maculata</i>	1
Am II	P69930	ALLSCFCEGKTEYGDKWI.FHGGCCNNYGYNYKCFMFKRPGAVCCYPRQNGR-NH ₂	5
APETx1	P61541	GTTCYCGKTIIGIYWFCTKTCPSNRGYTGS CGYFLGICCCYPPVD <i>Anthopleura elegantissima</i>	5
BcsTx1	C0HJC2	ACIDRFTGTCKHVKKGGCKNSQKYRINCAKTCGLCH <i>Bunodosoma caissarum</i>	1
BgK	P29186	VCRDWEKETACRHAKSIGNCRTSQKYRANCAKTCCLC <i>Bunodosoma granuliferum</i>	1, 4
κ-TATX	E2S064	RTCIDTIPKSRCTAFQCKNSMKYRLSFCRKTCCGTC <i>Cryptodendrum adhaesivum</i>	1
HmK	O16846	RTCDDLLPVSECTDIRCTSMKYRLNLCRKTCCGSC <i>Heteractis magnifica</i>	1
ShK	P29187	RSCIDTIPKSRCTAFQCKNSMKYRLSFCRKTCCGTC <i>Stoichactis helianthus</i>	1, 4

1, 4, 5 – активность в отношении K_v (кроме K_v11 каналов), K_{cs} и K_v11, соответственно.O – остаток 4-гидроксипролина, остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. -NH₂ обозначает амидирование.

Конусы

Конусы – хищные морские моллюски из семейства Conidae, включающего порядка 600 видов [109]. Главное оружие конусов – короткие дисульфид-содержащие пептиды, которые получили название конопептидов [110].

Конопептиды, действующие на K^+ каналы (к-конотоксины), весьма разнообразны, и их можно разделить на несколько групп согласно первичной структуре [111]. Аминокислотные последовательности некоторых блокаторов приведены в табл. 4. кА-Конотоксины (Ac4.2, MIVA, PIVF, SmIVA, SIVA и другие) – пептиды, состоящие из 24–37 аминокислотных остатков, шесть из которых – остатки цистеина, формирующие мотив СС-С-С-С-С. Дисульфидные связи могут располагаться двумя способами: C^1-C^5 , C^2-C^3 и C^4-C^6 или C^1-C^3 , C^2-C^5 и C^4-C^6 [112–114]. кО-Конотоксины (например, PVIIA) – короткие (~27 аминокислотных остатков) пептиды, также имеющие шесть остатков цистеина, но их расположение отличается от кА-конотоксинов: С-С-СС-С-С. Расположение дисульфидных связей следующее: C^1-C^4 , C^2-C^5 и C^3-C^6 (рис. 9В) [115, 116]. кМ-Конотоксины (RIIIJ и RIIIK) состоят из 24–25 аминокислотных остатков, а количество цистеинов и расположение дисульфидных связей такое же, как у кО-конотоксинов. Однако остатки цистеина у них и формируют мотив СС-С-С-СС [117, 118]. Еще одна группа, кI-конотоксины (BeTx, SrXIA и ViTx), представлена молекулами, состоящими из ~30 аминокислотных остатков (восемь остатков цистеина образуют четыре дисульфидные связи, замыкающиеся различными способами). В данном случае остатки цистеина формируют мотив С-С-СС-СС-С-С [119–122]. Встречаются в яде конусов и конопептиды (~25 аминокислотных остатков), действующие на K^+ каналы, с двумя дисульфидными связями – это кL-конотоксины (vill4a) и кJ-конотоксины ($\alpha/k-p114a$). Расположение остатков цистеина у них одинаковое: С-С-С-С, а вот расположение дисульфидных связей разное: C^1-C^4 , C^2-C^3 для кL и C^1-C^3 , C^2-C^4 для кJ [123, 124]. Кроме того, стоит отметить еще две интересные молекулы: конкунитцин-S1 (Conk-S1, 60 аминокислотных остатков), имеющий укладку типа Кунитца при всего двух дисульфидных связях (C^1-C^4 , C^2-C^3) [125], а также контрифан-Vn (Con-Vn), конотоксин, состоящий из девяти аминокислотных остатков и имеющий одну дисульфидную связь [126]. Такая вариация расположения остатков цистеина и дисульфидных связей влечет за собой широкое разнообразие типов пространственной укладки к-конотоксинов. Это может быть «цистиновый узел» (ICK, см. ниже), как в случае PVIIA [116], укладка типа Кунитца [127] и даже мотив спираль-петля-спираль [123].

Таблица 4. Основные представители конотоксинов, действующих на K⁺ каналы

Токсин	ID	Аминокислотная последовательность	Актив-ность
<i>Conus achatinus</i>			
κ-Ac4.2	A3DT44	AOWMVVTA ^T TN CC GYTGPACHOC LC TQSC-NH ₂	1
<i>Conus betulinus</i>			
BeTx	Q9U3Z3	CRA E GT Y C E ND S Q CC LN E CCWGGCGHOC R HP-NH ₂	2
<i>Conus magus</i>			
κ-MIVA	P0C1X1	AOELVVTA ^T TN CC GYNOMT I COOC M CT Y SCOO K RKO-NH ₂	1
<i>Conus monile</i>			
κ-Mo1659	P84713	FHGGSWYRFPWGY-NH ₂	1
<i>Conus planorbis</i>			
α/κ-pl14a	Q0N4U8	FPR P RI C N L A C RAGIGHKY P F C H C R-NH ₂	1
<i>Conus purpurascens</i>			
κ-PIVF	P0C2C6	D CC GV K LEM C H P C LDNS C KKSGK-NH ₂	1
κ-PVIA	P56633	C R ION Q K C FQHLDD CC SR K CNR F N K CV	1
<i>Conus radiatus</i>			
κ-RIIIJ	P0CG45	LO CC TO OK KKH CO AO AC K Y K OC CK S	1
κ-RIIIK	P69769	LO CC SL N L R L CO VO AC K R NO CC T-NH ₂	1
<i>Conus spurius</i>			
κ-SrXIA	P0C615	C R TE G M S C E EN Q CC W R S CC R G EC E AP C R F GP-NH ₂	1
<i>Conus stercusmuscarum</i>			
κ-SmIVA	P0CE75	Z T W L V P S T I T T CC GY D O G T M C O T C M D N T C K O K O K K S -NH ₂	1
<i>Conus striatus</i>			
κ-SIVA	P0C828	Z K S L V P S V I T T CC GY D O G T M C O O C R T N S C-NH ₂	1
Conk-S1	P0C1X2	K D R P S L CD L P AD S G S G T K A E K R I Y N S A R K Q CL R F D Y T G Q G G N E N N F R R T Y D C Q R T CL Y T -NH ₂	1
<i>Conus ventricosus</i>			
Con-Vn	P83047	G D C P W ^D K P W C-NH ₂	1, 2
<i>Conus villepinii</i>			
κ-vil14a	P84704	G G L G R C I Y N C M N S G G L S F I Q CK T M C Y	1
<i>Conus virgo</i>			
κ-ViTx	Q7YZS9	S R C F P P G I Y C T P Y L P CC W G I CC G T C R N V C H L R I-NH ₂	1

1, 2 – активность на K_v (кроме K_v11 каналов) и BK_{Ca} каналы, соответственно.

O – остаток 4-гидроксипролина, Z – остаток пироглутаминовой кислоты, E – остаток 4-карбоксиглутамата, T и S – O-гликозилированные аминокислотные остатки, W^D – остаток D-триптофана. Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. -NH₂ обозначает амидирование.

В молекулах как к-конотоксинов, так и других пептидов из яда конусов очень часто встречаются посттрансляционные модификации, некоторые из которых редко обнаруживаются у других организмов [128]. Наравне с циклизацией N-концевого глутамина, образованием гидроксипролина и C-концевым амидированием, встречающимися у токсинов других животных, можно обнаружить такие модификации, как образование остатков 4-карбоксиглутамата, O-гликозилирование серина и треонина [129], а также включение в состав полипептидной цепи D-аминокислот, например D-триптофана [130]. Основной мишенью к-конотоксинов являются K_v каналы, но для некоторых молекул отмечены эффекты на BK_{Ca} каналы [111].

Пчелы

Яд пчел изучен достаточно хорошо, а такие его компоненты, как мелиттин, секапин, апамин и тертиапин, уже стали классическими инструментами в разного рода исследованиях (рис. 9Г) [131]. Апамин и тертиапин – два коротких пептида, состоящие из 18 и 21 аминокислотного остатка, они действуют на различные K^+ каналы (табл. 5) [132, 133]. Их молекулы имеют посттрансляционную модификацию – амидированный C-концевой аминокислотный остаток; четыре остатка цистеина образуют две дисульфидные связи, располагающиеся следующим образом: C^1-C^3 , C^2-C^4 , а в пространстве формируется структура, имеющая короткий β -поворот и α -спираль [134–136]. Блокирующий эффект апамина направлен преимущественно на SK_{Ca} каналы [137, 138], в то время как тертиапин действует на BK_{Ca} [139] и K_{ir} каналы [140, 141].

Таблица 5. Основные представители коротких полипептидов из яда пчел, действующих на K^+ каналы

Токсин	ID	Аминокислотная последовательность	Актив-ность
<i>Apis mellifera</i>			
Апамин	P01500	CNCKAPETALCARRCQQH-NH ₂	3
Тертиапин	P56587	ALCNCNRILIRHMCWKKCGKK-NH ₂	2, 6

2, 3, 6 – активность на BK_{Ca} , SK_{Ca} и K_{ir} каналы, соответственно.

Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. -NH₂ обозначает амидирование.

Пауки

В настоящее время известно порядка 45 000 видов пауков [142], но из всего этого многообразия исследовались яды примерно ста видов [143], а детальную характеристику получили лишь некоторые [144]. Яды пауков – сложные смеси биологически активных веществ, компоненты которых можно разделить на три группы: низкомолекулярные (<1 кДа) вещества разнообразного строения, пептиды (1–10 кДа) и высокомолекулярные (>10 кДа) вещества – ферменты и нейротоксины [143]. Молекулы, действующие на K^+ каналы относятся ко второй группе, а по механизму действия, как правило, являются ингибиторами активации каналов, реализуя свой эффект через взаимодействие с сенсором потенциала [145]. Подобные токсины частично встраиваются в мембрану за счет гидрофобных аминокислотных остатков на поверхности, а затем взаимодействуют с сенсором потенциала и ингибируют активацию канала [146]. Эти токсины состоят из ~30–40 аминокислотных остатков (табл. 6), а расположение дисульфидных связей у них следующее: C^1-C^4 , C^2-C^5 и C^3-C^6 [147–150]. Пространственная структура представлена укладкой типа «цистиновый узел» (ICK), характеризующейся наличием β -шпильки и своеобразного «узла» (отсюда название): третья по счету дисульфидная связь (C^3-C^6) пронизывает кольцо, образованное двумя другими дисульфидами и атомами основной цепи, их соединяющими (рис. 9Д). В случае некоторых полипептидов (κ -НХТХ и PNTx3-1) присутствует четвертая дисульфидная связь, но она является добавочной и радикально не влияет на тип пространственной укладки молекул [151]. Кроме того, в яде пауков найдены лиганды K^+ каналов с пространственной укладкой типа Кунитца, которые выступают в роли слабых поровых блокаторов [152].

Токсины пауков действуют в основном на K_v каналы: ханатоксин (HaTx1) активен по отношению к $K_{v2.1}$ [147], HpTx1 и PaTx1 – на K_v4 каналы [149, 153], ScTx1 и HmTx1 – на K_v2 и K_v4 [154]. Некоторые соединения, например, JZTX-I и VsTx1, показывающие активность на спектр потенциал-зависимых ионных каналов (Na^+ , Ca^{2+}), могут также ингибировать и K^+ каналы [155–157].

Таблица 6. Основные представители токсинов пауков, действующих на K⁺ каналы

Токсин	ID	Аминокислотная последовательность	Актив-ность
<i>Chilobrachys guangxiensis</i>			
JZTX-I	P83974	ACGQFVWKC G EGKPP CC ANFACKIGLYLCIWSP	1
JZTX-III	P62520	DGECGGFVWKC G RGKPP CC KGYACSKTWGWC A VEAP	1
JZTX-V	Q2PAY4	YCQKWMWTC D SKRAC CE GLR C KLW C RKII-NH ₂	1
<i>Grammostola rosea</i>			
HaTx1	P56852	ECRYLFGGCKTTS D CC K HLGCKFRDKY CA WDFTF S	1
VsTx1	P60980	ECGKFMWKC K NSND CC KDLV CS SRWKC V LASPF	5
GsMTx4	Q7YT39	GCLEFVWKC C PNDD CC RPKL C SKL F KL C NFSF-NH ₂	5
GsAFII	P61409	YCQKWMWTC D EERK CC EGLV C R L W C KKIEW	5
<i>Hadronyche versuta</i>			
κ-HXTX	P82227	T I CTGADRP CA ACC P CCPGT SC QGPESNGVVY C RNF	2
<i>Haplopelma schmidtii</i>			
HwTx-XI	P68425	ID T CRLPSDRGR CK ASFERWYFN GR T CA KFIYGGCGGNGNK FPTQE A CMKR CA KA	1
<i>Heteropoda venatoria</i>			
HpTx1	P58425	DCGTIWHYCGTDQ SE CC E GWK CS RQL C KYVIDW-NH ₂	1
<i>Heteroscodra maculata</i>			
HmTx1	P60992	ECRYLFGGCSST S D CC KHLS CR SDWKY CA WDGTF S	1
<i>Paraphysa scrofa</i>			
PaTx1	P61230	YCQKWMWTC D SARK CC EGLV C R L W C KKII-NH ₂	1
<i>Phoneutria nigriventer</i>			
PNTx3-1	O76200	A E CAAVYER CG KGYKR CC EER P CKCN I VMDN CT CKK F ISE	1
<i>Psalmopoeus cambridgei</i>			
VaTx1	P0C244	SECRWFMGGCD ST LD CC KHLS CK MGLY CA WDGTF-NH ₂	1
<i>Stromatopelma calceatum griseipes</i>			
SGTx1	P56855	T CRYLFGGCKT T AD CC KHL AC RS D GKY CA WDGTF	1
ScTx1	P60991	D CT RMFG AC RR DS D CC PHLG C KPT SK Y CA WDGT I -NH ₂	1
<i>Theraphosa blondi</i>			
TITx1	P83745	A AC LGM F ES CD PNND CC PN RE CNRKH K W C KYK L W	1
<i>Thrixopelma pruriens</i>			
ProTx1	P83480	ECRYWLGGCSAG QT CC K HLV CS RR H GW C VWDGTF S	1

1, 2, 5 – токсины, активные на K_v, BK_{Ca} и K_v11 каналы, соответственно.

Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом. -NH₂ обозначает амидирование.

Скорпионы

Огромную роль в изучении и понимании механизма работы, а также физиологической роли K^+ каналов сыграли полипептидные блокаторы из яда скорпионов (КТх). Интенсивные исследования в этой области начались более 30 лет назад, когда из яда скорпиона *Centruroides noxius* был выделен первый короткий пептид – ноксиустоксин (рис. 9Е) [158], влияющий на калиевый ток в гигантском аксоне кальмара [159]. Выделение харибдотоксина (ChTX) из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus* [160] и использование его для создания модели лиганд-рецепторного взаимодействия токсинов с каналами позволило достичь значительного успеха в понимании структурно-функциональных особенностей K^+ каналов [161, 162]. В дальнейшем целый ряд селективных блокаторов некоторых изоформ K^+ каналов был идентифицирован в яде различных скорпионов. Такие пептиды, как ибериотоксин [163], маргатоксин [164], калиотоксин [165] и агитоксин-2 [166], стали классическими «молекулярными инструментами» в области изучения K^+ каналов [167].

Структурные особенности блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов

Согласно базе данных UniProt известно около 250 блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов (КТх). Все они представляют собой небольшие полипептидные молекулы длиной ~20–75 аминокислотных остатков [168, 169] с 2–4 S–S-мостиками, а их молекулярная масса находится в диапазоне ~2400–8500 Да. Биосинтез этих полипептидов осуществляется в виде предшественников, на N-конце которых располагается сигнальный пептид, отщепляющийся во время созревания [170]. В ряде случаев сразу за сигнальным пептидом отмечено наличие пропептида с неизвестной функцией, который также отщепляется во время процессинга [171]. Некоторые пептиды претерпевают посттрансляционные модификации, такие как преобразование N-концевого глутамина в пироглутаминовую кислоту [172], C-концевое амидирование, образующееся из C-концевого остатка глицина, а также отщепление C-концевых положительно заряженных (лизин, аргинин) аминокислотных остатков [173].

В структурном отношении все блокаторы K^+ каналов из яда скорпионов можно разделить на пять классов (примеры пептидов с тем или иным типом укладки представлены на рис. 10):

1. Пептиды, имеющие тип укладки $CS\alpha/\beta$ (цистеин-стабилизированные α -спираль и β -слой). Это самый распространенный фолд среди токсинов скорпионов, он характерен не только для КТх, но

также для лигандов Na^+ каналов и группы хлоротоксин-подобных пептидов [174–176].

2. КТх, имеющие в своей структуре две параллельные α -спирали, соединенные двумя дисульфидными связями: $\text{CS}\alpha/\alpha$ 2(C-C) [168].

3. Пептиды, по первичной структуре аналогичные представителям первой группы, но имеющие иную третичную структуру: $\text{CS}\alpha/\alpha$ (цистеин-стабилизированные спираль-петля-спираль) – в результате альтернативного замыкания дисульфидных связей [177].

4. КТх с укладкой типа Кунитца, которая распространена среди ингибиторов сериновых протеаз [178].

5. КТх с укладкой «цистиновый узел» (ICK); такой тип укладки встречается у широкого спектра организмов: растений, грибов, беспозвоночных [179].

Ниже в табл. 7 представлена оценка числа известных КТх с тем или иным типом укладки, очевидно, что мотив $\text{CS}\alpha/\beta$ является доминирующим (информация взята из базы данных UniProt).

Таблица 7. Распределение КТх по классам согласно структурным особенностям
(Общее число описанных пептидов составляет порядка 247)

$\text{CS}\alpha/\beta$	$\text{CS}\alpha/\alpha$ 2(C-C)	$\text{CS}\alpha/\alpha$ 3(C-C)	укладка Кунитца	ICK
220	16	2	7	2
89,2%	6,4%	0,8%	2,8%	0,8%

КТх с типом укладки $\text{CS}\alpha/\beta$. Как уже было отмечено, $\text{CS}\alpha/\beta$ – самый распространенный тип укладки среди всех токсинов из яда скорпионов. Его характерной особенностью является наличие в аминокислотной последовательности консервативных мотивов CXXXC и CXC (где C – остаток цистеина, X – любой аминокислотный остаток). В структурно-функциональном отношении КТх с типом укладки $\text{CS}\alpha/\beta$ делятся на три семейства: α -КТх, β -КТх и γ -КТх [180].

Семейство α -КТх включает порядка 27 подсемейств [181] согласно сходству аминокислотных последовательностей представителей. В настоящее время известно около 165 полипептидов данного семейства, и их число постоянно растет. α -КТх состоят из ~20–40 аминокислотных остатков, шесть или восемь из которых – остатки

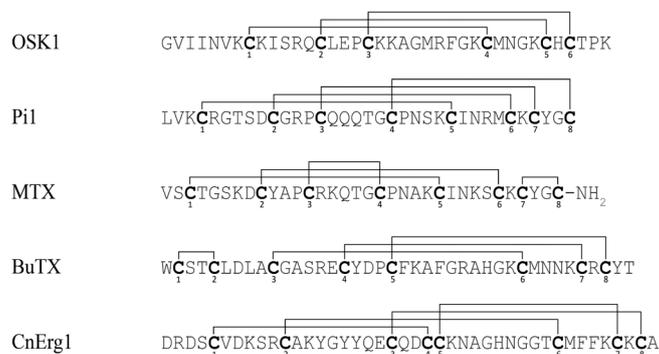


Рис. 11. Примеры расположения дисульфидных связей у представителей группы КТх с типом укладки CS α / β .

цистеина, формирующие три или четыре дисульфидные связи. Большинство известных блокаторов этой группы выделены из яда скорпионов семейства Buthidae, но α -КТх также встречаются среди представителей других семейств (Chactidae, Euscorpiidae, Vaejovidae, Caraboctonidae, Hemiscorpiidae и Scorpionidae) [182–184].

β -КТх больше по размеру, чем α -КТх, они содержат ~45–75 аминокислотных остатков вследствие наличия удлиненного N-концевого линейного участка. С-Концевой участок содержит шесть остатков цистеина, образующих три дисульфидные связи. Большинство β -КТх идентифицировано в яде скорпионов из семейства Buthidae (22 пептида), два β -токсина были обнаружены в транскриптоме и яде *Hadrurus gertschi* из семейства Caraboctonidae [169, 185]. Считается, что β -КТх, помимо активности на K⁺ каналы, обладают еще и цитолитической активностью, реализующейся за счет N-концевого линейного участка [186, 187].

γ -КТх в структурном отношении подобны α -КТх, содержат ~35–45 аминокислотных остатков с тремя или четырьмя дисульфидными связями, но главной особенностью этой группы является то, что они селективно действуют на определенный тип K_v каналов – K_v11. В настоящее время известно 29 γ -КТх, и все они идентифицированы в яде или транскриптоме ядовитых желез скорпионов семейства Buthidae [188, 189].

Как уже было отмечено, число дисульфидных связей у КТх с типом укладки CS α / β варьирует от трех до четырех. Интересно, что расположение S-S связей может быть различным (рис. 11), однако все молекулы этой группы имеют одинаковую укладку [190–194].

КТх с типом укладки CSa/α и двумя дисульфидными связями. Пептиды этой группы (κ-КТх) являются слабыми ингибиторами K⁺ каналов и были найдены только в яде скорпионов семейств Scorpionidae и Hemiscorpiidae. В структурном отношении κ-КТх состоят из ~20–25 аминокислотных остатков, четыре из которых – остатки цистеина, образующие две внутримолекулярные дисульфидные связи [168]. Остатки цистеина формируют консервативные мотивы C¹XXXC² и C³XXXC⁴ (где С – остаток цистеина, Х – любой аминокислотный остаток), а дисульфидные связи располагаются следующим образом: C¹–C⁴ и C²–C³ (рис. 12). Пространственная структура образована двумя параллельными α-спиралями.

Для обозначения этой группы пептидов используется префикс κ-, как и для токсинов группы 3 (с типом укладки CSa/α и тремя дисульфидными связями) [195].

КТх с типом укладки CSa/α и тремя дисульфидными связями. Недавно был обнаружен новый тип укладки у пептидов, расположение остатков цистеина которых считалось традиционным и встречалось у большинства CSa/β токсинов. У КТх данной группы, в отличие от токсинов с мотивом CSa/β, дисульфидные связи располагаются следующим образом: C¹–C⁵, C²–C⁴ и C³–C⁶ (рис. 13) вместо классического C¹–C⁴, C²–C⁵ и C³–C⁶, а их пространственная структура представляет собой две α-спирали, соединенные петлей. Пептиды данной группы принято называть κ-КТх, как и КТх с типом укладки CSa/α и двумя дисульфидными связями.

В настоящее время, известно только два коротких пептида (28–29 аминокислотных остатков) с таким типом укладки, выделенные из яда родственных скорпионов *Tityus serrulatus* и *Tityus trivittatus*, принадлежащих к семейству Buthidae [177].



Рис. 12. Расположение дисульфидных связей у κ-КТх на примере κ-хефутоксина.



Рис. 13. Расположение трех дисульфидных связей у пептидов, имеющих характерное для CSa/β расположение остатков цистеина, но формирующих фолд CSa/α.



Рис. 14. Расположение дисульфидных связей у блокаторов K^+ каналов с укладкой типа Кунитца.



Рис. 15. Расположение дисульфидных связей на примере λ -MeuTx – представителя КТх с фолдом ИСК.

КТх с укладкой типа Кунитца. КТх с подобным типом укладки имеют бифункциональные свойства: во-первых, практически все они являются ингибиторами протеолитических ферментов, например, трипсина, и действуют в наномолярных концентрациях; во-вторых, для некоторых отмечено наличие блокирующей активности по отношению к K_v каналам. В настоящее время известно семь молекул из яда скорпионов с подобными свойствами: шесть выделено из яда скорпионов семейства Buthidae, и одна – из Caraboctonidae [178]. КТх с укладкой типа Кунитца имеют в своем составе ~60–70 аминокислотных остатков, шесть или восемь из которых – остатки цистеина, образующие три или четыре внутримолекулярные дисульфидные связи (рис. 14) в порядке C^1-C^5 , C^2-C^3 и C^4-C^6 или C^1-C^7 , C^2-C^4 , C^3-C^5 и C^6-C^8 . Этот фолд представлен двумя антипараллельными β -тяжами и одним, реже двумя, спиральными участками [196]. Токсины этой группы было предложено называть δ -КТх.

КТх с укладкой типа цистиновый узел. В настоящее время известно около десяти пептидов из яда скорпионов, имеющих укладку типа цистиновый узел (ИСК), но только для двух из них показана активность на K^+ каналах. В структурном отношении КТх с укладкой ИСК (37 аминокислотных остатков) имеют β -слой, сформированный тремя антипараллельными β -тяжами, и 3_{10} -спираль [197]. Две дисульфидные связи C^1-C^4 и C^2-C^5 и атомы основной цепи образуют кольцо, через которое проходит третья дисульфидная связь C^3-C^6 (рис. 15). Помимо того, что токсины данной группы являются слабыми блокаторами K_v каналов, проведены исследования, показывающие их активность на Ca^{2+} каналах [198].

Многообразие блокаторов K^+ каналов из яда скорпионов

Как уже отмечалось, сейчас известно порядка 250 КТх, выделенных из яда различных скорпионов, и ниже в табл. 8 представлено по одному представителю из каждого семейства КТх. Для удобства список выполнен в алфавитном порядке латинского названия вида скорпиона, из которого был выделен тот или иной токсин. В настоящее время лиганды K^+ каналов, выделенные из яда скорпионов, являются поровыми блокаторами, и они проявляют активность в диапазоне концентраций от нескольких пМ / десятков мкМ. Наиболее активный блокатор $K_v1.3$ канала Vm24 (из скорпиона *Vaejovis mexicanus smithi*) характеризуется константой диссоциации комплекса (K_d) 2,9 пМ [199]. Среди токсинов скорпионов найдены молекулы, селективно воздействующие на различные изоформы K_v каналов (например, ВеКм-1 и OSK2) [188, 200] и BK_{Ca} (IbTX) [163]. Блокаторов K_{ir} и K_{2p} каналов в яде скорпионов пока обнаружено не было [53].

Взаимодействие КТх с K^+ каналами

Как уже было отмечено, все лиганды K^+ каналов делятся на поровые блокаторы и модуляторы. Интересным кажется тот факт, что в отличие, например, от пауков, в яде скорпионов до сих пор не было найдено ни одного модулятора K^+ каналов: все активные пептиды в нем – это поровые блокаторы.

Поскольку известные в настоящее время КТх действуют в основном на K_v и в меньшей степени на BK_{Ca} и SK_{Ca} каналы, а самыми активными являются полипептиды с укладкой $CS\alpha/\beta$, то основные лиганд-рецепторные модели связывания токсинов основываются именно на данных об этих молекулах [201–203].

Основываясь на ранних исследованиях α -КТх, было выдвинуто предположение, что поровый участок K^+ канала высококонсервативен и имеет очень сходное строение в разных каналах [204]. Позднее это предположение получило серьезные экспериментальные подтверждения: во-первых, были установлены пространственные структуры ряда каналов [22, 205, 206], во-вторых, был получен гибридный канал на основе примитивного бактериального K^+ канала KcsA из *Streptomyces lividans*, который мог быть заблокирован некоторыми α -КТх, в то время как дикий тип был нечувствителен к этим токсинам [207, 208].

Для некоторых токсинов было показано, что они взаимодействуют с селективным фильтром поровой области K_v или BK_{Ca} каналов с помощью аминокислотных остатков, располагающихся в β -шпильке [209–211]. В то же время, другие блокаторы взаимодействуют с ниж-

Таблица 8. Все известные в настоящее время семейства КТх[&]

Токсин	Семейство	ID	Аминокислотная последовательность	а.о.	ММ	Активность
<i>Androctonus australis</i>						
Aa1	α 15.1	P60233	ZNETNKKCQGGSSASVRRRVIGVAAGKCIINGRCVSGYP	37	3851	1, 5
AaTXK β	β 1	P69939	KLVKYAVPVGTLLRLLQTVVHKVGTQFGCFRAYQGYDQDDHCQDIIKKEGFGHGFCKCGIPMGF	64	7117	1
<i>Androctonus mauretanicus mauretanicus</i>						
KTX-1	α 3.1	P24662	GVEINVKCSGSPQCLKPKCKDAGMRFCKMNRKCHCTPK-NH ₂	38	4149	1, 2
AmP01	α 8.1	P56215	VSCEDCPCHCSTQKAQAKDNDKVCSEPI	29	3179	3
<i>Centruroides limpidus limpidus</i>						
CIIIerg2	γ 4.1	Q86QU9	DRDSCVDKSKCSKYGYYGQDCCCKKAGDRAGNCVYFFKCKNP	43	4832	5
<i>Centruroides noxius</i> (Mexican scorpion)						
NTx	α 2.1	P08815	TIINVKCTSPKQCSKPKCKELYGSSAGAKCMNGKCFCYNN-NH ₂	39	4195	1, 2
CoTx1	α 10.1	O46028	AVCVYRTCDKDKRRRGYRSKCIINNAKCYFY-NH ₂	32	3731	1, 3, 4
CnErg1	γ 1.1	Q86QT3	DRDSCVDKSRCAKYGYQEIQDCCCKNAGHNGGTCMFFKCFCA	42	4730	5
CnErg2	γ 3.1	P59939	GRDSCVNKSRCAKYGYYSQCEVCCCKKAGHGGTCDFFKCFCKV	43	4783	5
<i>Centruroides sculpturatus</i>						
CsErg5	γ 5.1	Q86QU2	DRDSCVDKSRCAKYGYGQCEVCCCKKAGHNGGTCMFFKCFVNSKMN	47	5263	*
<i>Hadrurus gertschi</i>						
Hge- β -KTx	β 2	Q0GY41	KSTVGQKLKKLNQAVDKVKEVLNKSEYMGFVVSFCQHCARLGKSGQDILLECICS	58	6427	1
HgeScIpl1	β 3	Q0GY40	GWMSEKVVQGITLDDKLLPEGLIRNAAKAIVHKMAKNQFGCFANVDYKGDCKRHCRAEDKEGICHGTCKCGVFISYL	76	8369	1
Hg1	δ 1.1	P0C8W3	GHNRVNCLLLPPKTPGCKGSAFYVFDIETGSKAFIYGGCEGNSNMFSEKHHCEKRCRGFRKFGGK	67	7539	1

Продолжение табл. 8 см. на сл. стр.

Токени	Семейство	ID	Аминокислотная последовательность	а.о.	Мм	Активность
κ-HfTx1	κ1.1	P82850	GHACYRNCWREGNDEETCKERC-NH ₂ <i>Heterometrus fuhvipes</i>	22	2655	1
HelαTx1	κ5.1	P0DJ41	SCKKECGSRRRTKKMQKCNREHGH-NH ₂ <i>Heterometrus laoticus</i>	25	2917	1
HSP040C.1	κ3.1	P0DJ36	QWINACFNVCMKISSDKKYCKYLCCGRN <i>Heterometrus petersii</i>	27	3185	1
HSP040C.2	κ4.1	P0DJ40	DIPCFETCMKLYHI PKLYIKCRKH	25	3080	1
ChTx	α1.1	P13487	ZFTNVSTTTSKECWSVQRLHNTSRGKCMNKKCRCSYS <i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>	37	4296	1
ScyTx	α5.1	P16341	AFCNLRMCQLSCRSLGLLGKCI GDKCECVKH-NH ₂ <i>Lychas micronatus</i>	31	3423	3
LmKTx2	α29.1	D9U2A6	EGDPISEAIKVEKCKEKEVEVCEPGVCKCSG	32	3395	1
LmKTT-1a	δ2.2	P0DJ46	KKKCOLP SDVGK GKASFRYYINEESGKCFETFIYGGVGGNSNNFLTKEDCCRECAQGGSC <i>Mesobuthus eupeus</i>	59	6495	1
BeKm-1	γ2.1	Q9BKB7	RPTDIKSESYQCFFVCKSRFGKTNRCVNGFCDCF	36	4092	5
λ-MeuTx	λ	P86399	GCNRLNKKNSDADCCRYGERCI STGVNYICRPDFGP <i>Mesobuthus martensii</i>	37	4174	-
BmKK6	α9.1	Q9NJP7	VGCECFMHC KGNKAKPTCDDGVGCNV	28	2949	1, 3
BmKK1	α14.1	Q967F9	TFFAIKCATDADCSRKCPGNPFCRRNGFCACT	31	3233	*
BmKK4	α17.1	Q95NJ8	ZTQQSVRDCQQYCLTPDRCSYGTCTCKTT-NH ₂	30	3460	-
BmBKTx1	α19.1	P83407	AA CYSSDCRVKCVAMGFSSGKCI NSKCKCYK	31	3336	2
Kcugx	α22.1	Q8MUB1	EVDGRTATFCTQSI CEESCKRQNKNGRCVIEAEGSLIYHLCKCY	44	4982	*
BmK86	α26.1	A7KJJ7	NFKVEGACSKFCRKYCIDK GARNGKCI NGRCHCYY	35	3981	1
BmKTT-2	δ3.1	P0DJ50	VDCTLPSTDTGRCKAYFIRYFYNQKAGECQKFFVYGGCEGNSNNFLTKSDCCCKQCSPPGKC <i>Окончание табл. 8 см. на сл. стр.</i>	58	6470	1

Окончание табл. 8

Токсин	Семейство	ID	Аминокислотная последовательность	а.о.	Мм	Активность
TmTX	α 16.1	P0C173	DLIDVKEISSQEWIA CK KVVTGRFE GCQ NR QCRCY	36	4207	1
<i>Mesobuthus tamulus</i>						
OmTx1	κ 2.1	P0C1Z3	DFCYEVCLQQHGNVKEEAECKHPVE	26	2984	1
<i>Opisthacanthus madagascariensis</i>						
Pi1	α 6.1	Q10726	LVKRGTSDCGRPR CCQ QDTGC FNSK INRM CKCYGC	35	3835	1, 3
Pi2	α 7.1	P55927	TISCTNPKQCYRHC CKE TKETGYPNA CKMNRKCKCFGR	35	4034	1
<i>Parabuthus villosus</i>						
PBTx1	α 11.1	P60164	DEEPKES CS DE MC TVY CK GEEY STGV CDGF QCKCSD	37	4090	1
<i>Titius obscurus</i>						
To1	α 13.1	P83243	AG SC ER KKCK SG CK INGR CKCY	23	2448	1
To32	α 18.1	P60211	TG PQ TT Q AA MC EAG CK GLG KS ME SCQ GD TKCKKA	35	3522	1
<i>Titius serrulatus</i>						
Tityustoxin	α 4.1	P46114	VFINAK CR GS PECL PK KEA IGKAAG CKM NG CKC Y P	37	3942	1, 2
BuTX	α 12.1	P59936	WC ST CL DL AC S ARE YD PC FK AF G RA HG CK M NN F CR CYT	40	4506	1
Ts15	α 21.1	P86270	G K FG CK PN IC AK T Q TE K G KG M GY CK N K TE CV CS EW	36	3956	1
<i>Titius trivittatus</i>						
Tt28	α 20.1	P0C183	G CT PE Y SM MC K V K V S Q NY CV Y KN CK CP GR	29	3310	1
κ -BUTX-Tt2b	κ	B3A0L5	G CM PE Y CA G Q CR GR G K V S Q DY CL KN CR CIR	28	3180	1
<i>Vaejovis mexicanus smithi</i>						
Vm24	α 23.1	P0D131	AAA I SC V GS PE PP RC RA Q CK NG CK M NR CKCY Y C -NH ₂	36	3864	1, 3

* В таблице приведено по одной последовательности представителя каждого семейства. Дано название пептида, обозначены семейства: α , β , γ – для токсинов со структурой CS α / β , κ – для CS α токсинов с двумя или тремя дисульфидными связями, δ – для пептидов, имеющих укладку типа Кунница, λ – для пептидов с фолдом ICK. Обозначена активность пептидов: * – пептиды, идентифицированные по кДНК, исследование активности для них не проводилось. 1 – токсины, активные на К_v каналах (кроме К_v11 каналов), 2 – на BK_{Ca} каналах, 3 – на SK_{Ca} каналах, 4 – на IK_{Ca} каналах, 5 – на K_v11 каналах, -- данных по активности нет. Обозначены посттрансляционные модификации: Z – остаток пиролютаминовой кислоты, -NH₂ – амидирование. Остатки цистеина выделены полужирным шрифтом, а.о. обозначает количество аминокислотных остатков, Мм – молекулярную массу.

ней частью вестибюля SK_{Ca} каналов посредством аминокислотных остатков, располагающихся не в β-спильке, а в α-спирали [212–214]. И третий вариант наблюдается при взаимодействии специфических γ-КТх с K_v11 каналами, при котором лиганд располагается далеко от селективного фильтра канала, вследствие удлиненных внеклеточных петель последнего [215, 216].

Факт существования огромного разнообразия пептидов с различной структурой, действующих на K⁺ каналы, позволил предположить о наличии ключевых молекулярных детерминант, которые и отвечают за взаимодействие лиганда с рецептором. Ряд работ показал, что мутации определенных аминокислотных остатков как в канале, так и в токсине могут приводить к существенному изменению аффинности и селективности КТх.

У множества КТх была обнаружена так называемая «функциональная диада» [217], которая принимает участие в лиганд-рецепторном взаимодействии и обеспечивает блок проведения ионов K⁺. Диада состоит из двух высококонсервативных аминокислотных остатков, один из которых – лизин, а другой может быть тирозином, фенилаланином [213, 217] или лейцином [218]. Согласно модели функциональной диады, остаток лизина заходит в пору канала своей боковой цепью, где оказывается окруженным кольцом карбонильных групп одинаковых отрицательно заряженных аминокислотных остатков – аспарагиновой или глутаминовой кислоты. Каждый остаток аспарагиновой или глутаминовой кислоты принадлежит одной из четырех α-субъединиц тетрамерного K⁺ канала. При замене этого лизина на другой аминокислотный остаток наблюдается значительное падение аффинности токсина [219, 220]. Ароматический или алифатический аминокислотный остаток диады предположительно формирует контакты с остатком тирозина или триптофана, принадлежащим какой-либо одной α-субъединице канала [221–223].

Стоит отметить, что данная модель не является исчерпывающей, и для некоторых токсинов, лишенных функциональной диады, было показано высокоаффинное взаимодействие с некоторыми изоформами K⁺ каналов [224]. Кроме того, была описана модель функциональной триады, согласно которой, помимо важного для связывания с порой остатка лизина, еще необходимы два гидрофобных остатка [225].

Основываясь на результатах молекулярного докинга, была предложена альтернативная модель «кольца основных аминокислот», которое, как оказалось, присутствует у множества блокаторов K_v каналов. Действительно, было показано, что основные аминокислотные остатки кольца способны образовывать солевые мостики с

отрицательно заряженными аминокислотными остатками α -субъединицы канала. Для некоторых токсинов было найдено четыре остатка лизина или аргинина, отвечающие за подобные взаимодействия, но у ряда других молекул число таких остатков может варьировать [221, 222].

Поскольку наблюдаются различия в селективности различных КТх к множеству изоформ K^+ каналов, модели функциональной диады и кольца основных аминокислот не подходят для описания уникальных взаимодействий токсин-канал. В литературе всё больше появляется данных, свидетельствующих о том, что не только остатки диады или кольца принимают участие во взаимодействии токсинов с каналами. Так, например, для остатка аспарагина (Asn30) у AgTx2 была показана важная роль в стабилизации комплекса [167]. В результате была предложена третья модель, которая говорит о необходимости создания функциональных карт «комплементарных» поверхностей токсинов и каналов, находящихся в непосредственном контакте. Каждому аминокислотному остатку присваивается свой «коэффициент важности», и очевидно, что такой коэффициент будет значительным для аминокислот диады [226].

В настоящее время разрешена пространственная структура комплекса ChTx и химеры $K_v1.2$ - $K_v2.1$ и показано, что токсин взаимодействует с каналом без значительного изменения структуры селективного фильтра (рис. 16). Как и предполагалось, важную роль играет остаток лизина (Lys27) из функциональной диады. Lys27 окружен карбонильными группами остатков тирозина каждой из четырех α -субъединиц канала. α -Спиральный участок молекулы токсина ориентирован наружу, а участок β -шпильки обращен в сторону поры канала. Tyr36 взаимодействует с Asp375 и Val377 одной из α -субъединиц, а Met29 при этом контактирует с Asp375 соседней α -субъединицы. Ближе к периферии боковая цепь Arg25 токсина находится в непосредственной близости от Gln353 канала, при этом главная цепь токсина в области Thr8-Thr9 расположена вблизи Gln353 другой субъединицы канала. Для некоторых аминокислотных остатков, похоже, реализуются электростатические взаимодействия. Так, например, Arg34 и Arg25 токсина вовлечены в электростатические взаимодействия с Asp375 и Asp359 канала, соответственно. Asn30 находится на расстоянии водородной связи от Asp375 [219].

Структура комплекса ChTx и $K_v1.2$ - $K_v2.1$, с одной стороны, подтвердила модели, предложенные ранее, объяснила вовлеченность во взаимодействие токсина с каналом некоторых важных аминокислотных остатков, таких как Lys27. Но с другой стороны, некоторые аспекты нуждаются в пересмотре и в дополнительном изучении.

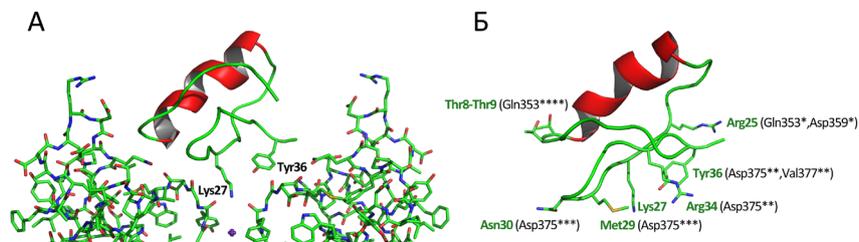


Рис. 16. А – пространственная структура комплекса химеры $K_v1.2-K_v2.1$ с ChTX (PDB ID: 4JTA). Показан ключевой остаток лизина (Lys27), а также ароматический остаток диады (Tyr36). Видно, что Lys27 заходит в пору канала боковой цепью.

Б – аминокислотные остатки ChTX, вовлеченные во взаимодействия с аминокислотными остатками канала (в скобках). Звездочки обозначают принадлежность конкретного аминокислотного остатка одной из четырех α -субъединиц.

Например, Tyr36, кажется, вносит большой вклад в образование комплекса своей гидроксильной группой и за счет большого размера, а не гидрофобностью, как считалось ранее. Дальнейшие исследования, очевидно, будут направлены на получение кристаллических структур комплексов различных токсинов с каналами из разных семейств (K_v , VK_{Ca} и SK_{Ca}) с целью разобраться в молекулярных основах специфичности подобных взаимодействий.

IV. ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИПЕПТИДНЫХ ЛИГАНДОВ K^+ КАНАЛОВ

Как уже отмечалось выше, важная роль в изучении K^+ каналов принадлежит полипептидным лигандам из природных источников. Токсины использовались в ранних работах для выделения каналов, а позднее их радиоактивно-меченые и флуоресцентные аналоги послужили инструментами исследования фармакологических свойств и локализации K^+ каналов [227, 228].

K^+ каналы были хорошо изучены с точки зрения участия в клеточной возбудимости, а их роль в процессах клеточной миграции, пролиферации, ангиогенеза была показана сравнительно недавно [229]. Большое функциональное разнообразие и широкое распространение K^+ каналов делают это суперсемейство мембранных белков интересной фармакологической мишенью для разработки лекарств, в том числе полипептидной природы [230].

ПРИМЕНЕНИЕ РАДИО- И ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНЫХ АНАЛОГОВ ТОКСИНОВ

Токсины, меченные радиоактивным изотопом йода (^{125}I) по остаткам Tyr/His [231, 232], а также тритием (^3H) [233], использовались для изучения распределения K^+ каналов, характеристики их фармакологического профиля, а также для выделения каналов из образцов тканей и подтверждения их субъединичного состава [227, 234–236]. Однако существует ряд существенных ограничений в применении радиоактивно-меченых токсинов, а именно: сложность утилизации радиоактивных отходов, необходимость соблюдения особых условий работы и высокая стоимость подобных проектов [237].

В последнее время широкое распространение получило использование флуоресцентных меток (рис. 17). В большинстве случаев органическая метка ковалентно присоединяется к аминогруппе лизина [238] или тиольной группе остатка цистеина, дополнительно введенного в структуру токсина [239], кроме того, могут использоваться биотинилированные производные токсинов в паре с флуоресцентно-меченым стрептавидином [240]. Для получения флуоресцентно-меченых аналогов токсинов обычно применяются такие метки, как Cy3, Cy5, Alexa488, Alexa546 и TAMRA [237].

Для некоторых флуоресцентных производных токсинов удалось продемонстрировать лиганд-рецепторное взаимодействие с K^+ каналами на мономолекулярном уровне [83], а также применить их в проточной цитометрии для детекции определенного репертуара клеток, экспрессирующих конкретные изоформы K_v каналов [82].

K^+ КАНАЛЫ КАК МИШЕНЬ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТАЛОГИЯХ

Ионные каналы, уступая лишь G-белок-сопряженным рецепторам и киназам, являются третьей по величине группой белков человека, участвующих в передаче сигналов [51]. В настоящее время порядка 13% лекарственных препаратов, представленных на рынке, воздействуют на ионные каналы [242], что позволяет этим мембранным белкам занять второе место в списке наиболее распространенных фармакологических мишеней после G-белок-сопряженных рецепторов [243]. K^+ каналы (78 генов у человека) являются самым представленным суперсемейством среди ионных каналов, поэтому неудивительно, что они вовлечены в патогенез различных заболеваний и выступают в качестве перспективных фармакологических мишеней [244].

Изучена роль K^+ каналов в некоторых аутоиммунных заболеваниях, таких как рассеянный склероз, ревматоидный артрит, псориаз и диабет I типа [245–247]. Одними из основных участников развития

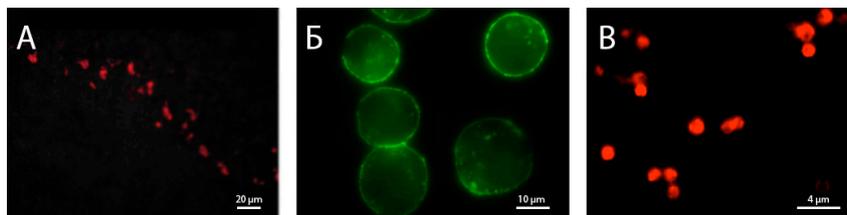


Рис. 17. Визуализация K^+ каналов с помощью токсинов и их флуоресцентно-меченых аналогов.

А – Визуализация K_v каналов на срезах мозжечка крысы с помощью HgTX₁-A19C-Alexa546 [239].

Б – Флуоресцентное изображение клеток НЕК293 (стабильно экспрессирующих BK_{Ca} каналы), обработанных биотинилированным ИТХ, а затем стрептавидином с меткой Alexa488 [240].

В – Поверхностное распределение гибридных $KcsA-K_v1.3$ каналов на поверхности сферопластов [241].

Изображения А и Б взяты из оригинальных работ с разрешения издательства Springer; изображение В – с разрешения К.С. Кудряшовой.

этих заболеваний выступают эффекторные Т-лимфоциты. Активация и пролиферация Т-лимфоцитов, а также выработка ими интерлейкинов, требует высокой концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, которая достигается за счет работы ряда Ca^{2+} каналов [248]. Поддержание низкого мембранного потенциала при этом реализуется за счет выходящего тока ионов K^+ через $K_v1.3$ и IK_{Ca} каналы, которые присутствуют в этих клетках в виде гомотетрамеров [249–251]. При развитии аутоиммунного заболевания Т-лимфоциты приобретают характерный профиль, характеризующийся, помимо прочего, гиперэкспрессией $K_v1.3$ [245]. Ингибирование K^+ каналов препятствует выходу ионов K^+ из клетки, что делает невозможным вход Ca^{2+} в цитоплазму, в результате чего останавливается пролиферация и выработка интерлейкинов эффекторными Т-лимфоцитами [252]. Функциональная активность этих клеток поддерживается в основном $K_v1.3$, поэтому блокирование именно этой изоформы K^+ каналов рассматривается эффективным вариантом терапии аутоиммунных заболеваний. При этом мембранный потенциал других лимфоцитов поддерживается в основном за счет IK_{Ca} каналов, что позволяет им нормально функционировать [253].

Уже давно было замечено, что укус скорпиона приводит к остановке развития рассеянного склероза [254], а позднее, вместе с установлением молекулярных основ развития заболевания, блокаторы

K^+ каналов из яда различных животных были предложены на роль лекарственных препаратов [230]. Наибольшего прогресса достигла разработка селективного блокатора $K_v1.3$ на основе токсина ShK, выделенного из яда морской анемоны *Stichodactyla helianthus* (см. рис. 9Б) [95, 255]. Был получен ряд улучшенных производных этой молекулы [256], а одно из них – ShK-186 – прошло 1 фазу клинических исследований [257]. Такие токсины скорпионов, как MgTX, OSK1 и ChTX, и их модифицированные производные также показали высокий потенциал в модельных экспериментах по лечению аутоиммунных заболеваний [258–260].

Недавно была показана вовлеченность $K_v1.3$ в патогенез астмы [261], а воздействие ShK-186 на этот канал позволяет проводить эффективную терапию заболевания в модельных экспериментах [262]. Также комбинированное ингибирование $K_v1.3$ и IK_{Ca} каналов – возможный способ предотвращения отторжения тканей при трансплантации органов [263].

Порядка десяти типов K^+ каналов вовлечены в заболевания сердечно-сосудистой системы. Основными участниками некоторых видов аритмии, таких как фибрилляция предсердий, синдром Андерсена, а также синдромы удлиненного и укороченного интервала QT, выступают каналы $K_{ir}2.1$, $K_{ir}3.4$, $K_{2p}17.1$, $K_v1.5$, $K_v4.3$, $K_v7.1$ и $K_v11.1$ [264]. В большинстве случаев неправильная работа того или иного канала (каналопатия) вызвана определенными мутациями их генов [265]. В этом случае молекулы, селективно воздействующие на эти типы K^+ каналов (например, BeKm-1), обладают высоким терапевтическим потенциалом [188].

Как уже отмечалось, K^+ каналы – основные участники формирования потенциала действия и передачи нервного сигнала (см. Введение). Нарушение работы этих мембранных белков ассоциировано с многочисленными нейрофизиологическими отклонениями, такими как судороги, эпилепсия и аутизм [266–268]. Как и в случае с аритмией, неправильная работа каналов может быть следствием мутаций. Ключевыми здесь выступают нейрональные K^+ каналы: $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v4.2$, $K_v7.2$, $K_v7.3$, а для терапии нейрофизиологических расстройств, главным образом, используются низкомолекулярные лиганды [51, 53].

Аномальная экспрессия K^+ каналов описана для многих видов опухолевых клеток [269]. Некоторые изоформы ($K_{ir}1.1$, $K_{ir}3.4$, $K_{2p}5.1$, $K_{2p}9.1$, $K_v1.1$, $K_v1.3$, $K_v1.5$, $K_v10.1$, $K_v10.2$, $K_v11.1$, $K_{Ca}1.1$, $K_{Ca}2.3$, $K_{Ca}3.1$) тем или иным образом вовлечены в патогенез рака, и в дальнейшем могут рассматриваться как мишени в терапии онкозаболеваний [229]. Более широкий спектр K^+ каналов участвует в процессах, ассоцииро-

ванных с хронической болью [270], и кандидатами в анальгетики являются активаторы K^+ каналов [271].

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

K^+ каналы – суперсемейство интегральных мембранных белков, отвечающих за пассивный транспорт ионов K^+ через клеточную мембрану. Работа K^+ каналов, как и большинства других ионных каналов, может быть модифицирована воздействием различных лигандов. Лиганды, связывающиеся с K^+ каналами, можно разделить на несколько групп, основными из которых являются: ионы металлов, небольшие органические молекулы и полипептидные токсины. Кроме того, на многие изоформы K^+ каналов были получены антитела. По механизму действия все лиганды K^+ каналов можно разделить на поровые блокаторы и модуляторы.

В настоящее время известно порядка 400 полипептидных лигандов, выделенных из ядовитых животных. Из них около 250 – токсины из яда скорпионов (КТх), которые объединяются в шесть семейств согласно структурно-функциональным особенностям, но все они являются поровыми блокаторами K^+ каналов. Такие КТх, как ChTX, ВеKm-1 и OSK1, наравне с апамином из яда медоносной пчелы, стали классическими инструментами исследования K^+ каналов. В последнее время K^+ каналы стали рассматривать в качестве перспективных фармакологических мишеней в некоторых аутоиммунных, респираторных и нейродегенеративных заболеваниях. В свою очередь лиганды каналов выступают в качестве потенциальных лекарственных средств для терапии этих заболеваний.

Ежегодно база данных UniProt пополняется новыми полипептидными токсинами, активными на K^+ каналах, что свидетельствует о высоком интересе к этой научной области. Очевидно, что дальнейшее изучение подобных молекул необходимо сосредоточить не только на выделении новых полипептидов, но и на их детальной физиологической и структурной характеристике.

ЛИТЕРАТУРА

1. González, C., Baez-Nieto, D., Valencia, I., Oyarzún, I., Rojas, P., Naranjo, D., and Latorre, R. (2012) K(+) channels: function-structural overview, *Compr. Physiol.*, **2**, 2087–2149.
2. Kubo, Y., Adelman, J.P., Clapham, D.E., Jan, L.Y., Karschin, A., Kurachi, Y., Lazdunski, M., Nichols, C.G., Seino, S., and Vandenberg, C.A. (2005) International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels, *Pharmacol. Rev.*, **57**, 509–526.
3. Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. (2010) Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles, *Physiol. Rev.*, **90**, 291–366.
4. Goldstein, S.A.N., Bayliss, D.A., Kim, D., Lesage, F., Plant, L.D., and Rajan, S. (2005) International Union of Pharmacology. LV. Nomenclature and molecular relationships of two-P potassium channels, *Pharmacol. Rev.*, **57**, 527–540.
5. Plant, L.D., Rajan, S., and Goldstein, S.A.N. (2005) K2P channels and their protein partners, *Curr. Opin. Neurobiol.*, **15**, 326–333.
6. Gutman, G.A., Chandy, K.G., Grissmer, S., Lazdunski, M., McKinnon, D., Pardo, L.A., Robertson, G.A., Rudy, B., Sanguinetti, M.C., Stühmer, W., and Wang, X. (2005) International Union of Pharmacology. LVIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels, *Pharmacol. Rev.*, **57**, 473–508.
7. Wei, A.D., Gutman, G.A., Aldrich, R., Chandy, K.G., Grissmer, S., and Wulff, H. (2005) International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels, *Pharmacol. Rev.*, **57**, 463–472.
8. Köhler, M., Hirschberg, B., Bond, C.T., Kinzie, J.M., Marrion, N.V., Maylie, J., and Adelman, J.P. (1996) Small-conductance, calcium-activated potassium channels from mammalian brain, *Science*, **273**, 1709–1714.
9. Salkoff, L., Butler, A., Ferreira, G., Santi, C., and Wei, A. (2006) High-conductance potassium channels of the SLO family, *Nat. Rev. Neurosci.*, **7**, 921–931.
10. Wang, Y., and Wu, W.-H. (2013) Potassium transport and signaling in higher plants, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **64**, 451–476.
11. Gambale, F., and Uozumi, N. (2006) Properties of Shaker-type Potassium Channels in Higher Plants, *J. Membr. Biol.*, **210**, 1–19.
12. Hedrich, R. (2012) Ion channels in plants, *Physiol. Rev.*, **92**, 1777–1811.
13. Kang, M., Moroni, A., Gazzarrini, S., DiFrancesco, D., Thiel, G., Severino, M., and Van Etten, J. L. (2004) Small potassium ion channel proteins encoded by chlorella viruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 5318–5324.
14. Loukin, S.H., Kuo, M.M.-C., Zhou, X.-L., Haynes, W.J., Kung, C., and Saimi, Y. (2005) Microbial K⁺ channels, *J. Gen. Physiol.*, **125**, 521–527.
15. Ketchum, K.A., Joiner, W.J., Sellers, A.J., Kaczmarek, L.K., and Goldstein, S.A. (1995) A new family of outwardly rectifying potassium channel proteins with two pore domains in tandem, *Nature*, **376**, 690–695.
16. Long, S.B., Campbell, E.B., and Mackinnon, R. (2005) Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel, *Science*, **309**, 897–903.
17. Grissmer, S., Nguyen, A.N., Aiyar, J., Hanson, D.C., Mather, R.J., Gutman, G.A., Karmilowicz, M.J., Auperin, D.D., and Chandy, K.G. (1994) Phar-

- macological 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.*, **45**, 1227–1234.
18. Hess, P., and Tsien, R.W. (1984) Mechanism of ion permeation through calcium channels, *Nature*, **309**, 453–456.
 19. Salkoff, L., Wei, A.D., Baban, B., Butler, A., Fawcett, G., Ferreira, G., and Santi, C.M. (2005) Potassium channels in *C. elegans*, *WormBook*, 1–15.
 20. Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994) Mutations in the K⁺ channel signature sequence, *Biophys. J.*, **66**, 1061–1067.
 21. Bezanilla, F., and Armstrong, C.M. (1972) Negative conductance caused by entry of sodium and cesium ions into the potassium channels of squid axons, *J. Gen. Physiol.*, **60**, 588–608.
 22. Doyle, D.A., Morais Cabral, J., Pfuetzner, R.A., Kuo, A., Gulbis, J.M., Cohen, S.L., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (1998) The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity, *Science*, **280**, 69–77.
 23. Hodgkin, A.L., and Keynes, R.D. (1955) The potassium permeability of a giant nerve fibre, *J. Physiol.*, **128**, 61–88.
 24. MacKinnon, R. (2003) Potassium channels, *FEBS Lett.* **555**, 62–65.
 25. Aggarwal, S. K., and MacKinnon, R. (1996) Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel, *Neuron*, **16**, 1169–1177.
 26. Lu, Z., Klem, A.M., and Ramu, Y. (2001) Ion conduction pore is conserved among potassium channels, *Nature*, **413**, 809–13.
 27. Lu, Z., Klem, A.M., and Ramu, Y. (2002) Coupling between voltage sensors and activation gate in voltage-gated K⁺ channels, *J. Gen. Physiol.*, **120**, 663–676.
 28. Barros, F., Domínguez, P., and de la Peña, P. (2012) Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating, *Front. Pharmacol.*, **3**, 49.
 29. Sigworth, F.J. (1994) Voltage gating of ion channels, *Q. Rev. Biophys.*, **27**, 1–40.
 30. Bezanilla, F. (2000) The voltage sensor in voltage-dependent ion channels, *Physiol. Rev.*, **80**, 555–592.
 31. Mannuzzu, L.M., Moronne, M.M., and Isacoff, E.Y. (1996) Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating. *Science*, **271**, 213–216.
 32. Schoppa, N.E., McCormack, K., Tanouye, M.A., and Sigworth, F.J. (1992) The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels, *Science*, **255**, 1712–1715.
 33. Zagotta, W.N., Hoshi, T., and Aldrich, R.W. (1994) Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation, *J. Gen. Physiol.*, **103**, 321–362.
 34. Demo, S.D., and Yellen, G. (1991) The inactivation gate of the Shaker K⁺ channel behaves like an open-channel blocker, *Neuron*, **7**, 743–753.
 35. Armstrong, C.M., and Bezanilla, F. (1977) Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments, *J. Gen. Physiol.*, **70**, 567–590.
 36. Zagotta, W.N., Hoshi, T., and Aldrich, R.W. (1990) Restoration of inactivation in mutants of Shaker potassium channels by a peptide derived from ShB, *Science*, **250**, 568–571.
 37. Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. (1990) Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation, *Science*, **250**, 533–538.
 38. Oliva, C., González, V., and Naranjo, D. (2005) Slow inactivation in voltage gated potassium channels is insensitive to the binding of pore

- occluding peptide toxins, *Biophys. J.*, **89**, 1009–1019.
39. Hoshi, T., Zagotta, W.N., and Aldrich, R.W. (1991) Two types of inactivation in Shaker K⁺ channels: effects of alterations in the carboxy-terminal region, *Neuron*, **7**, 547–556.
 40. Choi, K.L., Aldrich, R.W., and Yellen, G. (1991) Tetraethylammonium blockade distinguishes two inactivation mechanisms in voltage-activated K⁺ channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 5092–5095.
 41. Hagiwara, S., Miyazaki, S., and Rosenthal, N.P. (1976) Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish, *J. Gen. Physiol.*, **67**, 621–638.
 42. Robertson, D. W., and Steinberg, M. I. (1990) Potassium channel modulators: scientific applications and therapeutic promise. *J. Med. Chem.* **33**, 1529–41.
 43. Moczydlowski, E., Lucchesi, K., and Ravindran, A. (1988) An emerging pharmacology of peptide toxins targeted against potassium channels, *J. Membr. Biol.*, **105**, 95–111.
 44. MacKinnon, R., and Miller, C. (1989) Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor, *Science*, **245**, 1382–1385.
 45. Swartz, K.J. (2007) Tarantula toxins interacting with voltage sensors in potassium channels, *Toxicon* **49**, 213–230.
 46. Swartz, K. J., and MacKinnon, R. (1997) Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron* **18**, 665–73.
 47. Gómez-Varela, D., Zwick-Wallasch, E., Knötgen, H., Sánchez, A., Hettmann, T., Ossipov, D., Weseloh, R., Contreras-Jurado, C., Rothe, M., Stühmer, W., and Pardo, L.A. (2007) Monoclonal antibody blockade of the human Eag1 potassium channel function exerts antitumor activity, *Cancer Res.*, **67**, 7343–7349.
 48. Chhabra, S., Chang, S.C., Nguyen, H.M., Huq, R., Tanner, M.R., Londono, L.M., Estrada, R., Dhawan, V., Chauhan, S., Upadhyay, S.K., Gindin, M., Hotez, P. J., Valenzuela, J.G., Mohanty, B., Swarbrick, J.D., Wulff, H., Iadonato, S.P., Gutman, G.A., Beeton, C., Pennington, M.W., Norton, R.S., and Chandy, K.G. (2014) Kv1.3 channel-blocking immunomodulatory peptides from parasitic worms: implications for autoimmune diseases, *FASEB J.*, **28**, 3952–3964.
 49. Xiang, F., Xie, Z., Feng, J., Yang, W., Cao, Z., Li, W., Chen, Z., and Wu, Y. (2015) Plectasin, first animal toxin-like fungal defensin blocking potassium channels through recognizing channel pore region, *Toxins (Basel)*, **7**, 34–42.
 50. Yang, W., Feng, J., Xiang, F., Xie, Z., Zhang, G., Sabatier, J.-M., Cao, Z., Li, W., Chen, Z., and Wu, Y. (2015) Endogenous animal toxin-like human β -defensin 2 inhibits own K⁽⁺⁾ channels through interaction with channel extracellular pore region, *Cell. Mol. Life Sci.*, **72**, 845–853.
 51. Wulff, H., Castle, N.A., and Pardo, L.A. (2009) Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **8**, 982–1001.
 52. Hermann, A., and Gorman, A.L. (1979) Blockade of voltage-dependent and Ca²⁺-dependent K⁺ current components by internal Ba²⁺ in molluscan pacemaker neurons, *Experientia*, **35**, 229–231.
 53. Wulff, H., and Zhorov, B.S. (2008) K⁺ channel modulators for the treatment of neurological disorders and autoimmune diseases, *Chem. Rev.*, **108**, 1744–1773.
 54. Shen, K.Z., Lagrutta, A., Davies, N.W., Standen, N.B., Adelman,

- J.P., and North, R.A. (1994) Tetraethylammonium block of Slowpoke calcium-activated potassium channels expressed in *Xenopus* oocytes: evidence for tetrameric channel formation, *Pflugers Arch.*, **426**, 440–445.
55. Zheng, W., and Zhang, Y.P. (1986) Research progress on a new potassium channel-blocking agent-4-aminopyridine, *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*, **17**, 254–258.
56. Illes, P., Nörenberg, W., and Gebicke-Haerter, P.J. (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. B. Voltage- and purinoceptor-operated channels in microglia, *Neurochem. Int.*, **29**, 13–24.
57. Brown, D.A., and Selyanko, A.A. (1985) Membrane currents underlying the cholinergic slow excitatory post-synaptic potential in the rat sympathetic ganglion, *J. Physiol.*, **365**, 365–387.
58. DeCoursey, T.E., Chandy, K.G., Gupta, S., and Cahalan, M.D. (1985) Voltage-dependent ion channels in T-lymphocytes, *J. Neuroimmunol.*, **10**, 71–95.
59. French, R.J., and Shoukimas, J.J. (1981) Blockage of squid axon potassium conductance by internal tetra-N-alkylammonium ions of various sizes, *Biophys. J.*, **34**, 271–291.
60. Faraldo-Gómez, J.D., Kutluay, E., Jogini, V., Zhao, Y., Heginsbotham, L., and Roux, B. (2007) Mechanism of intracellular block of the KcsA K⁺ channel by tetrabutylammonium: insights from X-ray crystallography, electrophysiology and replica-exchange molecular dynamics simulations, *J. Mol. Biol.*, **365**, 649–362.
61. Armstrong, C.M., and Loboda, A. (2001) A model for 4-aminopyridine action on K channels: similarities to tetraethylammonium ion action, *Biophys. J.*, **81**, 895–904.
62. Del Camino, D., Kanevsky, M., and Yellen, G. (2005) Status of the intracellular gate in the activated-not-open state of shaker K⁺ channels, *J. Gen. Physiol.*, **126**, 419–428.
63. Martin-Eauclaire, M.F., Céard, B., Ribeiro, A.M., Diniz, C.R., Rochat, H., and Bougis, P.E. (1992) Molecular cloning and nucleotide sequence analysis of a cDNA encoding the main beta-neurotoxin from the venom of the South American scorpion *Tityus serrulatus*, *FEBS Lett.*, **302**, 220–222.
64. Vlasak, R., and Kreil, G. (1984) Nucleotide sequence of cloned cDNAs coding for preproscapin, a major product of queen-bee venom glands, *Eur. J. Biochem.*, **145**, 279–282.
65. Mozhayeva, G.N., Naumov, A.P., Nosyreva, E.D., and Grishin, E.V. (1980) Potential-dependent interaction of toxin from venom of the scorpion *Buthus eupeus* with sodium channels in myelinated fibre: voltage clamp experiments, *Biochim. Biophys. Acta*, **597**, 587–602.
66. Zhu, L., Peigneur, S., Gao, B., Tytgat, J., and Zhu, S. (2013) Two recombinant α -like scorpion toxins from *Mesobuthus eupeus* with differential affinity toward insect and mammalian Na⁽⁺⁾ channels, *Biochimie*, **95**, 1732–1740.
67. Rodríguez de la Vega, R.C., Schwartz, E.F., and Possani, L.D. (2010) Mining on scorpion venom biodiversity, *Toxicon*, **56**, 1155–1161.
68. Quintero-Hernández, V., Ortiz, E., Rendón-Anaya, M., Schwartz, E.F., Becerril, B., Corzo, G., and Possani, L.D. (2011) Scorpion and spider venom peptides: gene cloning and peptide expression, *Toxicon*, **58**, 644–663.
69. Kozlov, S., Malyavka, A., McCutchen, B., Lu, A., Schepers, E., Herrmann, R., and Grishin, E. (2005) A novel strategy for the identification of toxinlike structures in spider venom, *Proteins*, **59**, 131–140.
70. Vassilevski, A.A., Kozlov, S.A., Egorov, T.A., and Grishin, E.V. (2010)

- Purification and characterization of biologically active peptides from spider venoms, *Methods Mol. Biol.*, **615**, 87–100.
71. Kuzmenkov, A.I., Vassilevski, A.A., Kudryashova, K.S., Nekrasova, O.V., Peigneur, S., Tytgat, J., Feofanov, A.V., Kirpichnikov, M.P., and Grishin, E.V. (2015) Variability of Potassium Channel Blockers in Mesobuthus eupeus Scorpion Venom with Focus on Kv1.1: AN INTEGRATED TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC STUDY, *J. Biol. Chem.*, **290**, 12195–12209.
 72. Shijin, Y., Hong, Y., Yibao, M., Zongyun, C., Han, S., Yingliang, W., Zhijian, C., and Wenxin, L. (2008) Characterization of a new Kv1.3 channel-specific blocker, J123, from the scorpion Buthus martensii Karsch, *Peptides*, **29**, 1514–1520.
 73. Weinstock, G.M. (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee Apis mellifera, *Nature*, **443**, 931–949.
 74. Sanggaard, K.W., Bechsgaard, J.S., Fang, X., Duan, J., Dyrland, T.F., Gupta, V., Jiang, X., Cheng, L., Fan, D., Feng, Y., Han, L., Huang, Z., Wu, Z., Liao, L., Settepani, V., Thøgersen, I.B., Vanthournout, B., Wang, T., Zhu, Y., Funch, P., Enghild, J.J., Schausser, L., Andersen, S. U., Villesen, P., Schierup, M.H., Bilde, T., and Wang, J. (2014) Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk, *Nat. Commun.*, **5**, 3765.
 75. Cao, Z., Yu, Y., Wu, Y., Hao, P., Di, Z., He, Y., Chen, Z., Yang, W., Shen, Z., He, X., Sheng, J., Xu, X., Pan, B., Feng, J., Yang, X., Hong, W., Zhao, W., Li, Z., Huang, K., Li, T., Kong, Y., Liu, H., Jiang, D., Zhang, B., Hu, J., Hu, Y., Wang, B., Dai, J., Yuan, B., Feng, Y., Huang, W., Xing, X., Zhao, G., Li, X., Li, Y., and Li, W. (2013) The genome of Mesobuthus martensii reveals a unique adaptation model of arthropods, *Nat. Commun.*, **4**, 2602.
 76. Vonk, F.J., Casewell, N.R., Henkel, C.V., Heimberg, A.M., Jansen, H.J., McCleary, R.J. R., Kerckamp, H.M. E., Vos, R.A., Guerreiro, I., Calvete, J.J., Wüster, W., Woods, A.E., Logan, J.M., Harrison, R.A., Castoe, T.A., de Koning, A.P.J., Pollock, D.D., Yandell, M., Calderon, D., Renjifo, C., Currier, R.B., Salgado, D., Pla, D., Sanz, L., Hyder, A.S., Ribeiro, J.M.C., Arntzen, J.W., van den Thillart, G.E. E.J.M., Boetzer, M., Pirovano, W., Dirks, R.P., Spink, H.P., Duboule, D., McGlenn, E., Kini, R.M., and Richardson, M.K. (2013) The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **110**, 20651–20656.
 77. Gao, B., Peigneur, S., Tytgat, J., and Zhu, S. (2010) A potent potassium channel blocker from Mesobuthus eupeus scorpion venom, *Biochimie*, **92**, 1847–1853.
 78. Chandy, K.G., Cahalan, M., Pennington, M., Norton, R.S., Wulff, H., and Gutman, G.A. (2001) Potassium channels in T lymphocytes: toxins to therapeutic immunosuppressants, *Toxicon*, **39**, 1269–1276.
 79. Kharrat, R., Mansuelle, P., Sampieri, F., Crest, M., Oughideni, R., Van Rietschoten, J., Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H., and El Ayeub, M. (1997) Maurotoxin, a four disulfide bridge toxin from Scorpio maurus venom: purification, structure and action on potassium channels, *FEBS Lett.*, **406**, 284–290.
 80. Helms, L.M., Felix, J.P., Bugianesi, R.M., Garcia, M.L., Stevens, S., Leonard, R.J., Knaus, H.G., Koch, R., Wanner, S.G., Kaczorowski, G.J., and Slaughter, R.S. (1997) Margatoxin binds to a homomultimer of K(V)1.3 channels in Jurkat cells. Comparison with K(V)1.3 expressed in CHO cells, *Biochemistry*, **36**, 3737–3744.
 81. Nekrasova, O.V., Ignatova, A.A., Nazarova, A.I., Feofanov, A.V., Korkolkova, Y.V., Boldyreva, E.F., Tag-

- vei, A.I., Grishin, E.V., Arseniev, A.S., and Kirpichnikov, M.P. (2009) Recombinant Kv channels at the membrane of *Escherichia coli* bind specifically agitoxin2, *J. Neuroimmune Pharmacol.*, **4**, 83–91.
82. Beeton, C., Wulff, H., Singh, S., Botsko, S., Crossley, G., Gutman, G.A., Cahalan, M.D., Pennington, M., and Chandy, K.G. (2003) A novel fluorescent toxin to detect and investigate Kv1.3 channel up-regulation in chronically activated T lymphocytes, *J. Biol. Chem.*, **278**, 9928–9937.
83. Freudenthaler, G., Axmann, M., Schindler, H., Pragl, B., Knaus, H.-G., and Schütz, G.J. (2002) Ultrasensitive pharmacological characterisation of the voltage-gated potassium channel K(V)1.3 studied by single-molecule fluorescence microscopy, *Histochem. Cell Biol.*, **117**, 197–202.
84. Warrell, D.A. (2010) Snake bite, *Lancet*, **375**, 77–88.
85. Mouhat, S., Andreotti, N., Jouirou, B., and Sabatier, J.-M. (2008) Animal toxins acting on voltage-gated potassium channels, *Curr. Pharm. Des.*, **14**, 2503–2518.
86. Doley, R., and Kini, R.M. (2009) Protein complexes in snake venom, *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 2851–2871.
87. Koh, D.C.I., Armugam, A., and Jeyaseelan, K. (2006) Snake venom components and their applications in biomedicine, *Cell. Mol. Life Sci.*, **63**, 3030–3041.
88. Harvey, A.L., and Anderson, A.J. (1985) Dendrotoxins: snake toxins that block potassium channels and facilitate neurotransmitter release, *Pharmacol. Ther.*, **31**, 33–55.
89. Berndt, K.D., Güntert, P., and Wüthrich, K. (1993) Nuclear magnetic resonance solution structure of dendrotoxin K from the venom of *Dendroaspis polylepis polylepis*, *J. Mol. Biol.*, **234**, 735–750.
90. Strydom, D.J. (1973) Protease inhibitors as snake venom toxins, *Nat. New Biol.*, **243**, 88–89.
91. Robertson, B., Owen, D., Stow, J., Butler, C., and Newland, C. (1996) Novel effects of dendrotoxin homologues on subtypes of mammalian Kv1 potassium channels expressed in *Xenopus oocytes*, *FEBS Lett.*, **383**, 26–30.
92. Daly, M., Fautin, D.G., and Cappola, V.A. (2003) Systematics of the hexacorallia (Cnidaria: Anthozoa), *Zool. J. Linn. Soc.*, **139**, 419–437.
93. Anderluh, G., and Macek, P. (2002) Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria), *Toxicon*, **40**, 111–124.
94. Norton, R.S. (1991) Structure and structure-function relationships of sea anemone proteins that interact with the sodium channel, *Toxicon*, **29**, 1051–1084.
95. Castañeda, O., Sotolongo, V., Amor, A.M., Stöcklin, R., Anderson, A.J., Harvey, A.L., Engström, A., Wernstedt, C., and Karlsson, E. (1995) Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*, *Toxicon*, **33**, 603–613.
96. Diochot, S., Baron, A., Rash, L.D., Deval, E., Escoubas, P., Scarzello, S., Salinas, M., and Lazdunski, M. (2004) A new sea anemone peptide, APETx2, inhibits ASIC3, a major acid-sensitive channel in sensory neurons, *EMBO J.*, **23**, 1516–1525.
97. Andreev, Y.A., Kozlov, S.A., Koshelev, S.G., Ivanova, E.A., Monastyrnaya, M.M., Kozlovskaya, E.P., and Grishin, E.V. (2008) Analgesic compound from sea anemone *Heteractis crispa* is the first polypeptide inhibitor of vanilloid receptor 1 (TRPV1), *J. Biol. Chem.*, **283**, 23914–23921.
98. Frazão, B., Vasconcelos, V., and Antunes, A. (2012) Sea anemone (Cnidaria, Anthozoa, Actiniaria) toxins: an overview, *Mar. Drugs*, **10**, 1812–1851.

99. Honma, T., and Shiomi, K. (2005) Peptide toxins in sea anemones: structural and functional aspects, *Mar. Biotechnol. (NY)*, **8**, 1–10.
100. Minagawa, S., Ishida, M., Nagashima, Y., and Shiomi, K. (1998) Primary structure of a potassium channel toxin from the sea anemone *Actinia equina*, *FEBS Lett.*, **427**, 149–151.
101. Cotton, J., Crest, M., Bouet, F., Alessandri, N., Gola, M., Forest, E., Karlsson, E., Castañeda, O., Harvey, A. L., Vita, C., and Ménez, A. (1997) A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity, *Eur. J. Biochem.*, **244**, 192–202.
102. Gendeh, G.S., Young, L.C., de Medeiros, C.L., Jeyaseelan, K., Harvey, A.L., and Chung, M.C. (1997) A new potassium channel toxin from the sea anemone *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning, and functional expression, *Biochemistry*, **36**, 11461–11471.
103. Peigneur, S., Billen, B., Derua, R., Waelkens, E., Debaveye, S., Béress, L., and Tytgat, J. (2011) A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties, *Biochem. Pharmacol.*, **82**, 81–90.
104. Schweitz, H., Bruhn, T., Guillemare, E., Moinier, D., Lancelin, J.M., Béress, L., and Lazdunski, M. (1995) Kalicludines and kaliseptine. Two different classes of sea anemone toxins for voltage sensitive K⁺ channels, *J. Biol. Chem.*, **270**, 25121–25126.
105. Diochot, S., Schweitz, H., Béress, L., and Lazdunski, M. (1998) Sea anemone peptides with a specific blocking activity against the fast inactivating potassium channel Kv3.4. *J. Biol. Chem.* **273**, 6744–6749.
106. Honma, T., Hasegawa, Y., Ishida, M., Nagai, H., Nagashima, Y., and Shiomi, K. (2005) Isolation and molecular cloning of novel peptide toxins from the sea anemone *Antheopsis maculata*, *Toxicon*, **45**, 33–41.
107. Diochot, S., Loret, E., Bruhn, T., Béress, L., and Lazdunski, M. (2003) APETx1, a new toxin from the sea anemone *Anthopleura elegantissima*, blocks voltage-gated human ether-a-go-go-related gene potassium channels, *Mol. Pharmacol.*, **64**, 59–69.
108. Rauer, H., Pennington, M., Cahalan, M., and Chandy, K.G. (1999) Structural conservation of the pores of calcium-activated and voltage-gated potassium channels determined by a sea anemone toxin, *J. Biol. Chem.*, **274**, 21885–21892.
109. Tucker, J.K., and Tenorio, M.J. (2009) Systematic classification of Recent and fossil conoidean gastropods. *Hackenheim: Conchbooks*, 133.
110. Livett, B.G., Gayler, K.R., and Khalil, Z. (2004) Drugs from the sea: conopeptides as potential therapeutics, *Curr. Med. Chem.*, **11**, 1715–1723.
111. Lewis, R.J., Dutertre, S., Vetter, I., and Christie, M.J. (2012) *Conus* venom peptide pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, **64**, 259–298.
112. Teichert, R.W., Jacobsen, R., Terlau, H., Yoshikami, D., and Olivera, B.M. (2007) Discovery and characterization of the short kappaA-conotoxins: a novel subfamily of excitatory conotoxins, *Toxicon*, **49**, 318–328.
113. Santos, A.D., McIntosh, J.M., Hillyard, D.R., Cruz, L.J., and Olivera, B.M. (2004) The A-superfamily of conotoxins: structural and functional divergence, *J. Biol. Chem.*, **279**, 17596–17606.

114. Wang, C.-Z., Jiang, H., Ou, Z.-L., Chen, J.-S., and Chi, C.-W. (2003) cDNA cloning of two A-superfamily conotoxins from *Conus striatus*, *Toxicon*, **42**, 613–619.
115. Shon, K.J., Stocker, M., Terlau, H., Stühmer, W., Jacobsen, R., Walker, C., Grilley, M., Watkins, M., Hillyard, D.R., Gray, W.R., and Olivera, B.M. (1998) kappa-Conotoxin PVIIA is a peptide inhibiting the shaker K⁺ channel, *J. Biol. Chem.*, **273**, 33–38.
116. Savarin, P., Guenneugues, M., Gilquin, B., Lamthanh, H., Gasparini, S., Zinn-Justin, S., and Ménéz, A. (1998) Three-dimensional structure of kappa-conotoxin PVIIA, a novel potassium channel-blocking toxin from cone snails, *Biochemistry*, **37**, 5407–5416.
117. Ferber, M., Sporning, A., Jeserich, G., DeLaCruz, R., Watkins, M., Olivera, B.M., and Terlau, H. (2003) A novel conus peptide ligand for K⁺ channels, *J. Biol. Chem.*, **278**, 2177–2183.
118. Al-Sabi, A., Lennartz, D., Ferber, M., Gulyas, J., Rivier, J.E.F., Olivera, B.M., Carlomagno, T., and Terlau, H. (2004) KappaM-conotoxin RIIIK, structural and functional novelty in a K⁺ channel antagonist, *Biochemistry*, **43**, 8625–8635.
119. Aguilar, M.B., López-Vera, E., Heimer de la Cotera, E.P., Falcón, A., Olivera, B.M., and Maillo, M. (2007) I-conotoxins in vermivorous species of the West Atlantic: peptide sr11a from *Conus spurius*, *Peptides*, **28**, 18–23.
120. Fan, C.-X., Chen, X.-K., Zhang, C., Wang, L.-X., Duan, K.-L., He, L.-L., Cao, Y., Liu, S.-Y., Zhong, M.-N., Ulens, C., Tytgat, J., Chen, J.-S., Chi, C.-W., and Zhou, Z. (2003) A novel conotoxin from *Conus betulinus*, kappa-BtX, unique in cysteine pattern and in function as a specific BK channel modulator, *J. Biol. Chem.*, **278**, 12624–12633.
121. Aguilar, M.B., Pérez-Reyes, L.I., López, Z., de la Cotera, E.P.H., Falcón, A., Ayala, C., Galván, M., Salvador, C., and Escobar, L.I. (2010) Peptide sr11a from *Conus spurius* is a novel peptide blocker for K_v1 potassium channels, *Peptides*, **31**, 1287–1291.
122. Kaufenstein, S., Huys, I., Lamthanh, H., Stöcklin, R., Sotto, F., Menez, A., Tytgat, J., and Mebs, D. (2003) A novel conotoxin inhibiting vertebrate voltage-sensitive potassium channels, *Toxicon*, **42**, 43–52.
123. Möller, C., Rahmankhah, S., Lauer-Fields, J., Bubis, J., Fields, G.B., and Mari, F. (2005) A novel conotoxin framework with a helix-loop-helix (Cs alpha/alpha) fold, *Biochemistry*, **44**, 15986–15996.
124. Imperial, J.S., Bansal, P.S., Alewood, P.F., Daly, N.L., Craik, D.J., Sporning, A., Terlau, H., López-Vera, E., Bandyopadhyay, P.K., and Olivera, B.M. (2006) A novel conotoxin inhibitor of K_v1.6 channel and nAChR subtypes defines a new superfamily of conotoxins, *Biochemistry*, **45**, 8331–8340.
125. Bayrhuber, M., Vijayan, V., Ferber, M., Graf, R., Korukottu, J., Imperial, J., Garrett, J. E., Olivera, B. M., Terlau, H., Zweckstetter, M., and Becker, S. (2005) Konkunitzin-S1 is the first member of a new Kunitz-type neurotoxin family. Structural and functional characterization, *J. Biol. Chem.*, **280**, 23766–23770.
126. Massilia, G.R., Schinina, M.E., Ascenzi, P., and Polticelli, F. (2001) Contryphan-Vn: a novel peptide from the venom of the Mediterranean snail *Conus ventricosus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **288**, 908–913.
127. Dy, C.Y., Buczek, P., Imperial, J.S., Bulaj, G., and Horvath, M.P. (2006) Structure of konkunitzin-S1, a neurotoxin and Kunitz-fold disulfide variant from cone snail, *Acta*

- Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **62**, 980–990.
128. Terlau, H., and Olivera, B.M. (2004) Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides, *Physiol. Rev.*, **84**, 41–68.
 129. Craig, A.G., Zafaralla, G., Cruz, L.J., Santos, A.D., Hillyard, D.R., Dykert, J., Rivier, J.E., Gray, W.R., Imperial, J., Delacruz, R.G., Sporning, A., Terlau, H., West, P.J., Yoshikami, D., and Olivera, B.M. (1998) An O-glycosylated neuroexcitatory conus peptide, *Biochemistry*, **37**, 16019–16025.
 130. Eliseo, T., Cicero, D.O., Romeo, C., Schininà, M.E., Massilia, G.R., Polticelli, F., Ascenzi, P., and Paci, M. (2004) Solution structure of the cyclic peptide contryphan-Vn, a Ca²⁺-dependent K⁺ channel modulator, *Biopolymers* **74**, 189–198.
 131. Palma, M. S. (2013) Hymenoptera insect peptides. *Handb. Biol. Act. Pept.*, 416–422.
 132. Наух, П., Sawerthal, H., and Habermann, E. (1967) Sequence analysis of bee venom neurotoxin (apamine) from its tryptic and chymotryptic cleavage products, *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.*, **348**, 737–738.
 133. Овчинников Ю.А., Мирошников А.И., Куделин А.Б., Костина М.Б., Бойков В.А., Магазаник Л.Г., Готгильф И.М. (1980) Структура и пресинаптическое действие тертиапина – нейротоксина из яда медоносной пчелы *Apis mellifera*, *Биоорг. химия*, **6**, 359–365.
 134. Bystrov, V.F., Okhanov, V.V., Miroshnikov, A.I., and Ovchinnikov, Y.A. (1980) Solution spatial structure of apamin as derived from NMR study, *FEBS Lett.*, **119**, 113–117.
 135. Xu, X., and Nelson, J.W. (1993) Solution structure of tertiapin determined using nuclear magnetic resonance and distance geometry, *Proteins*, **17**, 124–137.
 136. Pease, J.H., and Wemmer, D.E. (1988) Solution structure of apamin determined by nuclear magnetic resonance and distance geometry, *Biochemistry*, **27**, 8491–8498.
 137. Lazdunski, M. (1983) Apamin, a neurotoxin specific for one class of Ca²⁺-dependent K⁺ channels, *Cell Calcium*, **4**, 421–428.
 138. Labbé-Jullié, C., Granier, C., Albericio, F., Defendini, M.L., Ceard, B., Rochat, H., and Van Rietschoten, J. (1991) Binding and toxicity of apamin. Characterization of the active site, *Eur. J. Biochem.*, **196**, 639–645.
 139. Kanjhan, R., Coulson, E.J., Adams, D.J., and Bellingham, M.C. (2005) Tertiapin-Q blocks recombinant and native large conductance K⁺ channels in a use-dependent manner, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **314**, 1353–1361.
 140. Jin, W., and Lu, Z. (1998) A novel high-affinity inhibitor for inward-rectifier K⁺ channels, *Biochemistry*, **37**, 13291–13299.
 141. Jin, W., Klem, A.M., Lewis, J.H., and Lu, Z. (1999) Mechanisms of inward-rectifier K⁺ channel inhibition by tertiapin-Q, *Biochemistry*, **38**, 14294–14301.
 142. NMBE – World Spider Catalog (2015) *World Spider Cat. Nat. Hist. Museum Bern* [online] <http://www.wsc.nmbe.ch/> (Accessed January 29, 2015).
 143. Василевский А.А., Козлов С.А., Гришин Е.В. (2009) Молекулярное разнообразие яда пауков. *Успехи биол. химии* **49**, 211–274.
 144. Kuhn-Nentwig, L., and Nentwig, W. (2013) The cytotoxic mode of action of the venom of *Cupiennius salei* (Tetranidae), *Spider Ecophysiol.*, **16**, 217–228.
 145. Wang, J.M., Roh, S.H., Kim, S., Lee, C.W., Kim, J.I., and Swartz, K.J. (2004) Molecular surface of

- tarantula toxins interacting with voltage sensors in K(v) channels, *J. Gen. Physiol.*, **123**, 455–467.
146. Lee, S.-Y., and MacKinnon, R. (2004) A membrane-access mechanism of ion channel inhibition by voltage sensor toxins from spider venom, *Nature*, **430**, 232–235.
147. Swartz, K.J., and MacKinnon, R. (1995) An inhibitor of the Kv2.1 potassium channel isolated from the venom of a Chilean tarantula, *Neuron*, **15**, 941–949.
148. Takahashi, H., Kim, J.I., Min, H.J., Sato, K., Swartz, K.J., and Shimada, I. (2000) Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K(+) channels: common surface features of gating modifier toxins, *J. Mol. Biol.*, **297**, 771–780.
149. Diochot, S., Drici, M.D., Moinier, D., Fink, M., and Lazdunski, M. (1999) Effects of phrixotoxins on the Kv4 family of potassium channels and implications for the role of Ito1 in cardiac electrogenesis, *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 251–263.
150. Chagot, B., Escoubas, P., Villegas, E., Bernard, C., Ferrat, G., Corzo, G., Lazdunski, M., and Darbon, H. (2004) Solution structure of Phrixotoxin 1, a specific peptide inhibitor of Kv4 potassium channels from the venom of the theraphosid spider *Phrixotrichus auratus*, *Protein Sci.*, **13**, 1197–1208.
151. Wang, X., Connor, M., Smith, R., Maciejewski, M.W., Howden, M.E., Nicholson, G.M., Christie, M.J., and King, G.F. (2000) Discovery and characterization of a family of insecticidal neurotoxins with a rare vicinal disulfide bridge, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 505–513.
152. Liang, S. (2004) An overview of peptide toxins from the venom of the Chinese bird spider *Selenocosmia huwena* Wang [= *Ornithoctonus huwena* (Wang)], *Toxicon*, **43**, 575–585.
153. Sanguinetti, M.C., Johnson, J.H., Hammerland, L.G., Kelbaugh, P.R., Volkmann, R.A., Saccomano, N.A., and Mueller, A.L. (1997) Heteropodatoxins: peptides isolated from spider venom that block Kv4.2 potassium channels, *Mol. Pharmacol.*, **51**, 491–498.
154. Escoubas, P., Diochot, S., Célérier, M.-L., Nakajima, T., and Lazdunski, M. (2002) Novel tarantula toxins for subtypes of voltage-dependent potassium channels in the Kv2 and Kv4 subfamilies, *Mol. Pharmacol.*, **62**, 48–57.
155. Li-Smerin, Y., and Swartz, K. J. (1998) Gating modifier toxins reveal a conserved structural motif in voltage-gated Ca²⁺ and K⁺ channels, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8585–8589.
156. Yuan, C., Yang, S., Liao, Z., and Liang, S. (2007) Effects and mechanism of Chinese tarantula toxins on the Kv2.1 potassium channels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **352**, 799–804.
157. Bemporad, D., Sands, Z.A., Wee, C.L., Grottesi, A., and Sansom, M.S.P. (2006) Vstx1, a modifier of Kv channel gating, localizes to the interfacial region of lipid bilayers, *Biochemistry*, **45**, 11844–11855.
158. Possani, L.D. (1982) The primary structure of Noxiustoxin: a K⁺ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann, *Carlsb. Res. Commun.*, **47**, 285–289.
159. Carbone, E., Wanke, E., Prestipino, G., Possani, L.D., and Maelicke, A. (1982) Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin, *Nature*, **296**, 90–91.
160. Miller, C., Moczydlowski, E., Latorre, R., and Phillips, M. (1985) Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ chan-

- nels from mammalian skeletal muscle, *Nature*, **313**, 316–318.
161. Sugg, E.E., Garcia, M.L., Reuben, J.P., Patchett, A.A., and Kaczorowski, G.J. (1990) Synthesis and structural characterization of charybdotoxin, a potent peptidyl inhibitor of the high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, *J. Biol. Chem.*, **265**, 18745–18748.
 162. Miller, C. (1995) The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides, *Neuron*, **15**, 5–10.
 163. Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1990) Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*, *J. Biol. Chem.*, **265**, 11083–11090.
 164. Garcia-Calvo, M., Leonard, R.J., Novick, J., Stevens, S.P., Schmalhofer, W., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1993) Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage-dependent potassium channels, *J. Biol. Chem.*, **268**, 18866–18874.
 165. Crest, M., Jacquet, G., Gola, M., Zerrouk, H., Benslimane, A., Rochat, H., Mansuelle, P., and Martin-Eauclaire, M. F. (1992) Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca²⁺-activated K⁺ channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom, *J. Biol. Chem.*, **267**, 1640–1647.
 166. Garcia, M.L., Garcia-Calvo, M., Hidalgo, P., Lee, A., and MacKinnon, R. (1994) Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom, *Biochemistry*, **33**, 6834–6839.
 167. Gao, Y.-D., and Garcia, M.L. (2003) Interaction of agitoxin2, charybdotoxin, and iberiotoxin with potassium channels: selectivity between voltage-gated and Maxi-K channels, *Proteins*, **52**, 146–154.
 168. Srinivasan, K.N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T.K.S., Sato, K., Tytgat, J., Yu, C., San, B.C.C., Ranganathan, S., Bowie, H.J., Kini, R.M., and Gopalakrishnakone, P. (2002) kappa-Hefutoxin1, a novel toxin from the scorpion *Heterometrus fulvipes* with unique structure and function. Importance of the functional diad in potassium channel selectivity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 30040–30047.
 169. Diego-García, E., Schwartz, E.F., D'Suze, G., González, S.A.R., Batista, C.V.F., García, B.I., de la Vega, R.C.R., and Possani, L.D. (2007) Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of «orphan» components, *Peptides*, **28**, 31–37.
 170. Zeng, X.-C., Zhang, L., Nie, Y., and Luo, X. (2012) Identification and molecular characterization of three new K⁺-channel specific toxins from the Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch revealing intronic number polymorphism and alternative splicing in duplicated genes, *Peptides*, **34**, 311–323.
 171. Diego-García, E., Batista, C.V.F., García-Gómez, B.I., Lucas, S., Candido, D.M., Gómez-Lagunas, F., and Possani, L.D. (2005) The Brazilian scorpion *Tityus costatus* Karsch: genes, peptides and function, *Toxicon*, **45**, 273–283.
 172. Pisciotto, M., Coronas, F.I., Bloch, C., Prestipino, G., and Possani, L.D. (2000) Fast K⁺ currents from cerebellum granular cells are completely blocked by a peptide purified from *Androctonus australis* Garzoni scorpion venom, *Biochim. Biophys. Acta*, **1468**, 203–212.

173. Bagdány, M., Batista, C.V.F., Valdez-Cruz, N.A., Somodi, S., Rodriguez de la Vega, R.C., Licea, A.F., Varga, Z., Gáspár, R., Possani, L.D., and Panyi, G. (2005) Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the alpha-KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes, *Mol. Pharmacol.*, **67**, 1034–1044.
174. Mouhat, S., Jouirou, B., Mosbah, A., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2004) Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels, *Biochem. J.*, **378**, 717–726.
175. Арзамасов А.А., Василевский А.А., Гришин Е.В. (2014) Хлоротоксин и родственные пептиды – короткие инсектотоксины из яда скорпионов, *Биоорганическая химия*, **40**, 387–398.
176. Blanc, E., Sabatier, J.M., Kharrat, R., Meunier, S., el Ayeb, M., Van Rietschoten, J., and Darbon, H. (1997) Solution structure of maurotoxin, a scorpion toxin from *Scorpio maurus*, with high affinity for voltage-gated potassium channels, *Proteins*, **29**, 321–333.
177. Saucedo, A.L., Flores-Solis, D., Rodríguez de la Vega, R.C., Ramírez-Cordero, B., Hernández-López, R., Cano-Sánchez, P., Noriega Navarro, R., García-Valdés, J., Coronas-Valderrama, F., de Roodt, A., Brieba, L.G., Domingos Possani, L., and del Río-Portilla, F. (2012) New tricks of an old pattern: structural versatility of scorpion toxins with common cysteine spacing, *J. Biol. Chem.*, **287**, 12321–12330.
178. Chen, Z.-Y., Hu, Y.-T., Yang, W.-S., He, Y.-W., Feng, J., Wang, B., Zhao, R.-M., Ding, J.-P., Cao, Z.-J., Li, W.-X., and Wu, Y.-L. (2012) Hg1, novel peptide inhibitor specific for Kv1.3 channels from first scorpion Kunitz-type potassium channel toxin family, *J. Biol. Chem.*, **287**, 13813–13821.
179. Chen, Z., Hu, Y., Han, S., Yin, S., He, Y., Wu, Y., Cao, Z., and Li, W. (2011) ImKTx1, a new Kv1.3 channel blocker with a unique primary structure, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **25**, 244–251.
180. Tytgat, J., Chandy, K.G., Garcia, M.L., Gutman, G.A., Martin-Eauc-laire, M.F., van der Walt, J.J., and Possani, L.D. (1999) A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies, *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 444–447.
181. Diego-García, E., Caliskan, F., and Tytgat, J. (2014) The Mediterranean scorpion *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones, Buthidae): transcriptome analysis and organization of the genome encoding chlorotoxin-like peptides, *BMC Genomics*, **15**, 295.
182. He, Y., Zhao, R., Di, Z., Li, Z., Xu, X., Hong, W., Wu, Y., Zhao, H., Li, W., and Cao, Z. (2013) Molecular diversity of Chaerilidae venom peptides reveals the dynamic evolution of scorpion venom components from Buthidae to non-Buthidae, *J. Proteomics*, **89**, 1–14.
183. Diego-García, E., Peigneur, S., Debaveye, S., Gheldof, E., Tytgat, J., and Caliskan, F. (2013) Novel potassium channel blocker venom peptides from *Mesobuthus gibbosus* (Scorpiones: Buthidae), *Toxicon*, **61**, 72–82.
184. Cologna, C.T., Peigneur, S., Rosa, J.C., Selistre-de-Araujo, H.S., Varranda, W.A., Tytgat, J., and Arantes, E.C. (2011) Purification and characterization of Ts15, the first member of a new α -KTX subfamily from the venom of the Brazilian scorpion *Tityus serrulatus*, *Toxicon*, **58**, 54–61.
185. Schwartz, E.F., Diego-García, E., Rodríguez de la Vega, R.C., and Possani, L.D. (2007) Transcriptome analysis of the venom gland of

- the Mexican scorpion *Hadrurus gertschi* (Arachnida: Scorpiones), *BMC Genomics*, **8**, 119.
186. Zhu, S., Gao, B., Aumelas, A., del Carmen Rodríguez, M., Lanz-Mendoza, H., Peigneur, S., Diego-García, E., Martin-Eauclaire, M.-F., Tytgat, J., and Possani, L. D. (2010) MeuTXKbeta1, a scorpion venom-derived two-domain potassium channel toxin-like peptide with cytolytic activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 872–883.
 187. Diego-García, E., Abdel-Mottaleb, Y., Schwartz, E.F., de la Vega, R.C.R., Tytgat, J., and Possani, L.D. (2008) Cytolytic and K⁺ channel blocking activities of beta-KTx and scorpine-like peptides purified from scorpion venoms, *Cell. Mol. Life Sci.*, **65**, 187–200.
 188. Korolkova, Y.V., Kozlov, S.A., Lipkin, A.V., Pluzhnikov, K.A., Hadley, J.K., Filippov, A.K., Brown, D.A., Angelo, K., Strøbaek, D., Jespersen, T., Olesen, S.P., Jensen, B.S., and Grishin, E.V. (2001) An ERG channel inhibitor from the scorpion *Buthus eupeus*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 9868–9876.
 189. Corona, M., Gurrola, G.B., Merino, E., Cassulini, R.R., Valdez-Cruz, N.A., García, B., Ramírez-Domínguez, M.E., Coronas, F.I.V., Zamudio, F.Z., Wanke, E., and Possani, L.D. (2002) A large number of novel Ergtoxin-like genes and ERG K⁺-channels blocking peptides from scorpions of the genus *Centruroides*, *FEBS Lett.*, **532**, 121–126.
 190. Gairí, M., Romi, R., Fernández, I., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.F., Van Rietschoten, J., Pons, M., and Giralt, E. (1997) 3D structure of kaliotoxin: is residue 34 a key for channel selectivity?, *J. Pept. Sci.*, **3**, 314–319.
 191. Torres, A.M., Bansal, P., Alewood, P.F., Bursill, J.A., Kuchel, P.W., and Vandenberg, J.I. (2003) Solution structure of CnErg1 (Ergtoxin), a HERG specific scorpion toxin, *FEBS Lett.*, **539**, 138–142.
 192. M'Barek, S., Lopez-Gonzalez, I., Andreotti, N., di Luccio, E., Visan, V., Grissmer, S., Judge, S., El Ayeb, M., Darbon, H., Rochat, H., Sampieri, F., Béraud, E., Fajloun, Z., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2003) A maurotoxin with constrained standard disulfide bridging: innovative strategy of chemical synthesis, pharmacology, and docking on K⁺ channels, *J. Biol. Chem.*, **278**, 31095–31104.
 193. Fajloun, Z., Mosbah, A., Carlier, E., Mansuelle, P., Sandoz, G., Fathallah, M., di Luccio, E., Devaux, C., Rochat, H., Darbon, H., De Waard, M., and Sabatier, J. M. (2000) Maurotoxin versus Pi1/HsTx1 scorpion toxins. Toward new insights in the understanding of their distinct disulfide bridge patterns, *J. Biol. Chem.*, **275**, 39394–39402.
 194. Coronas, F.V., de Roodt, A.R., Portugal, T.O., Zamudio, F.Z., Batista, C.V.F., Gómez-Lagunas, F., and Possani, L.D. (2003) Disulfide bridges and blockage of Shaker B K⁽⁺⁾-channels by another butantoxin peptide purified from the Argentinean scorpion *Tityus trivittatus*, *Toxicon*, **41**, 173–179.
 195. Chagot, B., Pimentel, C., Dai, L., Pil, J., Tytgat, J., Nakajima, T., Corzo, G., Darbon, H., and Ferrat, G. (2005) An unusual fold for potassium channel blockers: NMR structure of three toxins from the scorpion *Opisthacanthus madagascariensis*, *Biochem. J.*, **388**, 263–271.
 196. Zhao, R., Dai, H., Qiu, S., Li, T., He, Y., Ma, Y., Chen, Z., Wu, Y., Li, W., and Cao, Z. (2011) SdPI, the first functionally characterized Kunitz-type trypsin inhibitor from scorpion venom, *PLoS One*, **6**, e27548.

197. Gao, B., Harvey, P.J., Craik, D.J., Ronjat, M., De Waard, M., and Zhu, S. (2013) Functional evolution of scorpion venom peptides with an inhibitor cysteine knot fold, *Biosci. Rep.*, **33**.
198. Zhijian, C., Yun, X., Chao, D., Shunyi, Z., Shijin, Y., Yingliang, W., and Wenxin, L. (2006) Cloning and characterization of a novel calcium channel toxin-like gene BmCa1 from Chinese scorpion *Mesobuthus martensii* Karsch, *Peptides*, **27**, 1235–1240.
199. Varga, Z., Gurrola-Briones, G., Papp, F., Rodríguez de la Vega, R.C., Pedraza-Alva, G., Tajhya, R.B., Gaspar, R., Cardenas, L., Rosenstein, Y., Beeton, C., Possani, L.D., and Panyi, G. (2012) Vm24, a natural immunosuppressive peptide, potently and selectively blocks Kv1.3 potassium channels of human T cells, *Mol. Pharmacol.*, **82**, 372–382.
200. Dudina, E.E., Korolkova, Y.V., Bocharova, N.E., Koshelev, S.G., Egorov, T.A., Huys, I., Tytgat, J., and Grishin, E.V. (2001) OsK2, a new selective inhibitor of Kv1.2 potassium channels purified from the venom of the scorpion *Orthochirus scrobiculosus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **286**, 841–847.
201. Swartz, K.J. (2004) Towards a structural view of gating in potassium channels, *Nat. Rev. Neurosci.*, **5**, 905–916.
202. Catterall, W.A., Cestèle, S., Yarov-Yarovoy, V., Yu, F.H., Konoki, K., and Scheuer, T. (2007) Voltage-gated ion channels and gating modifier toxins. *Toxicon*, **49**, 124–141.
203. Jiménez-Vargas, J.M., Restano-Casulini, R., and Possani, L.D. (2012) Toxin modulators and blockers of hERG K(+) channels, *Toxicon*, **60**, 492–501.
204. Tenenholz, T.C., Klenk, K.C., Matteson, D.R., Blaustein, M.P., and Weber, D. J. (2000) Structural determinants of scorpion toxin affinity: the charybdotoxin (alpha-KTX) family of K(+)-channel blocking peptides, *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, **140**, 135–185.
205. Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T., and MacKinnon, R. (2002) Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel, *Nature*, **417**, 515–522.
206. MacKinnon, R., Cohen, S.L., Kuo, A., Lee, A., and Chait, B.T. (1998) Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels, *Science*, **280**, 106–109.
207. Legros, C., Pollmann, V., Knaus, H.G., Farrell, A.M., Darbon, H., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.F., and Pongs, O. (2000) Generating a high affinity scorpion toxin receptor in KcsA-Kv1.3 chimeric potassium channels, *J. Biol. Chem.*, **275**, 16918–16924.
208. Legros, C., Schulze, C., Garcia, M.L., Bougis, P.E., Martin-Eauclaire, M.-F., and Pongs, O. (2002) Engineering-specific pharmacological binding sites for peptidyl inhibitors of potassium channels into KcsA, *Biochemistry*, **41**, 15369–15375.
209. Goldstein, S.A., Pheasant, D.J., and Miller, C. (1994) The charybdotoxin receptor of a Shaker K+ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition, *Neuron*, **12**, 1377–1388.
210. Hidalgo, P., and MacKinnon, R. (1995) Revealing the architecture of a K+ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor, *Science*, **268**, 307–310.
211. Ranganathan, R., Lewis, J.H., and MacKinnon, R. (1996) Spatial localization of the K+ channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis, *Neuron*, **16**, 131–139.

212. Lecomte, C., Ferrat, G., Fajloun, Z., Van Rietschoten, J., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.F., Darbon, H., and Sabatier, J.M. (1999) Chemical synthesis and structure-activity relationships of Ts kappa, a novel scorpion toxin acting on apamin-sensitive SK channel, *J. Pept. Res.*, **54**, 369–376.
213. Shakkottai, V.G., Regaya, I., Wulff, H., Fajloun, Z., Tomita, H., Fathallah, M., Cahalan, M.D., Gargus, J.J., Sabatier, J.M., and Chandy, K.G. (2001) Design and characterization of a highly selective peptide inhibitor of the small conductance calcium-activated K⁺ channel, SkCa2, *J. Biol. Chem.*, **276**, 43145–43151.
214. Pedarzani, P., D'hoedt, D., Doorty, K.B., Wadsworth, J.D.F., Joseph, J.S., Jeyaseelan, K., Kini, R.M., Gadre, S.V., Sapatnekar, S.M., Stocker, M., and Strong, P.N. (2002) Tamapin, a venom peptide from the Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) that targets small conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels and afterhyperpolarization currents in central neurons, *J. Biol. Chem.*, **277**, 46101–46109.
215. Korolkova, Y.V., Bocharov, E.V., Angelo, K., Maslennikov, I.V., Grinenko, O.V., Lipkin, A.V., Nosyreva, E.D., Pluzhnikov, K.A., Olesen, S.-P., Arseniev, A.S., and Grishin, E.V. (2002) New binding site on common molecular scaffold provides HERG channel specificity of scorpion toxin BeKm-1, *J. Biol. Chem.*, **277**, 43104–43109.
216. Pardo-Lopez, L., Zhang, M., Liu, J., Jiang, M., Possani, L.D., and Tseng, G.-N. (2002) Mapping the binding site of a human ether-a-go-go-related gene-specific peptide toxin (ErgTx) to the channel's outer vestibule, *J. Biol. Chem.*, **277**, 16403–16411.
217. Dauplais, M., Lecoq, A., Song, J., Cotton, J., Jamin, N., Gilquin, B., Roumestand, C., Vita, C., de Medeiros, C.L., Rowan, E.G., Harvey, A.L., and Ménez, A. (1997) On the convergent evolution of animal toxins. Conservation of a diad of functional residues in potassium channel-blocking toxins with unrelated structures, *J. Biol. Chem.*, **272**, 4302–4309.
218. Gasparini, S., Danse, J.M., Lecoq, A., Pinkasfeld, S., Zinn-Justin, S., Young, L.C., de Medeiros, C.C., Rowan, E.G., Harvey, A.L., and Ménez, A. (1998) Delineation of the functional site of alpha-dendrotoxin. The functional topographies of dendrotoxins are different but share a conserved core with those of other Kv1 potassium channel-blocking toxins, *J. Biol. Chem.*, **273**, 25393–253403.
219. Banerjee, A., Lee, A., Campbell, E., and Mackinnon, R. (2013) Structure of a pore-blocking toxin in complex with a eukaryotic voltage-dependent K(+) channel, *Elife* **2**, e00594.
220. Carlier, E., Avdonin, V., Geib, S., Fajloun, Z., Kharrat, R., Rochat, H., Sabatier, J. M., Hoshi, T., and De Waard, M. (2000) Effect of maurotoxin, a four disulfide-bridged toxin from the chactoid scorpion *Scorpio maurus*, on Shaker K⁺ channels, *J. Pept. Res.*, **55**, 419–427.
221. Mouhat, S., Mosbah, A., Visan, V., Wulff, H., Delepierre, M., Darbon, H., Grissmer, S., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2004) The «functional» dyad of scorpion toxin Pi1 is not itself a prerequisite for toxin binding to the voltage-gated Kv1.2 potassium channels, *Biochem. J.*, **377**, 25–36.
222. M'Barek, S., Mosbah, A., Sandoz, G., Fajloun, Z., Olamendi-Portugal, T., Rochat, H., Sampieri, F., Guijarro, J.I., Mansuelle, P., Delepierre, M., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2003) Synthesis and characterization of Pi4, a scorpion

- toxin from *Pandinus imperator* that acts on K⁺ channels, *Eur. J. Biochem.*, **270**, 3583–3592.
223. Jouirou, B., Mosbah, A., Visan, V., Grissmer, S., M'Barek, S., Fajloun, Z., Van Rietschoten, J., Devaux, C., Rochat, H., Lippens, G., El Ayeb, M., De Waard, M., Mabrouk, K., and Sabatier, J.-M. (2004) Cobatoxin I from *Centruroides noxius* scorpion venom: chemical synthesis, three-dimensional structure in solution, pharmacology and docking on K⁺ channels, *Biochem. J.* **377**, 37–49.
224. Batista, C.V.F., Gómez-Lagunas, F., Rodríguez de la Vega, R.C., Hajdu, P., Panyi, G., Gáspár, R., and Possani, L.D. (2002) Two novel toxins from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* that block Kv1.3 and Shaker B K(+) channels with distinctly different affinities, *Biochim. Biophys. Acta*, **1601**, 123–131.
225. Katoh, E., Nishio, H., Inui, T., Nishiuchi, Y., Kimura, T., Sakakibara, S., and Yamazaki, T. (2000) Structural basis for the biological activity of dendrotoxin-I, a potent potassium channel blocker, *Biopolymers*, **54**, 44–57.
226. Lipkind, G.M., and Fozzard, H.A. (1997) A model of scorpion toxin binding to voltage-gated K⁺ channels, *J. Membr. Biol.*, **158**, 187–196.
227. Gehlert, D.R., and Gackenheimer, S.L. (1993) Comparison of the distribution of binding sites for the potassium channel ligands [125I]apamin, [125I]charybdotoxin and [125I]iodoglyburide in the rat brain, *NeuroScience*, **52**, 191–205.
228. Shimony, E., Sun, T., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1994) Engineering a uniquely reactive thiol into a cysteine-rich peptide, *Protein Eng.*, **7**, 503–507.
229. Pardo, L. A., and Stühmer, W. (2014) The roles of K(+) channels in cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **14**, 39–48.
230. Lewis, R.J., and Garcia, M.L. (2003) Therapeutic potential of venom peptides, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 790–802.
231. Vázquez, J., Feigenbaum, P., Katz, G., King, V.F., Reuben, J.P., Roy-Contancin, L., Slaughter, R.S., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1989) Characterization of high affinity binding sites for charybdotoxin in sarcolemmal membranes from bovine aortic smooth muscle. Evidence for a direct association with the high conductance calcium-activated potassium channel, *J. Biol. Chem.*, **264**, 20902–20909.
232. Auguste, P., Hugues, M., Mourre, C., Moinier, D., Tartar, A., and Lazdunski, M. (1992) Scyllatoxin, a blocker of Ca(2+)-activated K⁺ channels: structure-function relationships and brain localization of the binding sites, *Biochemistry*, **31**, 648–654.
233. Knaus, H.G., Schwarzer, C., Koch, R.O., Eberhart, A., Kaczorowski, G.J., Glossmann, H., Wunder, F., Pongs, O., Garcia, M.L., and Sperk, G. (1996) Distribution of high-conductance Ca(2+)-activated K⁺ channels in rat brain: targeting to axons and nerve terminals, *J. Neurosci.*, **16**, 955–963.
234. Knaus, H.G., Koch, R.O., Eberhart, A., Kaczorowski, G.J., Garcia, M.L., and Slaughter, R.S. (1995) [125I]margatoxin, an extraordinarily high affinity ligand for voltage-gated potassium channels in mammalian brain, *Biochemistry*, **34**, 13627–13634.
235. Garcia-Calvo, M., Knaus, H.G., McManus, O.B., Giangiacomo, K.M., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1994) Purification and reconstitution of the high-conductance, calcium-activated potassium channel from tracheal smooth muscle, *J. Biol. Chem.*, **269**, 676–682.

236. Knaus, H.G., Garcia-Calvo, M., Kaczorowski, G.J., and Garcia, M.L. (1994) Subunit composition of the high conductance calcium-activated potassium channel from smooth muscle, a representative of the mSlo and slowpoke family of potassium channels, *J. Biol. Chem.*, **269**, 3921–3924.
237. Bergeron, Z.L., and Bingham, J.-P. (2012) Scorpion toxins specific for potassium (K⁺) channels: a historical overview of peptide bio-engineering, *Toxins (Basel)*, **4**, 1082–1119.
238. Jimenez-Gonzalez, C., McLaren, G.J., and Dale, N. (2003) Development of Ca²⁺-channel and BK-channel expression in embryos and larvae of *Xenopus laevis*, *Eur. J. Neurosci.*, **18**, 2175–2187.
239. Pragl, B., Koschak, A., Trieb, M., Obermair, G., Kaufmann, W.A., Gerster, U., Blanc, E., Hahn, C., Prinz, H., Schütz, G., Darbon, H., Gruber, H.J., and Knaus, H.-G. (2002) Synthesis, characterization, and application of cy-dye- and alexa-dye-labeled hongotoxin(1) analogues. The first high affinity fluorescence probes for voltage-gated K⁺ channels, *Bioconjug. Chem.*, **13**, 416–425.
240. Bingham, J.-P., Bian, S., Tan, Z.-Y., Takacs, Z., and Moczydlowski, E. (2006) Synthesis of a biotin derivative of iberiotoxin: binding interactions with streptavidin and the BK Ca²⁺-activated K⁺ channel expressed in a human cell line, *Bioconjug. Chem.*, **17**, 689–699.
241. Kudryashova, K.S., Nekrasova, O.V., Kuzmenkov, A.I., Vassilevski, A.A., Ignatova, A.A., Korolkova, Y.V., Grishin, E.V., Kirpichnikov, M.P., and Feofanov, A.V. (2013) Fluorescent system based on bacterial expression of hybrid KcsA channels designed for Kv1.3 ligand screening and study, *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**, 2379–23789.
242. Clare, J.J. (2010) Targeting ion channels for drug discovery, *Discov. Med.*, **9**, 253–260.
243. Overington, J.P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A.L. (2006) How many drug targets are there?, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 993–996.
244. Alexander, S.P., et al. (2013) The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2013/14: overview, *Br. J. Pharmacol.*, **170**, 1449–1458.
245. Beeton, C., Wulff, H., Barbaria, J., Clot-Faybesse, O., Pennington, M., Bernard, D., Cahalan, M.D., Chandy, K.G., and Béraud, E. (2001) Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 13942–13947.
246. Beeton, C., Wulff, H., Standifer, N.E., Azam, P., Mullen, K.M., Pennington, M.W., Kolski-Andreaco, A., Wei, E., Grino, A., Counts, D.R., Wang, P.H., LeeHealey, C.J., S Andrews, B., Sankaranarayanan, A., Homerick, D., Roeck, W.W., Tehranzadeh, J., Stanhope, K.L., Zimin, P., Havel, P. J., Griffey, S., Knaus, H.-G., Nepom, G.T., Gutman, G.A., Calabresi, P.A., and Chandy, K.G. (2006) Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 17414–17419.
247. Azam, P., Sankaranarayanan, A., Homerick, D., Griffey, S., and Wulff, H. (2007) Targeting effector memory T cells with the small molecule Kv1.3 blocker PAP-1 suppresses allergic contact dermatitis, *J. Invest. Dermatol.*, **127**, 1419–1429.
248. Feske, S., Wulff, H., and Skolnik, E.Y. (2015) Ion channels in innate and adaptive immunity, *Annu. Rev. Immunol.*, **33**, 291–353.
249. DeCoursey, T.E., Chandy, K.G., Gupta, S., and Cahalan, M.D. Vol-

- tage-gated K⁺ channels in human T lymphocytes: a role in mitogenesis?, *Nature*, **307**, 465–468.
250. Chandy, K.G., DeCoursey, T.E., Cahalan, M.D., McLaughlin, C., and Gupta, S. (1984) Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation, *J. Exp. Med.*, **160**, 369–385.
251. Lewis, R.S., and Cahalan, M.D. (1995) Potassium and calcium channels in lymphocytes, *Annu. Rev. Immunol.*, **13**, 623–653.
252. Feske, S., Skolnik, E.Y., and Prakriya, M. (2012) Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **12**, 532–547.
253. Wulff, H., Calabresi, P.A., Allie, R., Yun, S., Pennington, M., Beeton, C., and Chandy, K.G. (2003) The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS, *J. Clin. Invest.*, **111**, 1703–1713.
254. Breland, A.E., and Currier, R.D. (1983) Scorpion venom and multiple sclerosis, *Lancet* **2**, 1021.
255. Chi, V., Pennington, M.W., Norton, R.S., Tarcha, E.J., Londono, L.M., Sims-Fahey, B., Upadhyay, S.K., Lakey, J.T., Iadonato, S., Wulff, H., Beeton, C., and Chandy, K.G. (2012) Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases, *Toxicon*, **59**, 529–546.
256. Pennington, M.W., Beeton, C., Galea, C.A., Smith, B.J., Chi, V., Monaghan, K.P., Garcia, A., Rangaraju, S., Giuffrida, A., Plank, D., Crossley, G., Nugent, D., Khaytin, I., Lefievre, Y., Peshenko, I., Dixon, C., Chauhan, S., Orzel, A., Inoue, T., Hu, X., Moore, R.V., Norton, R.S., and Chandy, K.G. (2009) Engineering a stable and selective peptide blocker of the Kv1.3 channel in T lymphocytes, *Mol. Pharmacol.*, **75**, 762–773.
257. Beeton, C., Pennington, M.W., and Norton, R.S. (2011) Analogs of the sea anemone potassium channel blocker ShK for the treatment of autoimmune diseases, *Inflamm. Allergy Drug Targets*, **10**, 313–321.
258. Mouhat, S., Visan, V., Ananthakrishnan, S., Wulff, H., Andreotti, N., Grissmer, S., Darbon, H., De Waard, M., and Sabatier, J.-M. (2005) K⁺ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom, *Biochem. J.*, **385**, 95–104.
259. Koo, G.C., Blake, J.T., Talento, A., Nguyen, M., Lin, S., Sirotina, A., Shah, K., Mulvany, K., Hora, D., Cunningham, P., Wunderler, D. L., McManus, O.B., Slaughter, R., Bugianesi, R., Felix, J., Garcia, M., Williamson, J., Kaczorowski, G., Sigal, N.H., Springer, M.S., and Feeney, W. (1997) Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo, *J. Immunol.*, **158**, 5120–5128.
260. Leonard, R.J., Garcia, M.L., Slaughter, R.S., and Reuben, J.P. (1992) Selective blockers of voltage-gated K⁺ channels depolarize human T lymphocytes: mechanism of the antiproliferative effect of charybdotoxin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**, 10094–10098.
261. Bradding, P., and Wulff, H. (2009) The K⁺ channels K(Ca)3.1 and K(v)1.3 as novel targets for asthma therapy, *Br. J. Pharmacol.*, **157**, 1330–1339.
262. Koshy, S., Huq, R., Tanner, M.R., Atik, M.A., Porter, P.C., Khan, F.S., Pennington, M.W., Hanania, N.A., Corry, D.B., and Beeton, C. (2014) Blocking KV1.3 channels inhibits Th2 lymphocyte function and treats a rat model of asthma, *J. Biol. Chem.*, **289**, 12623–12632.
263. Grgic, I., Wulff, H., Eichler, I., Flothmann, C., Köhler, R., and Hoyer, J. Blockade of T-lymphocyte

- KCa3.1 and Kv1.3 channels as novel immunosuppression strategy to prevent kidney allograft rejection, *Transplant. Proc.*, **41**, 2601–2606.
264. Schmitt, N., Grunnet, M., and Olsen, S.-P. (2014) Cardiac potassium channel subtypes: new roles in repolarization and arrhythmia, *Physiol. Rev.*, **94**, 609–653.
265. Kass, R.S. (2005) The channelopathies: novel insights into molecular and genetic mechanisms of human disease, *J. Clin. Invest.*, **115**, 1986–1989.
266. Robbins, C.A., and Tempel, B.L. (2012) Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models, *Epilepsia*, **53**, Suppl 1, 134–141.
267. Maljevic, S., and Lerche, H. (2014) Potassium channel genes and benign familial neonatal epilepsy, *Prog. Brain Res.*, **213**, 17–53.
268. Guglielmi, L., Servettini, I., Caramia, M., Catacuzzeno, L., Franciolini, F., D'Adamo, M. C., and Pessia, M. (2015) Update on the implication of potassium channels in autism: K(+) channel autism spectrum disorder, *Front. Cell. Neurosci.*, **9**, 34.
269. Huber, S.M. (2013) Oncochannels, *Cell Calcium*, **53**, 241–255.
270. Tsantoulas, C., and McMahon, S.B. (2014) Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain, *Trends Neurosci.*, **37**, 146–158.
271. Ocaña, M., Cendán, C.M., Cobos, E.J., Entrena, J.M., and Baeyens, J.M. (2004) Potassium channels and pain: present realities and future opportunities, *Eur. J. Pharmacol.*, **500**, 203–19.