



HAL
open science

Bases structurales de la specificite de reconnaissance entre les toxines animales et les canaux ioniques

Cedric Bernard

► **To cite this version:**

Cedric Bernard. Bases structurales de la specificite de reconnaissance entre les toxines animales et les canaux ioniques. Biochimie [q-bio.BM]. Université de la Méditerranée - Aix-Marseille II, 2002. Français. NNT: . tel-00010404

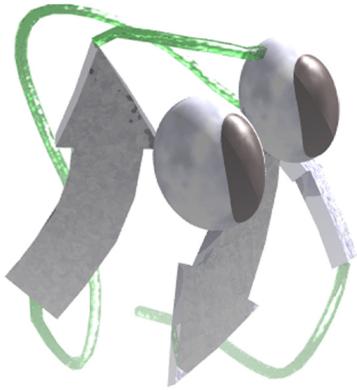
HAL Id: tel-00010404

<https://theses.hal.science/tel-00010404>

Submitted on 5 Oct 2005

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THESE

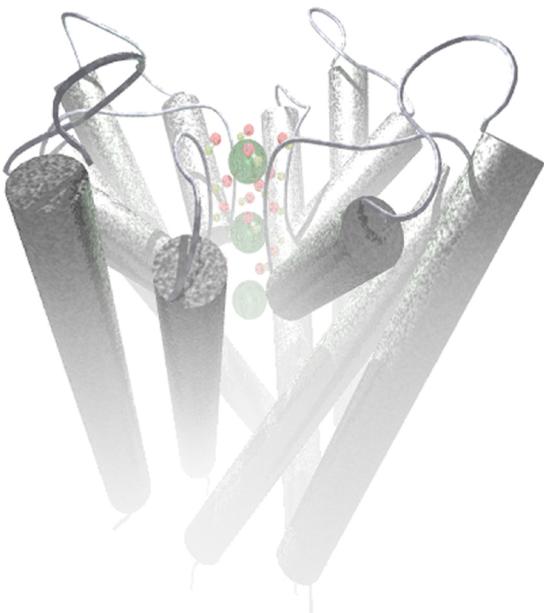
Présentée par :
Cédric BERNARD

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Aix-Marseille II
Spécialité Bioinformatique, Biologie structurale et Génomique



Bases structurales de la spécificité de reconnaissance entre les toxines animales et les canaux ioniques

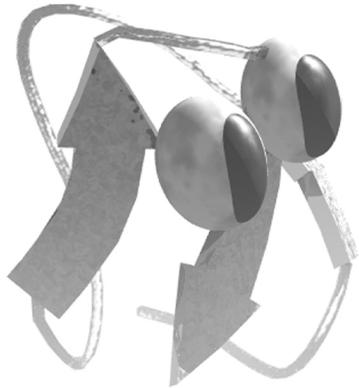
Directeur de thèse :
Dr. Hervé DARBON



Soutenue le 11 Octobre 2002
devant le jury composé de :

Pr. André NIEOULLON
Pr. Alexandre BONVIN
Dr. Pierre BOUGIS
Dr. Françoise GUERLESQUIN
Dr. Hervé DARBON

président
rapporteur
rapporteur



THESE

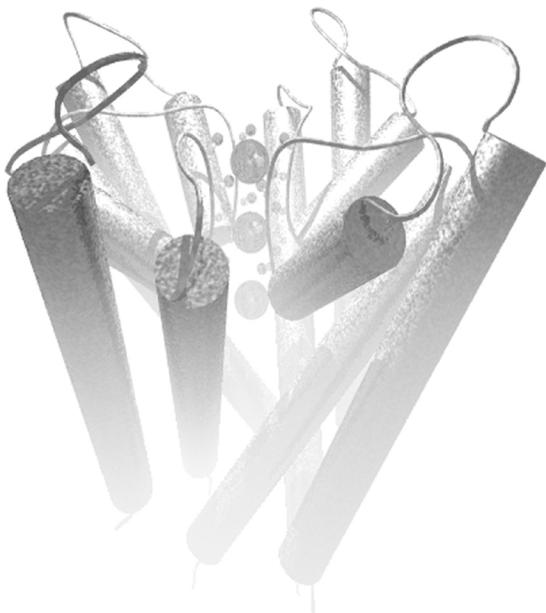
Présentée par :
Cédric BERNARD

Pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université Aix-Marseille II
Spécialité Bioinformatique, Biologie structurale et Génomique



Bases structurales de la spécificité de reconnaissance entre les toxines animales et les canaux ioniques

Directeur de thèse :
Dr. Hervé DARBON



Soutenue le 11 Octobre 2002
devant le jury composé de :

Pr. André NIEOULLON
Pr. Alexandre BONVIN
Dr. Pierre BOUGIS
Dr. Françoise GUERLESQUIN
Dr. Hervé DARBON

président
rapporteur
rapporteur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury qui ont accepté de juger ce travail.

Je remercie christian Cambillau de m'avoir permis d'être intégré au sein de l'A.F.M.B.

Une profonde pensée pour ma mère, mais aussi pour ma sœur Karin (avec toute ta petite famille vivant au rythme du zouc antillais), pour Thomas et Geoffroy mes frères enfin retrouvés. Merci à tous de si bien m'entourer même si j'ai des fois l'impression de ne pas le mériter...

J'aimerais rendre hommage à la famille Gabella, famille dont je me targue d'appartenir un peu. Vous avez tant fait pour moi que je ne pourrai jamais assez vous remercier. Initialement protecteurs et guides, vous me faites désormais l'honneur de donner votre amitié à l'homme que je suis devenu. Je n'oublierai jamais ces instants précieux...

En ce qui concerne mes amis, j'ai tellement peur d'oublier quelqu'un que je me contenterai de leur offrir un exemplaire dédicacé de ma thèse (...et donc, exemplaire unique en quelque sorte...).

J'aimerais aussi remercier tous les membres du laboratoire et plus particulièrement mes camarades de RMN : Eric, Olivier, Gilles, Jean-guillaume, Guillaume et Benjamin. Notre entente et votre (mon ?) humour m'ont fait passer quatre années excellentes, aussi bien en terme de travail qu'en terme de détente....

Enfin, il me reste à remercier Hervé Darbon. Exercice difficile puisqu'il faut ainsi dissocier l'homme du directeur de thèse. Force m'est de constater que ces deux faces du personnage sont entremêlées, sans césure, en un mot indissociables. L'attitude très paternelle que tu adoptes vis-à-vis des étudiants de ton groupe, ou plutôt de ton clan RMN fait chaud au cœur et me manquera. Merci de m'avoir formé : ce que je sais aujourd'hui, je te le dois en partie. Merci de m'avoir dirigé et permis d'aller assister à des congrès. Merci pour ces instants de grande détente sur ton bateau. Merci pour tes « tu es à la bourre Cédric », pour tes encouragements, pour tes blagues qui ne me faisaient pas rire. Enfin, merci pour ton amitié : si une chose, une seule devait perdurer, j'espère que ce serait celle la...

Et Florence ...

Avant propos

Les canaux ioniques sont exprimés de façon ubiquitaire et occupent donc une place primordiale dans les mécanismes du vivant. De fait, un grand nombre de pathologies impliquent un dysfonctionnement d'un certain type de canal ionique, et motivent ainsi l'énorme quantité d'études qui visent à mieux comprendre ces canaux. Dans l'optique d'envisager un traitement efficace de ces maladies, la compréhension des mécanismes de fonctionnement des canaux ioniques constitue un objectif majeur à atteindre. Les toxines animales, initialement étudiées pour obtenir des anti-venins efficaces, apparaissent aujourd'hui comme un outil de choix pour étudier et mieux comprendre le fonctionnement des canaux ioniques.

Le travail effectué au cours de cette thèse est sous-tendu par une idée maîtresse, améliorer encore la connaissance et la compréhension de l'interaction d'une toxine et de sa cible, le canal. Ces connaissances ont diverses répercussions : la caractérisation encore plus fine des propriétés des différents types de canaux exprimés mais aussi la création de molécules thérapeutiques à la spécificité contrôlée pour un certain type de canal donné. Ce contrôle de la spécificité, qui doit être total, implique une connaissance parfaite des caractéristiques physico-chimiques qui régissent cette spécificité. Les connaissances en la matière sont maintenant nombreuses, mais les zones d'ombre, qu'il reste à dévoiler, le sont plus encore. La mutagénèse dirigée, la création de molécules chimériques et les tests électrophysiologiques ont été largement utilisés pour mieux cerner les résidus critiques pour l'interaction de la toxine et affiner ainsi le modèle de l'interaction entre une toxine et un canal ionique. Toutefois, l'émergence et l'utilisation désormais courante des techniques de détermination de la structure des protéines ouvre un nouveau champ d'analyse qui se base sur la comparaison des structures et plus précisément permet l'établissement de véritables cartes fonctionnelles de ces toxines envers un type de canal donné.

Au travers de son introduction bibliographique, ce manuscrit présente brièvement les canaux ioniques en se focalisant sur les relations structure/fonction de ces protéines membranaires. Puis les toxines animales, dont les canaux ioniques sont les cibles naturelles, sont décrites suivant le motif structural qu'elles adoptent : soit le motif $C\alpha\beta$ ou le motif ICK.

Enfin, les résultats obtenus s'articulent autour de la détermination de la structure en solution de toxines animales par résonance magnétique nucléaire bidimensionnelle du proton.

Table des matières

INTRODUCTION 1^{ERE} PARTIE : LES CANAUX IONIQUES.....	3
<i>I Les canaux potassium</i>	7
1 LES TROIS GRANDES CLASSES DE CANAUX POTASSIUM.....	7
a°) Les canaux potassium activés par le calcium (K_{CA}).....	7
i Les K_{CA} de grande conductance (canaux BK).....	8
ii Les K_{CA} de conductance intermédiaire (canaux IK).....	8
iii Les K_{CA} de faible conductance (canaux SK).....	8
b°) Les canaux potassium dépendants du potentiel (K_V).....	9
c°) Les canaux rectifiants entrants (canal K_{IR}).....	10
2 ORGANISATION MOLECULAIRE DES CANAUX POTASSIUM.....	10
a°) Les segments transmembranaires.....	10
b°) Une séquence signature : le filtre de sélectivité.....	11
c°) La sensibilité au potentiel.....	12
3 LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU CANAL K^+ BACTERIEN $KCSA$	12
a°) Organisation moléculaire du canal $KcsA$	13
b°) Un modèle de la conduction d'ions K^+	14
c°) Les réarrangements conformationnels.....	15
4 LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DU CANAL MTHK.....	16
<i>II Les canaux calcium voltage-dépendants</i>	19
1 LA DIVERSITE DES CANAUX CALCIUM VOLTAGE-DEPENDANTS	19
a°) Les canaux Ca^{2+} de type LVA.....	19
b°) Les canaux Ca^{2+} de type HVA.....	20
i Les canaux de type L.....	20
ii Les canaux de type N.....	21
iii Les canaux de type P/Q.....	21
iv Les canaux de type R.....	21
c°) Une nouvelle classification.....	22
2 ORGANISATION MOLECULAIRE DES VSCC.....	23
3 LA PERMEATION SELECTIVE DES IONS CALCIUM	25
<i>III Les canaux sodium.....</i>	28
1 CLASSIFICATION DES CANAUX SODIUM.....	28
2 ORGANISATION MOLECULAIRE DES CANAUX SODIUM.....	28
a°) Topologie des canaux sodium.....	28
b°) Sélectivité et perméation.....	30
3 SITES D'INTERACTION AVEC LES TOXINES.....	30
a°) Interaction au niveau du pore : le site récepteur 1.....	30
b°) Interaction altérant la dépendance au potentiel.....	31
i Le site récepteur 3.....	31
ii Le site récepteur 4.....	31
iii Le site récepteur 6.....	32

INTRODUCTION 2^{EME} PARTIE : LES TOXINES ANIMALES ACTIVES SUR LES CANAUX IONIQUES 33

I	<i>Les toxines architecturées autour du motif Csα/β.....</i>	37
1	LE MOTIF STRUCTURAL Cs α / β	37
2	LES TOXINES DE SCORPION ACTIVES SUR LES CANAUX POTASSIUM.....	38
a°)	Réticulation des ponts disulfures.....	38
i	<i>Les toxines à trois ponts disulfures</i>	38
ii	<i>Les toxines à quatre ponts disulfures</i>	39
iii	<i>L'analyse d'analogues de toxines</i>	41
b°)	Surface d'interaction toxine/canal.....	41
i	<i>La charybdotoxine</i>	42
ii	<i>L'ibériotoxine</i>	43
iii	<i>La noxiustoxine</i>	44
iv	<i>La kaliotoxine</i>	45
v	<i>La leiurotoxine</i>	46
vi	<i>P05</i>	47
vii	<i>P01</i>	48
viii	<i>La butantoxine (TsTx-IV)</i>	48
3	LES TOXINES DE SCORPION ACTIVES SUR LES CANAUX SODIUM.....	49
a°)	Toxines de la classe α	51
i	<i>L'archétype α anti-mammifère: AaH II</i>	51
ii	<i>Les toxines α anti-insectes</i>	53
iii	<i>Le groupe des α-like</i>	54
iv	<i>Un site d'interaction commun ?</i>	55
b°)	Toxines de la classe β	56
i	<i>Les toxines β</i>	56
ii	<i>Les toxines anti-insecte de type « relaxant »</i>	57
iii	<i>Les toxines anti-insectes de type « contracturant »</i>	57
II	<i>Les toxines architecturées autour du motif ICK.....</i>	60
1	LE MOTIF STRUCTURAL ICK.....	60
a°)	Découverte du « Cystine knot ».....	60
b°)	Le motif structural.....	61
c°)	Etudes du repliement des ICK.....	63
2	LES TOXINES ACTIVES SUR LES CANAUX CALCIUM.....	66
a°)	Les oméga-conotoxines.....	66
i	<i>GVIA</i>	67
ii	<i>MVIA</i>	68
iii	<i>MVIIC</i>	69
b°)	Les oméga-agatoxines.....	70
i	<i>Les ω-agatoxines I</i>	70
ii	<i>Les ω-agatoxines II</i>	70
iii	<i>Les ω-agatoxines III</i>	70
iv	<i>Les ω-agatoxines IV</i>	71
c°)	Les ω -atracotoxines.....	72
d°)	La maurocalcine.....	73

3	LES TOXINES ACTIVES SUR LES CANAUX POTASSIUM	74
a°)	Kappa-conotoxine PVIIA.....	74
b°)	Les hanatoxines.....	75
c°)	Les hétéropodatoxines.....	75
d°)	Les phrixotoxines.....	76
4	LES TOXINES ACTIVES SUR LES CANAUX SODIUM	77
a°)	Les conotoxines.....	77
	<i>i</i> Les μ O-conotoxines.....	77
	<i>ii</i> Les δ -conotoxines.....	78
b°)	Les μ -agatoxines.....	79
c°)	Les δ -atracotoxines.....	80
III	<i>L'anisotropie de répartition des charges.....</i>	82
1	DESCRIPTION DU MODELE	82
2	L'EXTENSION DU MODELE	84
IV	<i>Résolution de la structure des toxines par RMN.....</i>	85
1	LES SEQUENCES D'IMPULSION	85
2	ATTRIBUTION DES SPECTRES ET DETERMINATION DE LA STRUCTURE.....	86
a°)	Système de spin.....	86
b°)	Attribution des spectres.....	86
c°)	Collection des nOe.....	87
d°)	Calcul de structure.....	87
e°)	Contraintes supplémentaires.....	88
	<i>i</i> Echange des protons amide.....	88
	<i>ii</i> Constantes de couplage.....	89
f°)	Qualité de la structure.....	89
	<i>i</i> Précision de la structure.....	89
	<i>ii</i> Exactitude de la structure.....	89
	<i>iii</i> Analyse de la géométrie.....	90

RÉSULTATS	91
Article I : Structural Basis for α -K Toxin Specificity for K ⁺ Channels Revealed through the Solution ¹ H NMR Structures of Two Noxiustoxin-Iberitoxin Chimeras	95
Article II : Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1a proton-gated cation channels	109
Article III : Solution Structure of Ptu1, a Toxin from the Assassin Bug <i>Peirates turpis</i> That Blocks the Voltage-Sensitive Calcium Channel N-Type	129
Article IV : Solution Structure of ADO1, a Toxin Extracted from the Assassin Bug <i>Agriosphodrus dohrni</i> Saliva	141
Article V : Solution structure of HpTX2, a toxin from <i>Heteropoda venatoria</i> spider that blocks Kv4.2 potassium channel	155
Article VI : ¹ H NMR Solution Structure of the K _{V4.2} Gating Modifier Phrixotoxin 1, a Toxin Extracted from the <i>Phrixotrichus auratus</i> Tarentula Venom	169
DISCUSSION	179
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	187

Table des abréviations

Å	angström	Lqh	<i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i>
AaH	<i>Androctonus australis Hector</i>	Lqq	<i>Leiurus quinquestriatus quinquestriatus</i>
Ba²⁺	baryum	LTx	leiurotoxine
Bj	<i>buthatus judaicus</i>	μ-Aga	mu-agatoxine
Bom	<i>Buthus occitanus mardochei</i>	Mca	maurocalcine
Ca²⁺	calcium	μ-CTX	mu-conotoxine
canal BK	canal potassium activé par le calcium de grande conductance	μO-CTX	muO-conotoxine
canal IK	canal potassium activé par le calcium de conductance intermédiaire	MTx	maurotoxine
canal SK	canal potassium activé par le calcium de faible conductance	MTS	méthanethiosulfonate
Ca_v	canal calcium voltage dépendant	Na⁺	sodium
ChTx	charybdotoxine	Na_v	canal sodium voltage dépendant
COSY	correlation spectroscopy	NGF	nervous growth factor
Csab	cysteine-stabilized alpha/beta	nOe	nuclear Overhauser effect
CsE	<i>Centroides sculpturatus Ewing</i>	NOESY	nuclear overhauser effect spectroscopy
δ-ACTX	delta-atracotoxine	NTx	noxiustoxine
δ-CTX	delta-conotoxine	PaTx	phrixotoxine
DHP	dihydropyridine	PcTx	psalmotoxine
HaTx	hanatoxine	PDB	protein data bank
HpTx	heteropodatoxine	RMN	résonance magnetique nucléaire
HVA / LVA	high/low voltage activated	STX	saxitoxine
IbTx	ibériotoxine	TGFβ2	transforming growth factor β2
ICK	inhibitor cystin knot	TOCSY	total correlation spectroscopy
K⁺	potassium	TsTx-IV	butantoxine
Kca	canal potassium activé par le calcium	TTX	térodotoxine
κ-CTX	kappa-conotoxine	VSCC	voltage-sensitive calcium channel
KTx	kaliotoxine	VSSC	voltage-sensitive sodium channel
K_v	canal potassium voltage-dépendant	ω-ACTX	oméga-atracotoxine
		ω-Aga	oméga-agatoxine
		ω-CTX	oméga-conotoxine

Introduction 1^{ère} partie



Les canaux ioniques

Les cellules répondent à une grande variété de stimuli, chimiques ou physiques, et ces informations entrantes sont directement ou indirectement couplées à des réponses cellulaires impliquant divers effecteurs biologiques et autres processus de transduction du signal. Les canaux ioniques sont une de ces différentes classes d'effecteurs. Comment ces canaux fonctionnent-ils ? Tout simplement grâce à la cellule qui maintient une distribution asymétrique des ions de part et d'autre des membranes intracellulaires et des membranes plasmiques : les ions Na^+ , Ca^{2+} et Cl^- sont maintenus à de plus faibles concentrations dans le milieu intracellulaire comparativement au milieu extérieur, contrairement aux ions K^+ qui sont maintenus à plus forte concentration dans le milieu intérieur. Cette distribution asymétrique est maintenue car les membranes cellulaires possèdent une perméabilité ionique sélective et parce qu'il existe des pompes ioniques, dirigées par des processus métaboliques, qui restaurent ces gradients de concentration après l'ouverture du canal considéré. Chaque courant ionique, représentant le passage des ions au travers de la membrane, est caractérisé par un potentiel d'équilibre où le mouvement net des ions est à l'équilibre (voir **tableau 1**). La conséquence de cette distribution des ions de part et d'autre de la membrane est que l'ouverture ou la fermeture de canaux ioniques spécifiques aura une influence importante sur le potentiel de membrane et l'excitabilité cellulaire. D'une façon générale, l'activation sélective des canaux Ca^{2+} ou Na^+ provoque une dépolarisation membranaire (excitation de la membrane), alors qu'à l'inverse l'ouverture sélective des canaux K^+ et Cl^- provoque

Ion	$[\text{X}]_{\text{EXT}}$ mM	$[\text{X}]_{\text{INT}}$ mM	Eq. Pot. mV
Na^+	145	12	+70
K^+	5	155	-90
Ca^{2+}	1.5	$<10^{-4}$	+120
Cl^-	125	5	-90

Tableau 1: concentration et potentiel d'équilibre des ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Cl^- .

une hyperpolarisation de la membrane. Quoiqu'il en soit, l'activité des canaux ioniques est souvent liée, l'ouverture d'un type de canal provoquant souvent l'activation ou l'inactivation d'un autre type de canal.

Du fait de l'expression ubiquitaire de ces canaux dans tous les types cellulaires et de leur importance au sein d'une multitude de processus biologiques, leur bon fonctionnement est indispensable. En effet, l'absence ou le dysfonctionnement d'un canal donné va dans tel type de cellule perturber la propagation du potentiel d'action et dans tel autre empêcher le développement cellulaire. De fait, un grand nombre de pathologies impliquent un dysfonctionnement d'un certain type de canal ionique, et motivent ainsi l'énorme quantité d'études qui visent à mieux comprendre ces canaux.

Cette première partie de l'introduction ne peut et ne veut pas prétendre présenter les canaux ioniques de façon exhaustive. Nous nous limiterons à une brève présentation des caractéristiques principales des canaux K^+ , Ca^{2+} et Na^+ , en essayant de nous focaliser sur les relations structure/fonction de ces protéines transmembranaires.

I Les canaux potassium

Les canaux potassium constituent un filtre hautement sélectif aux ions K^+ et privilégient le transfert de ces ions entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule. Ces protéines membranaires sont retrouvées dans tous les types de cellules eucaryotes, mais ont également été caractérisés dans les cellules procaryotes (Jan et Jan, 1997). Ils représentent le groupe de canaux le plus diversifié, aussi bien en terme de types différents identifiés, qu'en terme de phénomènes biologiques dans lesquels ils sont impliqués. Cette diversité de fonctions trouve son origine en premier lieu dans une grande variabilité génétique, issue de la multiplicité de gènes codant pour la sous unité α transmembranaires de ces canaux. La diversité se retrouve aussi au niveau cellulaire par des assemblages homo- et hétéro-multimériques de sous-unités α , l'intervention de sous-unités β et différents types de modifications post-traductionnelles, tels que glycosylation et phosphorylation (Schwarz et coll., 1988 ; Jan et Jan, 1990 ; Pongs, 1992 ; Wei et coll., 1996).

La variabilité de ces canaux K^+ se manifeste par l'étendue et la subtilité de leurs fonctions effectrices. Au niveau moléculaire, ces fonctions sont directement reliées à des phénomènes élémentaires tels que l'ouverture et la fermeture d'un canal, sa durée d'activité, sa sensibilité aux variations de potentiel de membrane ou la concentration d'un certain métabolite intracellulaire (Jan et Jan, 1992 ; Caterall, 1995).

Si l'on se base uniquement sur des critères physiologiques, on peut globalement distinguer trois grandes classes de canaux K^+ (Rudy, 1988), les canaux activés par le calcium de type BK, IK ou SK, suivant la valeur décroissante de leur conductance unitaire, les canaux de type K_V dont l'activité dépend de la valeur du potentiel de membrane, et les canaux rectifiant entrants, de type K_{ir} .

Nous nous limiterons à une brève description de ces trois classes majeures de canaux K^+ , mais il est à noter que l'activité des canaux K^+ peut être également modulée par des neurotransmetteurs, des métabolites variés, le pH ou certains récepteurs. Ces modulateurs agissent directement au niveau de certaines régions des canaux K^+ , ou bien opèrent à distance, comme dans le cas des canaux K^+ régulés par des récepteurs.

1 Les trois grandes classes de canaux potassium

a° Les canaux potassium activés par le calcium (K_{CA})

Les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} sont présents de manière ubiquitaire dans les cellules et tissus (Rudy, 1988). Ils interviennent dans la phase d'hyperpolarisation des

potentiels d'action et participent également à la régulation des phénomènes sécrétoires de cellules endocrines et exocrines. Trois conditions semblent requises pour considérer le terme d'activation par le Ca^{2+} : (i) le Ca^{2+} agit en tant que ligand pour induire l'ouverture du canal ; (ii) le Ca^{2+} exerce sa fonction d'activation sur la surface intracellulaire du canal ; (iii) les concentrations en Ca^{2+} efficaces sont de 10^3 à 10^6 supérieures à la concentration dans la phase de repos de la cellule (Rudy, 1988).

i Les K_{CA} de grande conductance (canaux BK)

Ces canaux nommés canaux BK ou Maxi-K (Latorre et Miller, 1983) présentent une conductance unitaire variant de 130 à 300 pS. En plus de leur activation par le Ca^{2+} intracellulaire, ils sont faiblement sensibles aux variations du potentiel de membrane (Blatz et Magleby, 1984). Au niveau du système nerveux les canaux BK participent, en synergie avec les canaux Kv, à la phase de repolarisation du potentiel d'action, et à la phase d'hyperpolarisation (Sah, 1996). Au niveau des muscles lisses et striés, ils interviennent dans les phénomènes de contraction musculaire (Knaus et coll., 1994).

ii Les K_{CA} de conductance intermédiaire (canaux IK)

Un canal présentant une conductance intermédiaire entre les conductances de canaux de type SK et BK a pu être cloné à partir du pancréas humain et a été exprimé en ovocyte de Xénope (Ishii et coll., 1997). Ce canal hIK1 est activé par une élévation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire, comme les canaux SK, mais ne présente que 50% d'homologie de séquence avec ces canaux. Une analyse récente a montré que la calmoduline interagit avec l'extrémité C-terminale des sous-unités α du canal hIK1 (Fanger et coll., 1999). La diminution de pH intracellulaire inhibe le canal hIK1, mais le mécanisme induisant cette sensibilité à l'acidification n'est pas encore connu (Pedersen et coll., 2000). Un canal de conductance intermédiaire équivalent au canal hIK1 a été mis récemment en évidence dans le thymus et l'estomac de la souris (Vandorpe et coll., 1998).

iii Les K_{CA} de faible conductance (canaux SK)

Les canaux SK sont exprimés dans de nombreux types cellulaires et l'observation de leurs propriétés pharmacologiques couplée à l'examen de leurs séquences polypeptidiques indiquent qu'ils sont peu apparentés aux autres familles de canaux K^+ (Khöler et coll., 1996). Ils présentent une conductance unitaire de l'ordre de 80 pS, qui est inférieure à celle des canaux BK, ce qui a conduit à leur dénomination. L'activation des canaux SK est directement liée à l'augmentation de la concentration intracellulaire

de Ca^{2+} et, à la différence des canaux BK, ils se caractérisent par leur absence complète de dépendance au potentiel de membrane (Sah, 1996).

Lors de la propagation d'un potentiel d'action, l'hyperpolarisation qui suit la repolarisation comprend deux phases, une phase rapide (*fAHP*) qui ne persiste que quelques millisecondes, et une phase lente (*sAHP*), qui peut se prolonger pendant plusieurs secondes. La première phase est régulée par les canaux BK, alors que certains canaux SK interviennent dans la régulation de la seconde (Lancaster et coll., 1991 ; Köhler et coll., 1996).

b° Les canaux potassium dépendants du potentiel (K_v)

Le terme de dépendance au potentiel signifie que les canaux appartenant à ce groupe possèdent dans leur structure des éléments qui leur permettent de réagir directement à des variations de potentiel membranaire. Les canaux dépendants du potentiel sont exprimés dans de nombreux types cellulaires, et interviennent dans le maintien du potentiel de membrane, le maintien de l'équilibre osmotique et assurent aussi un rôle critique dans la prolifération de lymphocytes T (DeCoursey et coll., 1987) et de lymphocytes B (Sutro et coll., 1989). Ils occupent de plus une place prépondérante dans la génération des potentiels d'action. Deux types de canaux dépendant du potentiel interviennent dans les phases de repolarisation et d'hyperpolarisation : les canaux de la repolarisation retardée et les canaux des courants sortants transitoires de type A (Connor et Stevens, 1971).

La caractérisation et le clonage d'un gène appelé *Shaker* de la mouche *Drosophila melanogaster* a conduit à l'identification de la première sous-unité α d'un canal K^+ de type voltage-dépendant (Kamb et coll., 1987; Papazian et coll., 1987). Le profil d'hydrophobie déduit du transcrit obtenu suggérait que la protéine s'organise en un centre hydrophobe constitué de six segments transmembranaires notés S1 à S6. Trois autres gènes de drosophile codant pour des protéines présentant la même organisation ont été isolés par la suite, *Shab*, *Shaw* et *Shal*, (Butler et coll., 1989; Covarrubias et coll., 1991).

Des homologues de ces quatre gènes sont retrouvés pour de nombreuses espèces de mammifères. Ces canaux sont appelés $\text{Kv}1$ (homologues du *Shaker*), $\text{Kv}2$ (homologues du *Shab*), $\text{Kv}3$ (homologues du *Shaw*) et $\text{Kv}4$ (homologues du *Shal*) (Chandy et Gutman, 1993). D'autres gènes identifiés chez les mammifères ou les plantes qui n'ont pas d'équivalent chez la drosophile définissent de nouvelles sous-familles $\text{Kv}5$, $\text{Kv}6$, $\text{Kv}7$ (Zhao et coll., 1994), $\text{Kv}8$ (Hugnot et coll., 1996) et $\text{Kv}9$ (Salinas et coll., 1997).

c°) Les canaux rectifiants entrants (canal K_{IR})

Des gènes codant pour des canaux dépendants du potentiel qui sont perméables à de larges flux entrants et à de faibles flux sortants de potassium ont été caractérisés chez les mammifères (Doupnik et coll., 1995) et le nématode (Wei et coll., 1996). Ils se regroupent en sept classes de canaux K^+ nommées Kir1 à Kir7. Les canaux K^+ issus des transcrits de ces gènes sont appelés rectifiant entrants et la résistance à la sortie d'ions K^+ provient d'un blocage du pore par l'ion Mg^{2+} cytosolique, qui limite la sortie d'ions K^+ . L'entrée des ions depuis le milieu extracellulaire déplace le Mg^{2+} , ce qui laisse passer de larges flux entrants (Matsuda, 1991 ;Hille, 1992).

Les canaux Kir ont été identifiés dans plusieurs types cellulaires comme les muscles squelettiques et cardiaques, les neurones, les cellules gliales, sanguines et épithéliales. Ils participent à des fonctions physiologiques variées comme, par exemple, la sécrétion d'insuline (Ashcroft et coll., 1988).

2 Organisation moléculaire des canaux potassium

a°) Les segments transmembranaires

La **figure 1** présente un schéma de l'organisation moléculaire des différentes sous-unités α de canaux K^+ . Chez les vertébrés et les invertébrés, trois classes structurales se distinguent (Wei et coll., 1996), à 2, 4 ou 6 segments transmembranaires. Les sous-unités α possédant 8 segments transmembranaires ont été caractérisées uniquement chez la levure et le nématode. Les canaux de type BK ont un septième segment transmembranaire qui est considéré comme un segment additionnel à un assemblage à 6 segments (Wallner et coll., 1996). Une sous-unité auxiliaire β cytoplasmique (pour les canaux de type Kv) ou membranaire (pour les canaux de type BK) intervient dans les mécanismes de régulation de l'activité des canaux K^+ . La caractéristique conservée dans l'organisation

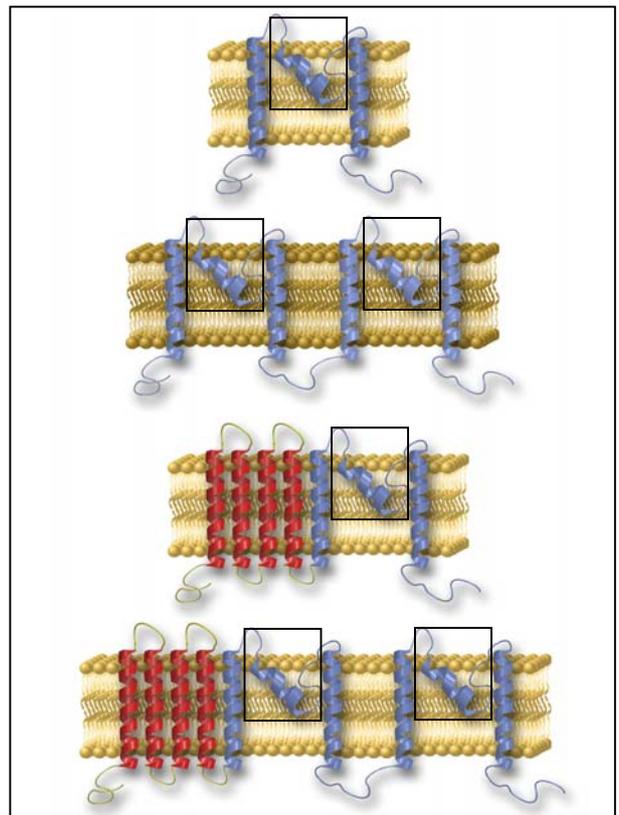


Figure 1 : organisation transmembranaire des différentes sous-unités α des canaux K^+ . De haut en bas : sous-unités à 2, 4 6 et 8 segments transmembranaires. **En rouge :** segments transmembranaires, **en bleu :** segments transmembranaires participant à la formation du pore de conduction et région du pore reliant ces deux segments (**encadrée**).

de toutes les sous-unités α de canaux K^+ est la présence d'au moins une séquence constituant le pore de conduction (la région P ou région H5), séquence encadrée par deux segments transmembranaires (voir **Figure 1**). L'analyse comparative de séquences montre que cette région est fortement conservée pour les canaux K^+ de mêmes types.

b°) Une séquence signature : le filtre de sélectivité

L'étude de la variation de sensibilité de mutants de canaux de type *Shaker* (canal K_v mis en évidence chez la drosophile) à différents bloqueurs du courant potassique (toxines de scorpion et triéthylammonium, TEA) a permis de localiser les sites d'interaction de ces bloqueurs au niveau d'une séquence d'une vingtaine de résidus appartenant à la région P (MacKinnon et Miller, 1989a, 1989b; MacKinnon et Yellen, 1990). L'influence de mutations ponctuelles a montré le rôle essentiel de cette région pour la constitution du pore de conduction (Yool et Schwarz, 1991). Des mutations altérant le blocage exercé par le TEA ont montré que la région P pénètre à l'intérieur de la membrane depuis la face extracellulaire (Yellen et coll., 1991). La comparaison des séquences de régions P de canaux potassium appartenant à plusieurs classes met en évidence une portion de huit résidus (TXXTXGYG), la séquence signature, hautement conservée dans toutes les classes de canaux K^+ (Heginbotham et coll., 1994; Wei et coll., 1996) (voir **figure 2**) et qui comprend des résidus qui sont directement impliqués dans le mécanisme de sélectivité potassique. Ces résidus constituent le filtre de sélectivité aux ions K^+ .

Shaker	D A F W W A V V T M M T V G Y G D M
Shab	E A F W W A G I T M T T V G Y G D M
Shal	A A F W Y T I V T M T T V G Y G D M
Shaw	L G L W W A L V T M T T V G Y G D M
Slo	T C V Y F L I V T M S T V G Y G D V
ROMK1	D A F W W A V V T M T T V G Y G D M

Figure 2 : Séquence signature (en Gras) de plusieurs types de canaux K^+

c°) La sensibilité au potentiel

Le potentiel d'action émis le long des neurones provoque une modification du champ électrique traversant la membrane à laquelle sont sensibles des résidus chargés

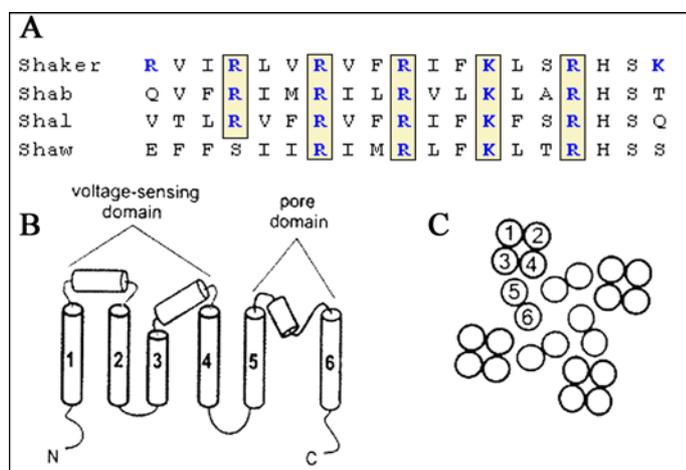


Figure 3 : (A) Alignement des séquences de portions de segments S4 de canaux K⁺. les résidus basiques sont encadrés en jaune clair. (B) Représentation schématique des six segments transmembranaires d'une sous-unité α de canal shaker et (C) de l'organisation de ces six segments au niveau de la membrane (d'après Li-Smerin et coll., 2000b).

du segment transmembranaire S4. Ce segment possède un motif caractéristique comportant des résidus chargés positivement (Arg ou Lys) intercalés entre deux résidus hydrophobes (**figure 3**). Ce motif se retrouve dans les canaux Na⁺ et Ca²⁺ dépendants du potentiel, et a été caractérisé dans certains gènes de canaux K⁺ procaryotes (Islas et Sigworth, 1999). Le nombre de charges positives varie suivant le sous-type de canal considéré, et est en rapport étroit avec les différences de sensibilité au

potentiel qui sont observées. La dépolarisation induit un mouvement du segment S4 correspondant à une translocation d'un certain nombre de charges positives depuis l'intérieur de la membrane vers le milieu extracellulaire (Guy et Conti, 1990). Ce déplacement d'une dizaine de résidus s'effectuerait suivant deux changements de conformation distincts (Sorensen et coll., 2000; Wang et coll., 2000) dont la nature n'est pas bien définie, mais dont l'ampleur devrait certainement dépendre de la longueur de la chaîne reliant les segments S3 à S4 (Gonzalez et coll., 2000).

Un modèle récent de l'organisation de la partie S1-S4 contenant les éléments responsables de la sensibilité au potentiel a été élaboré (Li-Smerin et coll., 2000b, 2000a). Dans ce modèle, les quatre segments transmembranaires se positionnent de telle sorte que le segment S4 établisse des contacts avec les segments S5 et S6 de deux sous-unités α contiguës (voir **figure 3**).

3 La structure tridimensionnelle du canal K⁺ bactérien KcsA

Le canal potassium KcsA, identifié chez la bactérie *Streptomyces lividans*, présente une conductance maximale de 90 pS (Schrempf et coll., 1995). Le canal est activé par le pH intracellulaire (Cuello et coll., 1998), il est fermé à pH neutre et peut être stabilisé dans son état ouvert à pH acide (Heginbotham et coll., 1999). La cristallisation et la résolution de la structure tridimensionnelle du canal a permis de confirmer les

hypothèses évoquées sur la structuration de la région P et apporte de nombreux éclaircissements sur les mécanismes qui régissent la conduction potassique. La structure a été initialement obtenue à 3.2Å de résolution (Doyle et coll., 1998) puis à 2.0Å (Zhou et coll., 2001).

a° Organisation moléculaire du canal KcsA

Le canal KcsA résulte de la tétramérisation de sous-unités α à deux segments transmembranaires M1 et M2 structurés en hélice α , homologues aux segments S5 et S6 des canaux de type *Shaker*. Les quatre segments M2 délimitent la partie interne du pore de conduction et s'organisent à la manière d'un cône dont la partie étroite est orientée vers la face cytoplasmique de la membrane. Les segments M1 délimitent la partie externe du canal (**figure 4**). Les interactions stabilisant l'architecture tétramérique du KcsA sont localisées en majorité entre les hélices internes M2 adjacentes. Ces interactions sont essentiellement apolaires, ce qui facilite les réarrangements structuraux entre les segments transmembranaires lors de l'ouverture et de la fermeture du canal (Rees et coll., 2000).

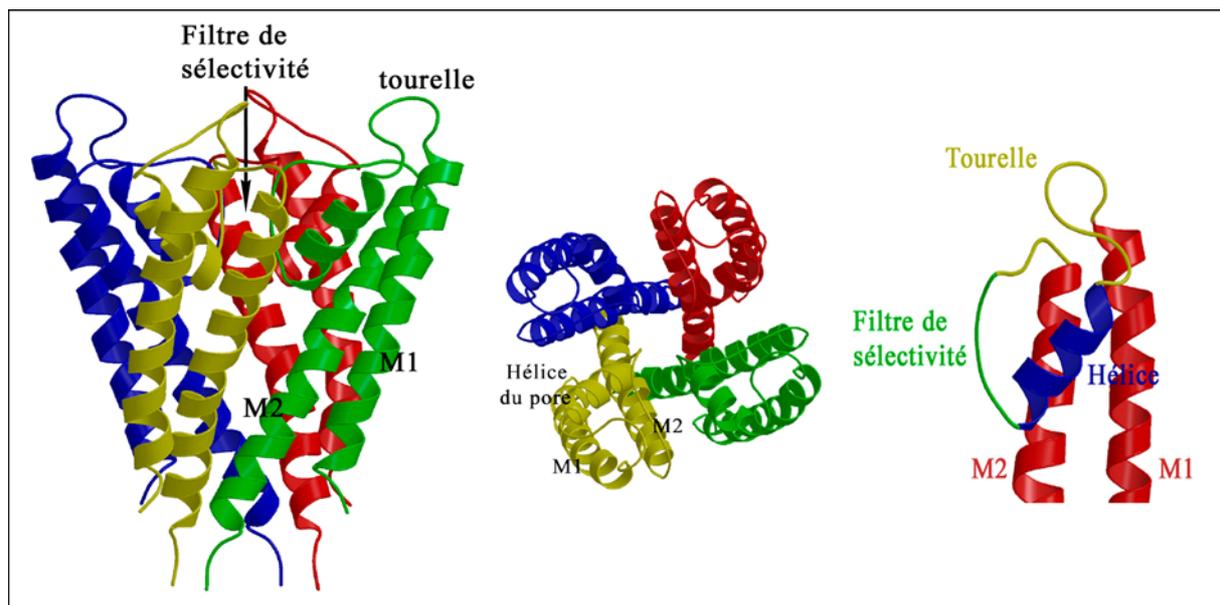


Figure 4 : Représentation de la structure tridimensionnelle du canal K⁺ KcsA. Le filtre de sélectivité, la tourelle, l'hélice du pore et les segments transmembranaires M1 et M2 sont indiqués dans la vue latérale (**à gauche**), de dessus (**au milieu**). La représentation d'un seul monomère du canal facilite la vision des éléments du canal (**à droite**) : les deux hélices α transmembranaires et la région du pore (région P) qui se compose de la tourelle, de l'hélice du pore et du filtre de sélectivité.

L'analyse de la structure tridimensionnelle du canal KcsA au niveau de la région P montre la présence d'éléments de structure secondaire, sous la forme d'une hélice α , appelée P1 ou hélice du pore, longue de 12 résidus (**Figure 4**). En amont de chaque hélice P1, la région P se structure en une large boucle bordant l'extérieur de l'embouchure externe du canal, la tourelle. Le filtre de sélectivité quant à lui suit

directement l'hélice P1. Les quatre hélices α P1 s'organisent de telle sorte à être complètement enchâssées dans le cône constitué par l'agencement des segments transmembranaires M1 (**Figure 4**).

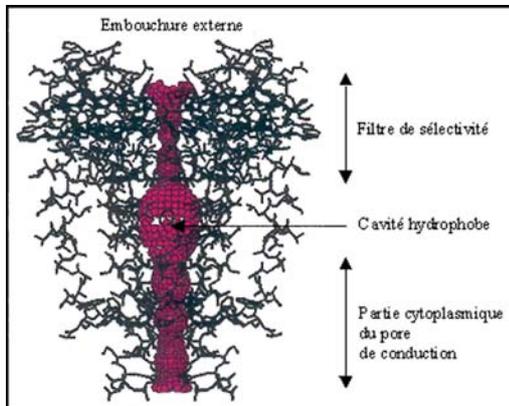


Figure 5 : Représentation des variations du diamètre du pore de conduction du canal KcsA. En rouge : le pore de conduction (d'après Doyle et coll., 1998).

Le diamètre du pore de conduction varie sensiblement le long du canal (**figure 5**) :

i) À partir de l'extrémité cytoplasmique, le pore de conduction présente un diamètre de 7 Å sur le premier tiers de la membrane. Ce diamètre est suffisant pour permettre le passage des ions K^+ hydratés ou du TEA. Vers le centre de la membrane, le pore de conduction s'élargit en une cavité d'hydratation d'un diamètre proche de 10 Å qui peut contenir une cinquantaine de molécules d'eau (Doyle et coll., 1998).

ii) A l'extrémité de la cavité hydrophobe, le filtre de sélectivité délimite ensuite un couloir d'un diamètre nettement plus étroit (~ 3 Å), qui ne permet le passage que d'ions K^+ totalement déshydratés.

iii) Du côté extracellulaire, le filtre de sélectivité s'élargit enfin au niveau d'un large vestibule, l'embouchure externe, qui contient les sites de fixation de plusieurs bloqueurs (TEA (Meuser et coll., 1999) et toxines de scorpions (MacKinnon et coll., 1998)).

b°) Un modèle de la conduction d'ions K^+

La structure cristalline du canal KcsA est à l'origine d'un modèle de la conduction sélective des ions K^+ qui repose sur le fait que la traversée d'une membrane hydrophobe par un ion K^+ est un phénomène énergétiquement très défavorable. L'organisation moléculaire du canal K^+ doit intervenir pour faciliter cette conduction.

La barrière énergétique qu'un ion K^+ doit franchir est maximale au centre d'une membrane cytoplasmique (Parsegian, 1975). Il est proposé que la cavité d'hydratation accessible au solvant au centre de la membrane a pour fonction de limiter les interactions potentielles que l'ion pourrait créer avec des chaînes latérales de résidus polaires, ceci augmentant l'efficacité du transfert des ions (Roux et MacKinnon, 1999; Roux et coll., 2000).

Une autre caractéristique de l'organisation moléculaire du canal KcsA est à prendre en compte pour expliquer la stabilisation des ions K^+ : Les hélices α P1 pointent directement leur extrémité C-terminale dans la direction de la cavité hydrophile, et sont à l'origine de

l'existence d'un potentiel électrostatique négatif dirigé vers le centre de la cavité, ce qui apporte une contribution supplémentaire à la stabilisation des cations présents (Doyle et coll., 1998).

Le filtre de sélectivité, par contre, présente un diamètre étroit qui n'est adapté qu'au

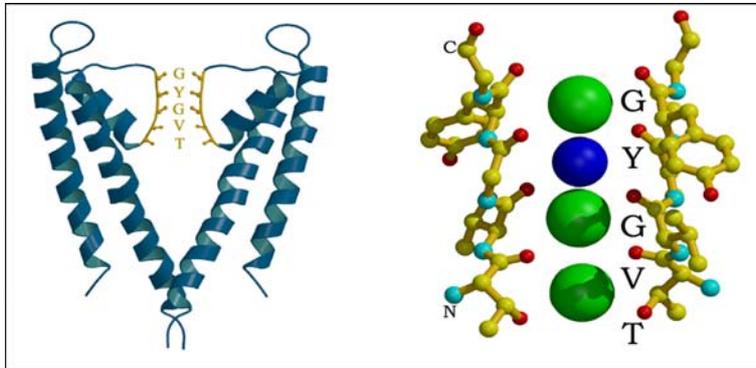


Figure 6 : Représentation de deux segments transmembranaires du canal KcsA (**A gauche**). Le filtre de sélectivité TVGYG est représenté : les ions K⁺ (en vert), intercalés avec une molécule d'eau sont stabilisés par les groupements carbonyles de la chaîne principale (**A droite**).

passage d'un ion K⁺ totalement déshydraté (Doyle et coll., 1998).

La déshydratation des ions est aussi une étape défavorable en terme énergétique. Quatre résidus de la séquence signature (T75, V76, G77 et Y78) exposent les fonctions carbonyles de leur chaîne principale vers la lumière du pore de conduction (**figure 6**).

Lors de l'approche d'un ion K⁺

vers l'entrée du filtre de sélectivité, ces fonctions carbonyles vont rentrer en compétition avec les molécules d'eau qui hydratent l'ion K⁺. Une fois l'ion déshydraté engagé dans le filtre de sélectivité, la pression exercée par d'autres ions en attente de passage dans la cavité hydrophile devrait entraîner un transit rapide vers l'extérieur (Doyle et coll., 1998).

Les ions Na⁺, qui présentent un diamètre inférieur (0.95 Å) à celui des ions K⁺ (1.33 Å) ne sont pas capables d'interagir d'une façon suffisamment forte avec les fonctions carbonyles des résidus du filtre de sélectivité, ce qui devrait limiter leur déshydratation, et explique leur faible probabilité de transit au travers du canal KcsA (Armstrong, 1998).

c°) Les réarrangements conformationnels

La conduction potassique est un événement dynamique, dont nous avons vu qu'il fait intervenir des réarrangements structuraux importants au niveau de plusieurs segments transmembranaires, en particulier lors de l'activation du canal par le potentiel. La structure tridimensionnelle du canal KcsA, telle qu'elle a été décrite précédemment, ne rend compte que d'un seul état du canal. Plusieurs études ont permis d'approcher le comportement dynamique du canal KcsA lors des processus d'ouverture et de fermeture et mettent en évidence des réarrangements structuraux significatifs.

Une étude de résonance paramagnétique électronique (Perozo et coll., 1999) a permis de suivre les réarrangements conformationnels pour plusieurs résidus répartis sur l'ensemble de la structure tridimensionnelle lors de l'ouverture du canal par l'abaissement de pH. De cette analyse il ressort que des déplacements des segments transmembranaires ont lieu, surtout les segments M2, mais uniquement au niveau de

leur moitié cytoplasmique (**figure 7**). Les résultats de ces études de dynamique moléculaire et de RPE mettent en évidence que la moitié extracellulaire du canal, correspondant au filtre de sélectivité et à l'embouchure externe, est nettement plus rigide que la partie inférieure du pore de conduction. Ces résultats ont été confirmés et une structure de l'arrangement des segments M2 lorsque le canal est ouvert a été publiée (Liu et coll., 2001), structure représentée en comparaison de la structure de ces segments dans l'état fermé dans la **figure 7** ci dessous. Cependant, il n'est pas fait mention des facteurs permettant ce changement d'orientation de ces segments.

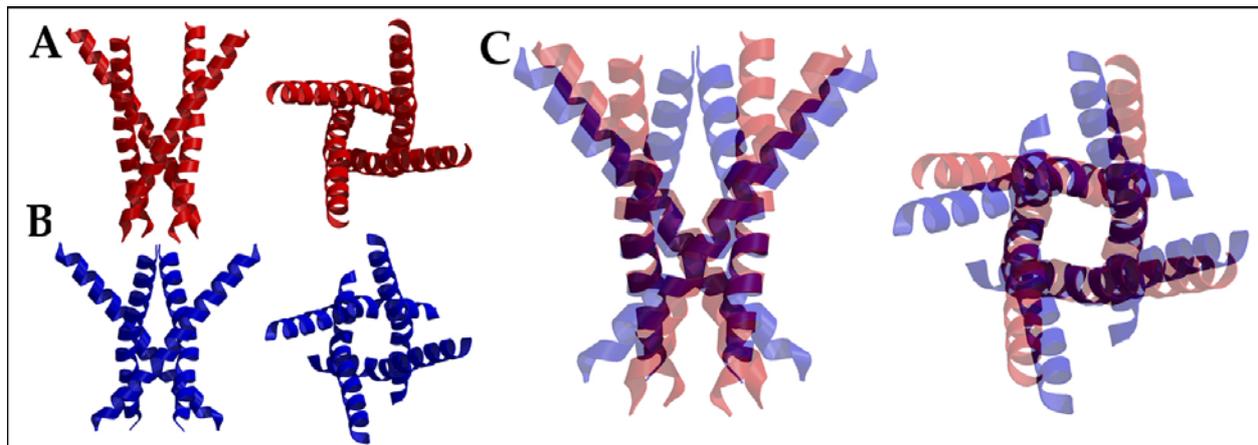


Figure 7 : Vues latérales et de dessus de la structure des seuls segments M2 du canal KcsA à l'état fermé (**A**) et à l'état ouvert (**B**). les deux structures sont superposées (**C**).

4 La structure tridimensionnelle du canal MthK

En ce qui concerne l'ouverture des canaux, la comparaison de séquences de différents canaux potassium a permis à Jiang et son équipe de proposer qu'un domaine structural intracellulaire partagé par de nombreux canaux K^+ bactériens serait important pour l'ouverture de ces canaux et pourrait le cas échéant être un site de fixation de ligands (Jiang et coll., 2001). Ce domaine, appelé RCK pour « *regulates conduction of K^+ ions* », est retrouvé dans les canaux K^+ activés par le calcium de grande conductance (canaux BK) de mammifères (Jiang et coll., 2001).

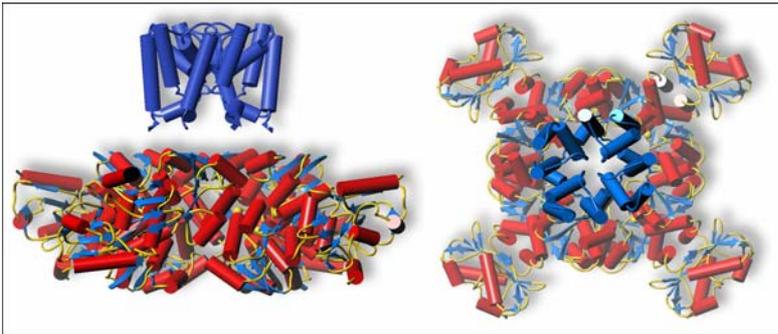


Figure 8 : Structure du canal K⁺ MthK et de l'anneau formé par les 4 dimères de RCK. **A gauche** : vue latérale (en bleu : MthK) . **A droite** : vue de dessus. L'anneau de RCK est coloré suivant les éléments de structure secondaire présents : les hélices α sont en rouge, les feuillets β en bleu et les boucles sont en jaune.

L'équipe de McKinnon a publié très récemment la structure cristallographique à 3.3Å de résolution d'un canal K⁺ bactérien activé par le calcium (Jiang et coll., 2002a, 2002b) : le canal MthK de *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Ce canal, comme le KcsA, se

compose de deux segments transmembranaires en plus de la région P. La structure montre que le canal fonctionnel consiste en 4 sous-unités formant le pore de conduction des ions mais aussi de 4 dimères de RCK (soit la présence de 8 domaines RCK, voir **figures 8 et 9**) qui forment un anneau juste sous la partie cytoplasmique du canal (Jiang et coll., 2002a). Par comparaison avec la structure d'un domaine RCK libre d'*E. coli*, il est proposé que dans le cas du MthK, l'anneau de RCK ainsi formé est maintenu en place par deux types importants d'interfaces : l'une est rigide et fixe et l'autre est flexible (**figure 9**). L'interface flexible est formée en partie par des sous-

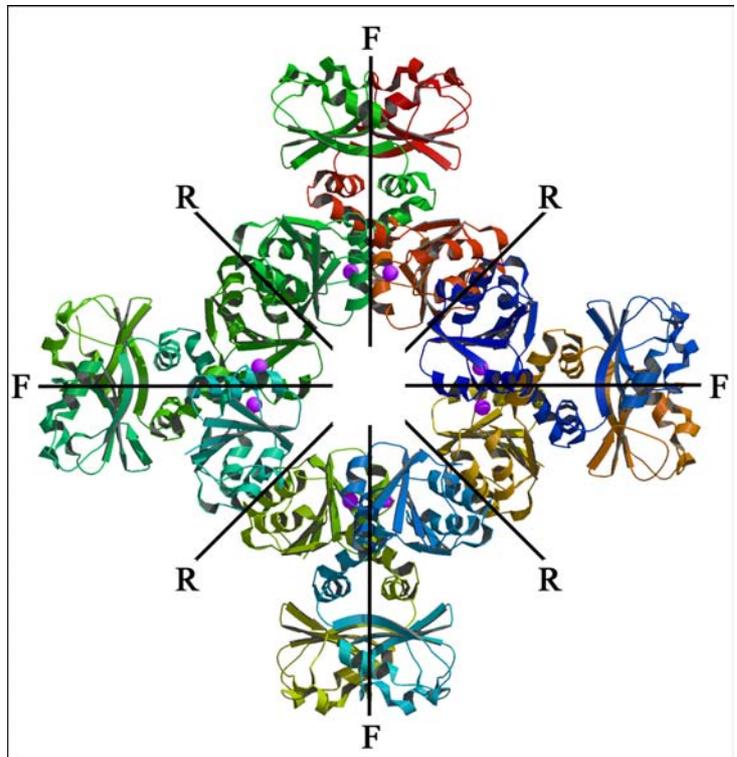


Figure 9 : Représentation des 8 domaines RCK caractérisés par une couleur spécifique pour chacun. Les dimères sont stabilisés par une interface flexible (lettre **F**) et les dimères se stabilisent entre eux par une interface rigide (lettre **R**). Les ions calcium fixés sur les domaines RCK sont représentés par des sphères violettes.

domaines qui émergent des RCK et forment une poche où le ligand vient se fixer. Dans la structure cristallographique, deux ions Ca²⁺ sont clairement identifiés au niveau de cette fissure entre les deux domaines RCK (**figure 9**).

Enfin, la publication de la structure du canal MthK a permis d'obtenir une image du pore à l'état ouvert (Jiang et coll., 2002b), rendant dès lors la comparaison possible avec la structure du KcsA où le pore est à l'état fermé (Doyle et coll., 1998). La **figure 10** représente la superposition de la structure du KcsA et du MthK. La première constatation importante est que la structure et la position du filtre de sélectivité sont très similaires entre les deux structures. La différence majeure entre ces deux états se situe au niveau des segments M2, bien droits dans le KcsA (état fermé) et courbés dans le MthK (état ouvert). MacKinnon et son équipe proposent qu'une glycine et une alanine de ce segment M2, très conservées dans différents canaux K^+ , permettent d'infliger cette courbure au segment lors de l'ouverture du pore (Jiang et coll., 2002b).

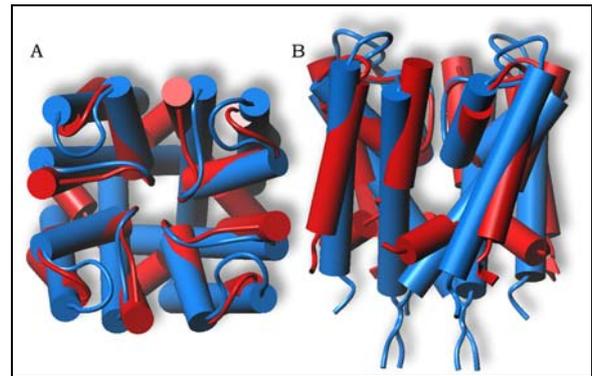


Figure 10 : superposition de la structure du canal KcsA (en bleu) et du MthK (en rouge). Les vues de dessus (**A**) et de côté (**B**) sont représentées.

Bien évidemment, la structure du pore à l'état ouvert est à comparer avec les résultats de l'équipe de Liu (Liu et coll., 2001, voir **figure 7**) : la proposition de réarrangements conformationnels globaux est ici invalidée car en contradiction avec la structure du pore du canal Mthk. De plus, la structure du Mthk présente une conservation stricte de la structure du filtre de sélectivité avec un faible réarrangement du segment M2 dans sa partie extracellulaire, observation satisfaisant pleinement une intégrité fonctionnelle du canal dans sa capacité à sélectionner les ions. Toutefois, la structure du Mthk implique une déstabilisation importante de la structure des segments M2.

II Les canaux calcium voltage-dépendants

Au sein de l'organisme, les canaux calcium ont une fonction des plus ardues. En effet, ils doivent pouvoir sélectionner les ions Ca^{2+} en présence de cations monovalents (Na^+ et K^+) à des concentrations environ 100 fois supérieures. Dans les conditions ioniques physiologiques, ils remplissent parfaitement leur rôle, avec des taux de perméabilité supérieurs à 1000 ($\text{Ca}^{2+}/\text{K}^+$ et $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$).

Ces canaux calcium sont très diversifiés, et on peut distinguer deux grandes familles de canaux calcium : les canaux calcium voltage-dépendant (VSCC) dont l'activation va dépendre du potentiel de membrane et les canaux calcium voltage-indépendant, dont l'activation va dépendre de la fixation de messagers spécifiques, on peut citer comme exemple le canal sensible à la ryanodine (Ozawa, 2001 pour revue).

Notre description se limitera aux canaux calcium voltage-dépendant, seuls canaux que nous citerons dans le chapitre suivant traitant des toxines animales.

1 La diversité des canaux calcium voltage-dépendants

Des études physiologiques et moléculaire ont permis la caractérisation de plusieurs canaux calcium voltage-dépendants (VSCC). L'observation initiale qui permet de discriminer ces canaux concerne l'évaluation du potentiel d'activation du canal concerné : ont ainsi été distingués les canaux calcium qui sont activés par une faible dépolarisation de la membrane (les canaux de type LVA, pour *Low Voltage Activated*) de ceux dont l'activation nécessite une dépolarisation plus importante de la membrane (les canaux de type HVA, pour *High Voltage Activated*) (Carbone et Lux, 1984).

a° Les canaux Ca^{2+} de type LVA

Les canaux de type LVA sont impliqués dans la génération de faibles courants électriques transitoires répétitifs et l'observation de ces courants a conduit à la dénomination de ces canaux sous le terme de canaux de type-T, T pour *Transient* (passager) ou *Tiny* (minuscule) (Nowycky et coll., 1985). Les canaux de types-T montrent de caractéristiques biophysiques uniques : ils s'activent à de plus bas potentiels de membrane (-70mv) et s'inactivent très rapidement (Droogmans et Nilius, 1989). La construction de chimères de canaux de type-L et -T a permis à Staes et son équipe de proposer qu'une région de 23 résidus majoritairement chargée négativement, localisée à l'extrémité C-terminale cytoplasmique est capitale pour cette inactivation rapide (Staes et coll., 2001). La diversité fonctionnelle au sein de ces canaux de type-T existe, mais reste encore relativement peu connue puisque le clonage de canaux de ce type est intervenu

récemment (Huguenard, 1998; Perez-Reyes, 1998; Perez-Reyes et coll., 1998; Perez-Reyes, 1999; Perez-Reyes et coll., 1999; Satin et Cribbs, 2000).

b°) Les canaux Ca^{2+} de type HVA

Un bien plus grand nombre de travaux ont été dévoués à l'identification de différences fonctionnelles au sein des canaux de type HVA. Une distinction initiale concernait les canaux de type-L, dénommés ainsi de par leur grande (*Large*) conductance, et ceux de type-N, désignés ainsi car localisés dans les neurones. La description initiale de ces canaux tenait compte de leurs caractéristiques électrophysiologiques, à savoir une conductance élevée et intermédiaire pour les canaux de type L et N respectivement. Cette description étant trop large, sa variante contemporaine présentée ci-après, tient principalement compte des caractéristiques pharmacologiques de ces canaux.

i Les canaux de type L

Dans le muscle cardiaque, le muscle lisse et le muscle squelettique, la majorité des canaux Ca^{2+} se distinguent par un haut voltage d'activation, une forte conductance (entre 15 et 25 pS), une inactivation lente dépendant du potentiel, une régulation dépendant des voies de phosphorylation (AMPC) et une inhibition spécifique par des composés organiques dont les dérivés des dihydropyridines (DHP) mais aussi par les phénylalkylamines et les benzothiazépines (Reuter, 1983; Nowycky et coll., 1985; Catterall, 2000b pour revue). Ces canaux ont été dénommés canaux calcium de type-L (Nowycky et coll., 1985) mais sont aussi cités comme canaux dihydropyridine sensibles (DHP-sensibles). Ces canaux sont aussi impliqués dans la libération d'hormones des cellules endocrines (Milani et coll., 1990) et dans la régulation de l'expression des gènes dans les neurones (Bean, 1989). Plusieurs variants du gène codant pour la sous-unité principale du canal ($\alpha 1$) ont été caractérisés dans des tissus différents : la sous-unité $\alpha 1_S$ dans le muscle squelettique (Tanabe et coll., 1987), $\alpha 1_C$ dans le muscle cardiaque (Mikami et coll., 1989), $\alpha 1_D$ dans les neurones (Snutch et coll., 1990) et récemment $\alpha 1_F$ dans la rétine (Morgans et coll., 2001).

Les résidus du canal impliqués dans l'interaction avec les DHP ont été caractérisés : il s'agit de résidus localisés au centre des segments transmembranaires 5 et 6 du domaine III (IIIS5 et IIIS6) et du segment 6 du domaine IV (IVS6) de la sous-unité $\alpha 1$ du canal (Striessnig et coll., 1998; Striessnig, 1999, 2001 pour revue). La **figure 11** illustre la structure des DHP et le modèle proposé par Zhorov et son équipe, permettant de visualiser le lieu d'interaction des DHP (Zhorov et coll., 2001). Enfin, contrairement à ce que discute le groupe de Kohno à propos de la conotoxine TxVII (toxine de cône de mer

active de façon spécifique sur ce type de canal), il paraît peu plausible que les

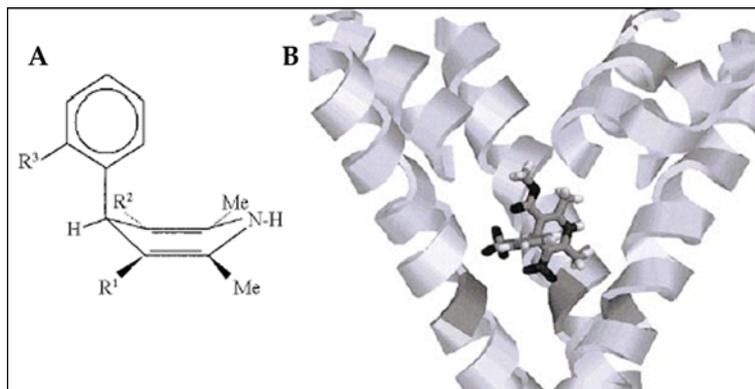


Figure 11 : (A) représentation de la structure générale des DHP : R1, R2 et R3 étant des substituants variables. (B) localisation sur le canal du site d'interaction des DHP, modèle construit à partir de la structure tridimensionnelle du canal K⁺ KcsA (d'après Zhorov et coll., 2001). Ce site d'interaction est trop éloigné du vestibule externe du canal modélisé pour pouvoir appliquer les observations collectées à partir des DHP sur les conotoxines.

renseignements concernant le mode d'interaction des DHP puissent être appliqués au mode d'interaction des toxines de cônes (Kobayashi et coll., 2000).

Les canaux de type-L sont les seuls canaux calcium voltage-dépendant à être inhibés par les DHP et autres composés organiques. Les autres VSCC de type HVA à avoir été caractérisés sont les canaux de type-N, -P/Q, et -R, parfois cités comme le groupe des canaux calcium non-L.

ii Les canaux de type N

Les canaux calcium de type-N ont d'abord été caractérisés comme des canaux de neurones de conductance intermédiaire (20pS) s'inactivant rapidement (Nowycky et coll., 1985; Fox et coll., 1987). D'un point de vue pharmacologique, ils sont caractérisés par leur sensibilité à l'oméga-conotoxine GVIA (Plummer et coll., 1989).

iii Les canaux de type P/Q

Initialement caractérisés dans les neurones de Purkinje du cervelet comme des canaux résistants aux DHP et à l'oméga-conotoxine GVIA (Regan et coll., 1991), les canaux de type-P sont maintenant définis par un blocage rapide par l'oméga-agatoxine-IVA (toxine d'araignée) (Mintz et coll., 1992). Peu après, des canaux résistants aux DHP et à l'oméga-conotoxine GVIA mais bloqués plus lentement et avec moins d'affinité par l'oméga-agatoxine-IVA ont été caractérisés, ils ont été classés comme canaux de type-Q (Zhang et coll., 1993). La distinction entre ces deux types de canaux est difficile à établir d'autant qu'ils sont bloqués avec une très haute affinité par une autre oméga-conotoxine (MVIIC), et la plupart des études portant sur ces canaux font référence aux canaux de type-P/Q (Zhang et coll., 1993; McDonough et coll., 1996).

iv Les canaux de type R

Certains canaux calcium HVA sont résistants à tous les inhibiteurs précités (dihydropyridines, oméga-agatoxine-IVA, oméga-conotoxine GVIA et MVIIC). Ces canaux

de type-R (pour *Resistant*) s'inactivent plus rapidement que les autres canaux de type HVA et s'activent à un plus faible potentiel de membrane (Zhang et coll., 1993). L'inactivation rapide de ces canaux semble être portée par le domaine I de la sous-unité principale (α_{1E}) puisque qu'une chimère $I_{R-type}-II_{Ltype}-III_{Ltype}-IV_{Ltype}$ montre une inactivation semblable à celle des canaux de type L (Bernatchez et coll., 2001).

c°) Une nouvelle classification

Il est important de préciser qu'une nouvelle classification a été récemment établie pour les canaux calcium voltage-dépendants (Ertel et coll., 2000). Par analogie avec les K_V , canaux potassium voltage dépendants (Chandy et Gutman, 1993), les VSCC sont désormais notés Ca_V . les correspondances sont les suivantes : $Ca_{V1.x}$ pour les canaux calcium HVA sensibles aux dihydropyridines (canaux de type-L), $Ca_{V2.x}$ pour les canaux calcium HVA insensibles aux dihydropyridines ($Ca_{V2.1}$ pour les canaux de type-P, $Ca_{V2.2}$ pour les canaux de type-N et $Ca_{V2.3}$ pour les canaux de type-R) et $Ca_{V3.x}$ pour les canaux calcium LVA (canaux de type-T).

Dans un souci d'homogénéité, nous ne nous référerons aux canaux calcium qu'en utilisant l'ancienne classification puisque la majorité des publications citées dans ce manuscrit sont antérieures à cette classification. Le **tableau 2** ci-dessous regroupe les principales caractéristiques des canaux calcium voltage dépendant.

Propriété	Classe				
	L Cav 1.x (HVA)	N Cav 2.2 (HVA)	P/Q Cav 2.1 (HVA)	R Cav 2.3 (HVA)	T Cav 3.x (LVA)
sous-unité alpha	1c, 1D, 1s 1F	1B	1A	1E	1G, 1H
conductance (pS)	11-25	10-20	10-20	15	7-10
pot. Activation	> -30 mv	> -30 mv	> -30 mv	> -30 mv	> -70 mv
inactivation	lente	intermédiaire	lente	rapide	rapide
en ms	> 500	50 - 500	> 500	~ 30	~ 50
conductance relative	Ba2+ > Ca2+	Ba2+ > Ca2+	-	Ba2+ > Ca2+	Ba2+ = Ca2+
durée ouverture (ms)	~ 5	~ 1	4	-	~ 1
sensibilité pharmacologique					
Dihydropyridines	X	-	-	-	-
w-CTX GVIA	-	X	-	-	-
w-CTX MVIIC	-	X	X	-	-
w-Aga IVA	-	-	X	-	-
w-Aga IIIA	X	X	X	-	-

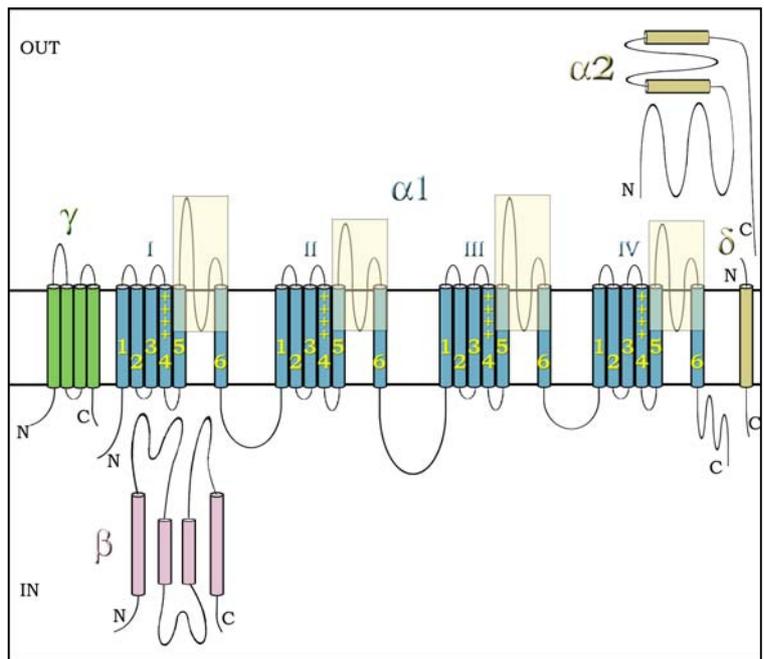
Tableau 2 : propriétés électrophysiologiques et sensibilité pharmacologique des différents types de canaux calcium voltage-dépendant. Entre parenthèses est indiqué la dénomination utilisée dans la nouvelle classification de ces canaux (modifié d'après Triggle, 1999).

2 Organisation moléculaire des VSCC

Qu'ils soient de type HVA ou LVA, les canaux Ca^{2+} voltage-dépendants possèdent tous une sous-unité principale ($\alpha 1$) portant les domaines nécessaires à la fonction principale du canal : le pore sélectif au calcium et le domaine de sensibilité au voltage et aux modulateurs pharmacologiques (Catterall, 1996; Mitterdorfer et coll., 1998; Catterall, 2000b pour revue). Cette sous-unité se compose de 4 domaines répétés, domaines homologues mais pas identiques qui contiennent chacun 6 segments transmembranaires (notés de S1 à S6) : les segments hydrophobes sont conservés en séquence et les boucles intra- et extracellulaires montrent une plus grande variabilité. Les extrémités N- et C-terminales sont cytoplasmiques. Tout comme pour les canaux K^+ , le segment transmembranaire S4 comporte un certain nombre de résidus chargés dans un environnement hydrophobe. Cette particularité confère à ce segment d'être responsable de la sensibilité au potentiel de membrane (voir chapitre I pour les références). La boucle extracellulaire entre les segments S5 et S6 joue un rôle prépondérant dans la sélectivité aux ions Ca^{2+} (Kim et coll., 1993; Yang et coll., 1993). La diversité fonctionnelle des canaux Ca^{2+} est la répercussion directe des diverses sous-unités $\alpha 1$ qui ont été clonées. La première de ces sous-unités à être clonée fut celle du canal de type L du muscle squelettique (Tanabe et coll., 1987) suivie peu après par 5 sous-unités $\alpha 1$ supplémentaires, incluant 2 canaux de type L supplémentaires et 3 autres canaux HVA (Mikami et coll., 1989; Snutch et coll., 1990). Ce n'est qu'en 1998 que fut clonée la première sous-unité $\alpha 1$ d'un canal de type LVA (Perez-Reyes, 1998; Perez-Reyes et coll., 1998). De manière somme toute logique, les séquences de canaux LVA diffèrent fortement de celles des canaux HVA sauf au niveau des domaines fonctionnels cruciaux (le domaine de sensibilité au voltage et les boucles impliquées dans la formation du pore de conduction des ions) qui sont fortement conservés.

La structure des canaux Ca^{2+} ne se limite pas à une sous-unité $\alpha 1$ mais se compose d'autres sous-unités révélées par des études biochimiques. Ainsi ont été mises en évidence les sous-unités β , γ et $\alpha 2\delta$ (Curtis et Catterall, 1984; Leung et coll., 1987; Takahashi et coll., 1987). Un modèle d'organisation de ces sous-unités a été proposé (voir **figure 12**), modèle centré sur la sous-unité principale $\alpha 1$ de 230 KDa en association avec la sous-unité $\alpha 2\delta$ de 170 KDa, la sous-unité cytoplasmique β de 55 KDa et la sous-unité transmembranaire γ de 33 KDa (Takahashi et coll., 1987). La sous-unité β s'organise autour de plusieurs hélices α mais reste cytoplasmique (Ruth et coll., 1989). La sous-unité γ est glycosylée et contient 4 segments transmembranaires (Jay et coll., 1990).

La sous-unité α_2 possède de nombreux sites de glycosylation et quelques segments hydrophobes (Ellis et coll., 1988) mais cette protéine est extracellulaire, extrinsèque car indirectement rattachée à la membrane grâce à un pont disulfure engagé avec la sous-unité transmembranaire δ (Gurnett et coll., 1996). Cette dernière est codée par l'extrémité 3' de la séquence codante portée par le même gène que la sous-unité α_2 , et



la forme mature de la sous-unité $\alpha_2\delta$ est obtenue par modifications post-traductionnelles (De Jongh et coll., 1991; Jay et coll., 1991).

Figure 12 : organisation des différentes sous-unités contenues dans les canaux Ca^{2+} , chacune colorée différemment : α_1 en bleu, β en rose, γ en vert et $\alpha_2\delta$ en jaune foncé. I, II, III et IV correspondent aux 4 domaines à six segments transmembranaires (1 à 6). Les signes +++ correspondent au segment S4, impliqué dans la sensibilité au voltage. Les boucles reliant les boucles reliant les segments S5 et S6, contenant la région du pore, sont encadrées

Le rôle de ces différentes sous-unités est relativement mal connu et l'expression de la seule sous-unité α_1 est suffisante pour obtenir un canal Ca^{2+} fonctionnel, avec toutefois des propriétés électrophysiologiques anormales (Perez-Reyes et coll., 1989).

Il est admis que la sous-unité β , cytoplasmique, est impliquée dans le processus d'inactivation du canal (Hanlon et Wallace, 2002 pour revue), inactivation faisant aussi intervenir les boucles intracellulaires reliant les domaines I-II et III-IV (Geib et coll., 2002). Quatre gènes codant pour ces sous-unités β ont été caractérisés (de β_1 à β_4 , avec des variants qui existent pour chacun) et il a été montré que chaque sous-unité α_1 est associée à plusieurs sous-unités β différentes (Liu et coll., 1996; Pichler et coll., 1997), renforçant l'idée que l'hétérogénéité d'association de ces sous-unités joue un rôle important dans la modulation des canaux Ca^{2+} .

En ce qui concerne les autres sous-unités, les données sont plus rares : La fonction précise de la sous-unité $\alpha_2\delta$ n'est pas connue. Quant à elle, La sous-unité γ , transmembranaire, a été caractérisée dans les canaux de type-L des muscle squelettique et cardiaque (Chang et Hosey, 1988; Kuniyasu et coll., 1992) et semble spécifique pour le tissu musculaire associé à ce canal, puisque dans les neurones de mammifères cette

sous-unité γ n'est pas présente dans les canaux de type-L (Ahlijanian et coll., 1990). Elle n'a qu'un effet limité sur la dépendance au voltage. Toutefois cette sous-unité n'est pas exclusivement associée aux canaux de type-L, une nouvelle sous-unité γ ayant été décrite dans un canal de type-P de neurones (Letts et coll., 1998).

3 La perméation sélective des ions calcium

Pour comprendre comment les canaux calcium remplissent si bien leur fonction, il faut percevoir comment ce canal peut être aussi perméable aux ions dont il est sélectif. La perméation et la sélectivité sont dépendantes de la concentration extracellulaire en calcium. En absence de Ca^{2+} , le canal est non sélectif, permettant la perméation de cations monovalents aussi encombrants que le tétraméthylammonium (McCleskey et Almers, 1985). Lorsque la concentration extracellulaire en Ca^{2+} avoisine $1 \mu\text{M}$, le canal est imperméable à tout cation, un ion Ca^{2+} devant se trouver stabilisé dans le filtre de sélectivité. La perméation des ions calcium n'est possible que lorsque cette même concentration est d'environ 1mM (Almers et McCleskey, 1984; Hess et Tsien, 1984).

Les données fondamentales concernant les bases structurales de la sélectivité vis à vis du calcium proviennent d'une publication traitant de canaux sodium (Heinemann et coll., 1992). En effet, les auteurs ont remarqué la présence de 4 glutamates au sein de la

Clone	Motif I	Motif II
	(aa.326-337*)	(aa.669-680*)
α_1 1.2	T V F Q C I T M E G W T	T V F Q I L T G E D W N
α_1 1.1	T V Y Q C I T M E G W T	S V F Q V L T G E D W N
α_1 1.3	T V F Q C I T M E G W T	T V F Q I L T G E D W N
α_1 1.4	T V F Q C I T M E G W T	T V F Q I L T G E D W N
α_1 2.1	T V F Q C I T M E G W T	T V F Q I L T G E D W N
α_1 2.2	T V F Q C I T M E G W T	T V F Q I L T G E D W N
α_1 2.3	T V F Q C I T M E G W T	T V F Q I L T G E D W N
α_1 3.1	A I F Q V I T L E G W V	T V F Q I L T Q E D W N
α_1 3.2	A I F Q V I T L E G W V	T V F Q I L T Q E D W N
α_1 3.3	V I F Q V I T L E G W V	T V F Q I L T Q E D W N

Clone	Motif III	Motif IV
	(aa.1078-1090*)	(aa.1379-1391*)
α_1 1.2	A L F T V S T F E G W P E	L L F R C A T G E A W Q D
α_1 1.1	S L F T V S T F E G W P Q	L L F R C A T G E A W Q E
α_1 1.3	A L F T V S T F E G W P A	L L F R C A T G E A W Q E
α_1 1.4	A L F T V S T F E G W P A	L L F R C A T G E A W Q E
α_1 2.1	T L F T V S T G E G W P Q	L L F R S A T G E A W H N
α_1 2.2	T L F T V S T G E G W P M	L L F R S A T G E A W H E
α_1 2.3	T L F T V S T G E G W P Q	L L F R S A T G E A W Q E
α_1 3.1	S L F V L A S K D G W V D	T L F R V S T G D N W N G
α_1 3.2	S L F V L S S K D G W V N	T L F R V S T G D N W N G
α_1 3.3	S L F V L A S K D G W V N	T L F Q V S T G D N W N G

Figure 13 : Alignement de séquences des différents types de canaux calcium voltage-dépendant. La numérotation correspond au canal Cav1.2 (L-type), de même qu'en rouge sont indiqués les résidus qui diffèrent de celui-ci. Les glutamates conservés formant le filtre de sélectivité sont surlignés en bleu, noter le remplacement des glutamates par des aspartates dans les deux derniers domaines dans les séquences des canaux Cav3.x (canaux de type-T).

séquence du canal calcium : chacun appartient à un des 4 domaines de la sous-unité α_1 , est séparé des autres par environ 500 résidus et tous se trouvent ainsi localisés dans la boucle S5-S6 (la région du pore). Les résidus correspondants dans le canal sodium sont un aspartate, un glutamate, une lysine et une alanine. En clair, dans le canal calcium on trouve le motif EEEE qui s'oppose au motif DEKA dans le canal sodium. L'intéressant dans tout ceci est que le remplacement du motif DEKA par EEEE dans le canal sodium conduit à une profonde modification de sélectivité, le canal sodium devenant sélectif aux ions calcium et montrant les même caractéristiques de

perméation que le canal calcium (dépendance à la concentration en calcium extracellulaire). Ces données imposent une conclusion : le motif EEEE appartient au filtre de sélectivité des canaux calcium (voir **figure 13**) et le motif DEKA appartient au filtre de sélectivité des canaux sodium.

Dans le canal Ca²⁺ de type-L, la mutation de chacun des glutamates par une glutamine montre une participation distincte dans la perméation pour chacun d'eux, le remplacement du glutamate du domaine III ayant l'effet le plus fort, à savoir l'augmentation de la concentration en calcium extracellulaire où le canal devient imperméable à tout cation (Yang et coll., 1993). Cette distinction dans la participation des glutamates à la perméation exclue la possibilité d'un arrangement symétrique de ces résidus au sein du filtre de sélectivité du canal, auquel cas chaque glutamate aurait un rôle équivalent aux autres (Yang et coll., 1993). Enfin, la simple mutation d'un glutamate par une lysine abolit complètement l'état où le canal est imperméable à tout cation. Cette observation indique qu'il n'y a pas de site de haute affinité pour le calcium autre que celui défini par les 4 glutamates (Yang et coll., 1993; Ellinor et coll., 1995).

La caractérisation de ce *locus* EEEE est bien évidemment importante, mais encore faut-il connaître quelle est l'organisation structurale du pore du canal calcium, à savoir qu'elle est l'orientation des chaînes latérales de ces résidus et quels motifs de structures secondaires sont présents.

La publication de la structure du canal potassium KcsA (Doyle et coll., 1998) et plus récemment celle du canal potassium MthK (Jiang et coll., 2002a) montrent que les résidus formant le filtre de sélectivité exposent les fonctions carbonyles du squelette peptidique vers la lumière du pore, les chaînes latérales étant orientées vers le cœur de la protéine. Les mutations au sein du *locus* EEEE indiquent que le groupement carboxylate de la chaîne latérale de ces résidus est impliqué dans la sélection des ions (voir **figure 14**). Il importe donc que ces résidus exposent leur chaîne latérale vers la lumière du pore, sachant que pour un résidu donné, les contraintes stériques ne permettent pas à la chaîne latérale et au groupement carbonyle d'être projetés dans la même direction. Xin-Sheng Wu et son équipe ont déterminé quelle est l'orientation de la chaîne latérale des glutamates et des résidus attenants en position +/-1 et +/-2 (Wu et coll., 2000). Pour ce faire, ils ont procédé à la mutation de ces résidus par une cystéine (1 substitution par mutant) et ont utilisé des agents se liant de façon covalente aux soufres (dérivés de méthane-thiosulfonate) pour observer l'effet sur la conduction des ions, en postulant qu'un mutant est rendu non perméable par obstruction du pore par l'agent modifiant. Les résultats montrent que les 4 glutamates exposent leur chaîne latérale vers l'intérieur du pore de conduction, ainsi que la plupart des résidus du filtre

situés en position +1 ou -1 de ceux-ci (Wu et coll., 2000). La même procédure expérimentale a été utilisée (une substitution par mutant) pour explorer la topologie du pore du canal calcium avec un nombre de résidus mutés plus importants : de la position -7 à +3 (sur chacun des 4 domaines), 0 représentant la position en séquence du glutamate (Koch et coll., 2000). Les résultats montrent que, pour les domaines II et III, plusieurs mutants successifs sont accessibles aux dérivés de méthaneéthiosulfonate (MTS) (positions de 0 à +2 pour le domaine II et de 0 à +3 pour le domaine III), indiquant que pour ces deux domaines, la région contenant le filtre de sélectivité ne présente pas d'éléments de structure secondaire. De la même manière, des mutants du domaine I aux résidus alternativement sensibles aux dérivés de MTS (position -2, 0 et +2 sont sensibles) indiquent la présence d'un brin β . Enfin, des mutants du domaine IV sensibles par périodicité de 2 résidus impliquent la présence d'une hélice α (Koch et coll., 2000). Pour résumer ces résultats quelque peu étonnants, à l'hétérogénéité de séquence de la région du pore s'ajoute une hétérogénéité de topologie de cette même région : 2 domaines sont en random coil (II et III), un en brin β (I) et un en hélice α (IV). La **figure 14** illustre ces résultats.

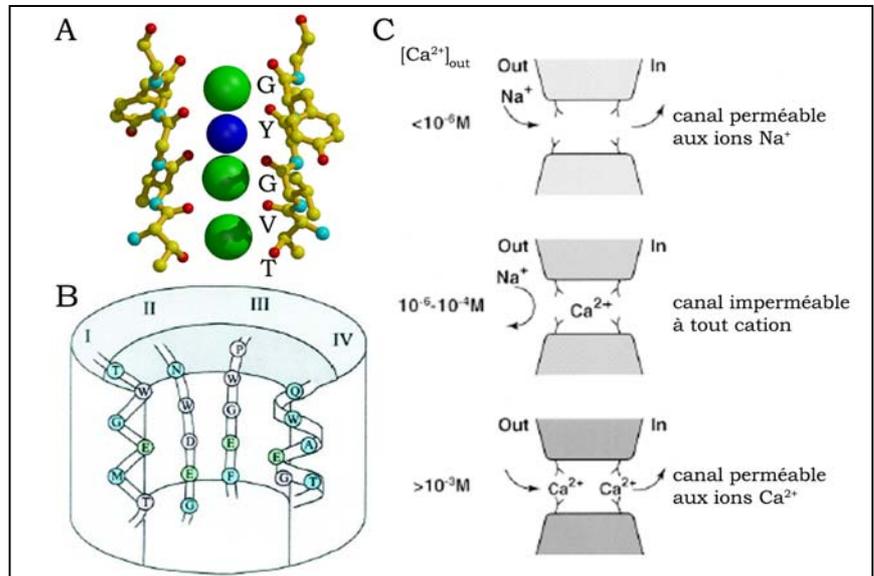


Figure 14 : (A) Représentation du filtre de sélectivité du canal potassium où les résidus exposent leur fonction carbonyle vers la lumière du pore. (B) modèle présentant les éléments de structures secondaires putatifs des régions des 4 domaines formant le filtre de sélectivité (d'après Koch et coll., 2000). (C) vision des 4 glutamates et des états de perméation du canal suivant les concentrations en calcium dans le milieu extracellulaire : perméable aux cations monovalents, imperméable à tout cation ou perméable aux ions Ca^{2+} .

Toutefois, une topologie différente a été proposée bien que ne se basant que sur des données *in silico* : Lipkind et Fozzard, par modélisation moléculaire, proposent que les quatre domaines présentent le même motif α/β , les glutamates étant localisés dans le coude reliant l'hélice α au brin β (Lipkind et Fozzard, 2001). Ces résultats divergent, mais il est clair que la topologie de la région du pore et que le filtre de sélectivité des canaux calcium divergent fortement de ceux des canaux potassium.

III Les canaux sodium

Les canaux sodium voltage dépendants sont des éléments critiques de l'initiation et de la propagation du potentiel d'action dans les cellules excitables, étant responsables de la dépolarisation initiale de la membrane.

1 Classification des canaux sodium

Contrairement aux différentes classes de canaux potassium et calcium, les propriétés fonctionnelles des canaux sodium caractérisés sont relativement similaires. Malgré ces similitudes fonctionnelles, les canaux sodium ont été cités de façon un peu anarchique, avec des noms numériques ou basés sur les tissus d'origine des premiers clones caractérisés. Se basant sur la nomenclature des K_v (Chandy et Gutman, 1993) et des Cav (Ertel et coll., 2000), il a été proposé que les canaux sodium voltage dépendant soient appelés Nav (Goldin et coll., 2000).

Actuellement, une seule famille a été caractérisée (Nav_1) avec 9 sous-familles (de $Nav_{1.1}$ à $Nav_{1.9}$) déterminée par comparaison des séquences. Ces sous-familles se subdivisent en différents sous-types selon le nombre de variants caractérisés (Goldin, 2001, 2002 pour revue).

2 Organisation moléculaire des canaux sodium

a°) Topologie des canaux sodium

Tout comme pour les canaux calcium décrits précédemment, la sous-unité principale (α) des canaux sodium est une protéine de 260-280 KDa composée de 4 domaines répétés (I, II, III et IV) homologues mais non identiques (Noda et coll., 1984). Chaque domaine est là aussi composé de 6 segments transmembranaires (de S1 à S6) organisés en hélice α , avec le segment S4 chargé positivement avec un nombre conservé de résidus basiques localisés toutes les 3 positions, suggérant que ce segment est impliqué dans la sensibilité au voltage. La région du pore est aussi contenue dans la boucle reliant les segments S5-S6, les extrémités N- et C-terminales sont localisées sur la face intracellulaire du canal et les boucles connectant les domaines I-II et II-III sont plus longues que celle reliant les domaines III-IV. La sous-unité α présente des sites de glycosylation (boucles extracellulaires) et de phosphorylation (boucles intracellulaires) (Catterall, 2000a; Denac et coll., 2000 pour revue). L'extrémité C-terminale de la sous-unité α du muscle cardiaque, intracellulaire, semble impliquée dans l'intensité du courant et dans l'inactivation du canal (Mantegazza et coll., 2001); L'analyse par dichroïsme circulaire suggère qu'elle s'organise en la succession de 6 hélices α (Cormier

et coll., 2002). En ce qui concerne l'inactivation des canaux sodium, celle-ci peut être modifiée par l'altération de la boucle reliant les domaines III-IV (Vassilev et coll., 1988, 1989). Au sein de cette boucle, seules les mutations des résidus I1488 et M1490 réduisent l'inactivation de façon significative et la mutation de F1489 annihile cette inactivation (West et coll., 1992). Il a été suggéré que l'inactivation soit centrée sur le résidu F1489 occluant l'extrémité du pore de conduction des ions (Kellenberger et coll., 1996) et que la thréonine 1491 stabilise l'état inactivé du canal (Kellenberger et coll., 1997). Aucune structure cristallographique de canal sodium n'a encore été résolue, toutefois une carte de cryo-microscopie électronique à basse résolution a été publiée, où les auteurs spéculent sur l'organisation symétrique (d'ordre 4) du canal alors qu'à 19Å de résolution, on ne peut distinguer de telles caractéristiques (Sato et coll., 2001). La forme générale de la protéine vérifie toutefois l'organisation de la sous-unité α présentée dans la **figure 15** ci-dessous.

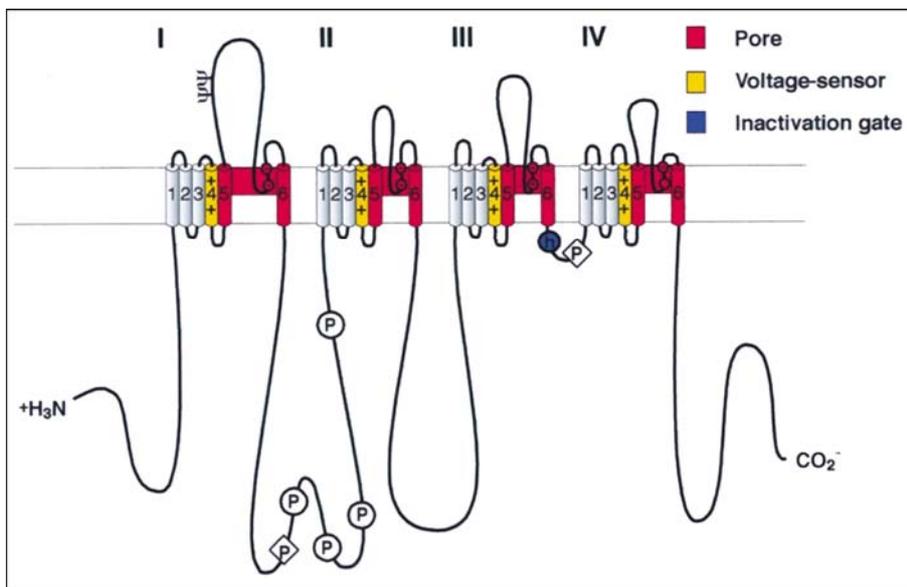


Figure 15 : Topologie de la sous-unité α des canaux sodium. Les quatre domaines sont numérotés de **I à IV**. Les segments S6 et S6 ainsi que la boucle les reliant qui participent à la formation du pore de conduction sont colorés en **rouge**. Les segments S4, impliqués dans la sensibilité au voltage sont colorés en **jaune**. Les résidus IFM impliqués dans l'inactivation du canal sont définis par la boule **bleue**. Les sites de phosphorylation sont indiqués (**lettre P**) ainsi que les sites de glycosylation (**ψ**).

En plus de cette sous-unité principale (α), la présence d'une ou plusieurs sous-unités β a été remarquée, dont 3 différents ont été caractérisées à ce jour : β 1 (Beneski et Catterall, 1980), β 2 (Hartshorne et coll., 1982) et plus récemment β 3 (Morgan et coll., 2000). Contrairement aux sous-unités β des canaux Ca²⁺ et K⁺, les sous-unités β des canaux Na⁺ sont des glycoprotéines transmembranaires et ressemblent plus d'ailleurs à la sous-unité $\alpha_2\delta$ des canaux Ca²⁺ car comme elles, les sous-unités β ne possèdent qu'un segment transmembranaire (Catterall, 1995 pour revue). Par contre et de façon commune aux sous-unités β des autres canaux décrits, les sous-unités β de canaux sodium ont une fonction régulatrice de sur ces canaux.

b°) Sélectivité et perméation

C'est grâce à leur haute affinité et spécificité que les neurotoxines ont permis la découverte des canaux sodium. La tétrodotoxine et la saxitoxine ont permis l'identification du pore de conduction des ions et du filtre de sélectivité. Le modèle d'interaction de ces deux toxines est centré sur une occlusion directe du pore par celles-ci (Catterall, 1995; Catterall, 1996 pour revue). Des mutations ponctuelles sur la région du pore ont permis d'identifier le glutamate E387 sur le domaine I comme critique pour la fixation de la tétrodotoxine et de la saxitoxine (Noda et coll., 1989), il en est de même pour des résidus en position analogue sur les autres domaines (Terlau et coll., 1991). Ces quatre glutamates forment un anneau situé sur la face externe du pore. D'autres résidus, en un autre locus, ont été caractérisés comme responsables de la sélectivité : les résidus D (domaine I), E (domaine II), K (domaine III) et A (domaine IV). Le remplacement de ces résidus par les 4 glutamates analogues du canal calcium provoque une modification de la sélectivité (Heinemann et coll., 1992). Cet anneau DEKA est situé sur la face intracellulaire du filtre de sélectivité. Donc, côté extracellulaire se trouve l'anneau EEDD (anneau externe), et côté intracellulaire du filtre de sélectivité se trouve l'anneau DEKA (anneau interne). Des mutations dans ces deux anneaux EEDD et DEKA ont des effets importants sur la sélectivité des cations monovalents, en accord avec l'idée que ces deux anneaux sont responsables de la sélectivité (Schlief et coll., 1996; Sun et coll., 1997).

3 Sites d'interaction avec les toxines

Aujourd'hui, 6 sites d'interaction avec des effecteurs divers ont été caractérisés sur le canal sodium. Deux sites supplémentaires, impliqués dans l'interaction avec des toxines de scorpion spécifiques des canaux d'insecte, n'ont toujours pas été caractérisés. Enfin, sur ces 6 sites d'interaction (ou sites récepteurs), la localisation de 5 d'entre eux a été déterminée.

a°) Interaction au niveau du pore : le site récepteur 1

Le site récepteur 1 sur les canaux sodium est occupé par deux groupes de toxines : d'une part les guanidines hétérocycliques que sont la tétrodotoxine (TTX) et la saxitoxine (STX) et d'autre part les mu-conotoxines (μ -CTx). La fixation de ces toxines sur ce site récepteur bloque la conduction du sodium (Hille, 1975; Ohizumi et coll., 1986) et la localisation des résidus incriminés dans sa sensibilité à la TTX et à la STX a été déterminée par des expériences de mutagenèse dirigée : ce site met en jeu deux groupes de 4 résidus répartis sur chacun des domaines du canal, les anneaux EEDD et DEKA (Noda et coll., 1989; Terlau et coll., 1991). En ce qui concerne les μ -CTx, leur fixation est

compétitive de celle de la TTX (Moczydlowski et coll., 1986b) mais le fait que certaines mutations sur le canal affectent l'affinité de la TTX sans altérer la fixation des μ -CTx suppose que ces deux groupes de toxines partagent deux sites très proches qui se chevauchent (Stephan et coll., 1994; Dudley et coll., 1995).

b°) Interaction altérant la dépendance au potentiel

On distingue deux types de sites récepteurs altérant la dépendance au potentiel : ceux localisés au sein de la membrane (sites récepteurs 2 et 5) et ceux localisés sur la face extracellulaire du canal (sites récepteurs 3, 4 et 6). Les sites d'interaction localisés au sein de la membrane n'ont que peu d'intérêt dans l'interaction toxine/canal et ne seront pas décrits. On peut juste dire que ces sites sont la cible commune des toxines comme la batrachotoxine et l'acotinine. L'interaction en ces sites provoque un blocage de l'inactivation et un déplacement de l'activation à des potentiels de membrane plus bas (Catterall, 1995; Catterall, 1996; Cestele et Catterall, 2000 pour revues).

i Le site récepteur 3

Ce site récepteur est la cible de plusieurs types de toxines : les toxines de scorpion de classe α , les toxines d'anémone de mer et certaines toxines d'araignées. Ces toxines ralentissent ou bloquent la phase d'inactivation du canal (Pauron et coll., 1985; Eitan et coll., 1990; Nicholson et coll., 1994; Nicholson et coll., 1998). Dès lors que les résidus cruciaux mis en jeu par ces toxines pour la reconnaissance de ce site ont été mis en évidence (el Ayeb et coll., 1986; Kharrat et coll., 1989; Gallagher et Blumenthal, 1994), il est apparu que ces résidus sont de nature basique. Se basant sur des études préliminaires ayant localisé ce site récepteur dans les boucles extracellulaires reliant les segments transmembranaires S5-S6 des domaines I et IV (Tejedor et Catterall, 1988; Thomsen et Catterall, 1989), Rogers et son groupe ont décidé de remplacer tous les résidus acides des boucles extracellulaires des domaines I et IV par des résidus neutres (Rogers et coll., 1996). Les résultats montrent que ce sont les résidus acides localisés dans la boucle reliant les segments S3-S4 du domaine IV qui sont impliqués dans l'interaction avec ces toxines. Les segments S4 sont porteurs de la sensibilité au potentiel du canal et il a été proposé que ces toxines gênent le mouvement du segment S4 du domaine IV et empêchent par voie de conséquence l'inactivation rapide du canal (Rogers et coll., 1996).

ii Le site récepteur 4

Ce site récepteur 4 est occupé par une autre classe de toxines de scorpion : les toxines de classe β . Ces toxines induisent une activation de ces canaux pour des valeurs

de potentiel de membrane plus négatives (hyperpolarisantes) et une baisse de l'amplitude des courants de sodium (Jover et coll., 1980; Jaimovich et coll., 1982; Meves et coll., 1982) dans le muscle squelettique et le cerveau, mais pas dans le cœur. La construction de chimères de canaux sodium cardiaques dont on a remplacé les boucles extracellulaires par celle du canal sodium extrait du cerveau a permis de mettre en évidence le rôle prépondérant des boucles liant les segments S1-S2 et S3-S4 du domaine II pour la fixation de ces toxines (Cestele et coll., 1998).

iii Le site récepteur 6

La delta-conotoxine (δ -CTx) TxVIA, toxine extraite du venin du cône de mer *Conus textile* et hautement active sur les mollusques, a permis l'identification du site récepteur 6 sur les canaux sodium. Cette toxine provoque une prolongation des potentiels d'action résultant de l'inhibition spécifique de l'inactivation des canaux sodium (Fainzilber et coll., 1994). Bien que δ -CTx-TxVIA provoque les mêmes effets que les toxines se fixant sur le site 3, sa fixation n'est pas influencée par le potentiel de membrane (Fainzilber et coll., 1994). La localisation précise de ce site récepteur sur le canal n'a pas encore été rapportée. La **figure 16**, ci-dessous, résume les données actuellement connues sur les sites d'interaction des toxines sur le canal sodium.

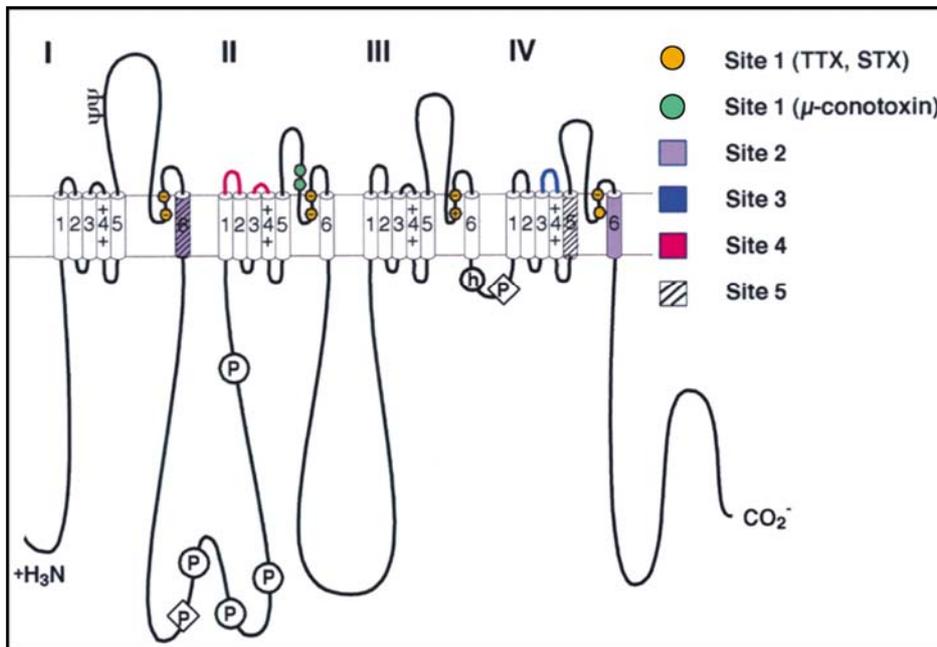
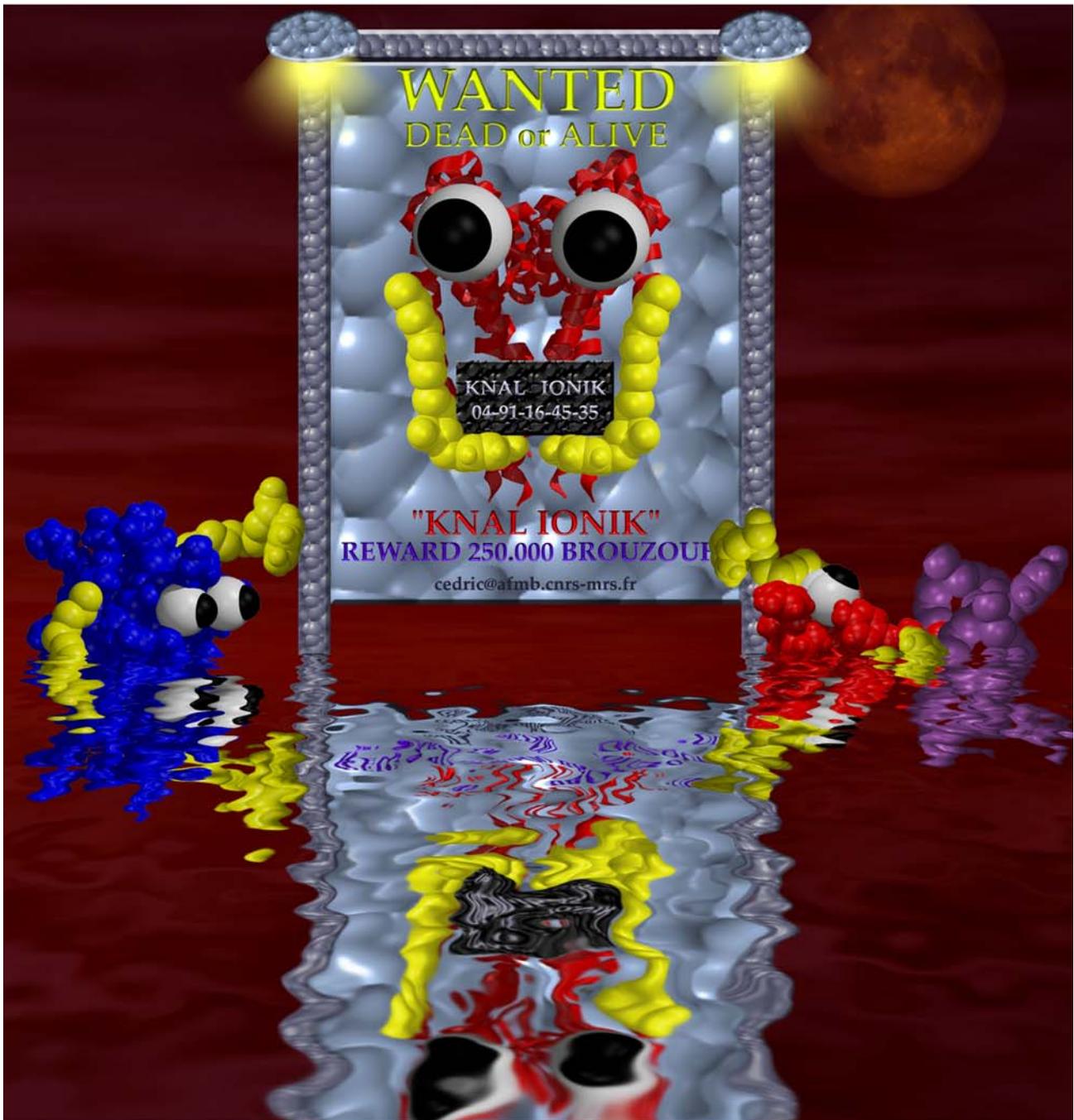


Figure 16 : Représentation de la topologie de la sous-unité α des canaux sodium sur laquelle figurent les sites d'interactions identifiés. Le site 1 (orange et jaune clair) correspond à une occlusion directe du pore, les sites 2 et 5 (en violet et hachurés en noir respectivement) à une interaction au sein de la membrane, les sites 3 et 4 (en bleu et rouge respectivement) à une interaction au niveau de boucles extracellulaires proches des segments S4 mais ces sites se distinguent par des domaines impliqués différents. Le site 6 et le site spécifique des toxines anti-insectes ne sont toujours pas localisés.

Introduction 2^{ème} partie



Les toxines animales actives
sur les canaux ioniques

On peut, de façon certes approximative, résumer les fondements sur lesquels s'appuie la pérennité d'une espèce : se reproduire, se nourrir et assurer la préservation de son existence tant que faire se peut. Le fruit de l'évolution a voulu que certaines espèces, de taille relativement réduite comparativement aux autres, puissent survivre en les dotant de la plus vieille arme biologique existante : le venin. Quel est son rôle ? Provoquer au plus vite un chaos au sein du système de communication ionique de l'organisme visé. Ce « chaos électrophysiologique » s'instaure en différents points stratégiques et terrasse très

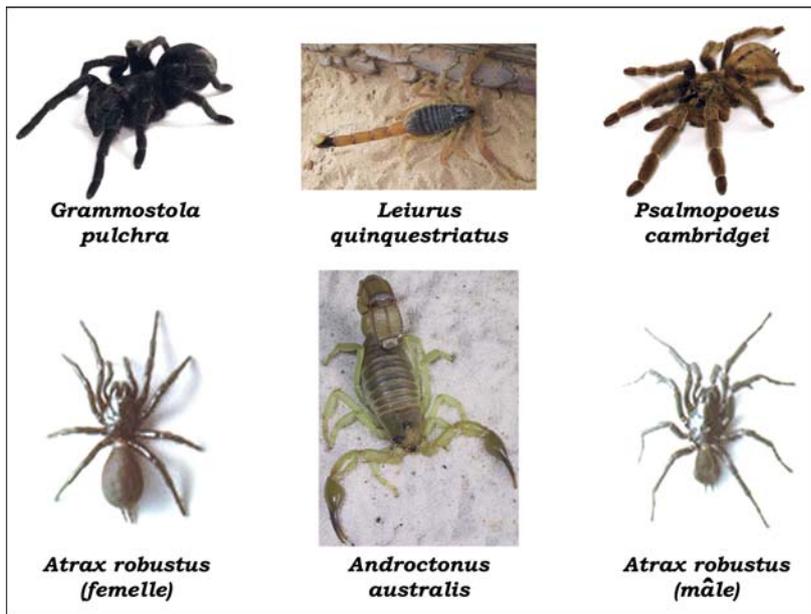


Figure 17 : Quelques spécimens d'araignées et de scorpions venimeux. De nombreux cas de piqûres ayant entraînés la mort d'hommes ont été rapportés pour le scorpion tunisien *Androctonus australis* Hector et l'araignée australienne *Atrax robustus*.

rapidement la proie ou le prédateur imprudent et permet à l'animal venimeux soit de faire un bon repas, soit d'obtenir un sursis salvateur dans le cycle de la vie. L'effet d'une piqûre est directement lié à la quantité de venin injecté, quantité dépendant du laps de temps écoulé entre les deux piqûres : plus le temps écoulé depuis la dernière piqûre est important et plus la quantité de venin injecté lors de la piqûre suivante sera importante.

Ce venin est un liquide laiteux, cocktail protéique dont le principe actif, responsable de la toxicité, est composé de peptides de taille et spécificité variables : les toxines actives sur les canaux ioniques. L'envenimement trouve sa force dans ces spécificités différentes : dérégler un maximum de canaux différents pour avoir un effet d'autant plus détonant. Les études sur les venins ont débuté par la recherche d'anti-venins, un grand nombre de piqûres accidentelles ayant entraîné mort d'homme (**figure 17**). Puis, la spécificité de ces toxines a été utilisée pour mettre en évidence et ainsi mieux caractériser les canaux ioniques en termes pharmacologiques. Les premières toxines à avoir ainsi été utilisées furent les toxines de scorpions puis le champs d'étude s'est élargi avec le début des analyses des toxines extraites du venin des cônes marins, les conotoxines (**Figure 18**).

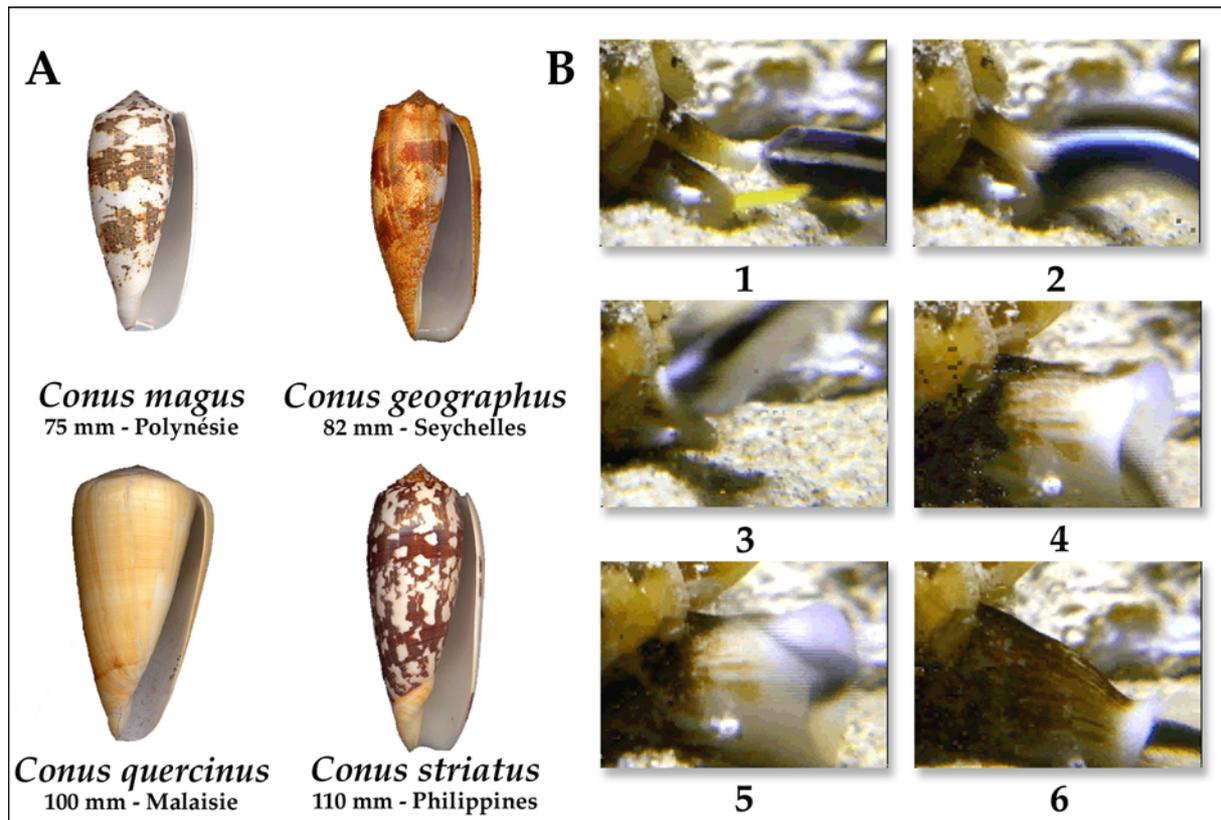


Figure 18 : Quelques spécimens de cônes de mer. **(A)** les piqûres sur l'homme sont accidentelles et le fait de collectionneurs imprudents subjugués par la magnificence de ces coquilles. **(B)** un poisson s'approche dangereusement du cône **(1)**, ce dernier harponne le poisson **(2-3)** qui est immédiatement paralysé, ingéré et lentement digéré par le cône **(4-6)**.

Dans cette seconde partie de l'introduction, la présentation des toxines animales est organisée suivant les motifs structuraux adoptées par ces dernières. Tout d'abord, nous décrirons les toxines adoptant le motif $Cs\alpha\beta$: toxines actives sur les canaux potassium (toxines courtes de scorpions) et sodium (toxines longues de scorpion). Puis, nous décrirons les toxines s'architecturant autour du motif ICK : ces toxines ont un spectre d'activité plus large puisqu'elles ciblent les canaux calcium, sodium ou potassium. Caractérisées majoritairement dans les cônes de mer et les araignées, un consensus existe pour les citer sans ambiguïté. Un préfixe est utilisé pour décrire le type de canaux visés : oméga (ω) pour les canaux calcium, $\{\mu (\mu), \mu O (\mu O) \text{ et } \delta (\delta)\}$ pour les canaux sodium et kappa (κ) pour les canaux potassium.

I Les toxines architecturées autour du motif $Cs\alpha/\beta$

1 Le motif structural $Cs\alpha/\beta$

La grande majorité des toxines de scorpion s'agence en un motif consensus formé d'une hélice α suivie d'un feuillet β à deux brins antiparallèles. Ces deux structures secondaires sont maintenues l'une par rapport à l'autre par deux ponts disulfures suivant le motif décrit comme le « Cysteine-stabilized α/β motif » (Bontems et coll., 1991). A ce motif viennent s'ajouter d'autres éléments structuraux différents suivant la toxine considérée. Un ou deux ponts disulfures supplémentaires viennent renforcer encore la stabilité de la molécule. Un autre brin β en N-terminal peut éventuellement venir compléter la structure de la toxine. Plusieurs exemples de structures tridimensionnelles de toxines comportant le motif $Cs\alpha/\beta$ sont donnés dans la **figure 19** :

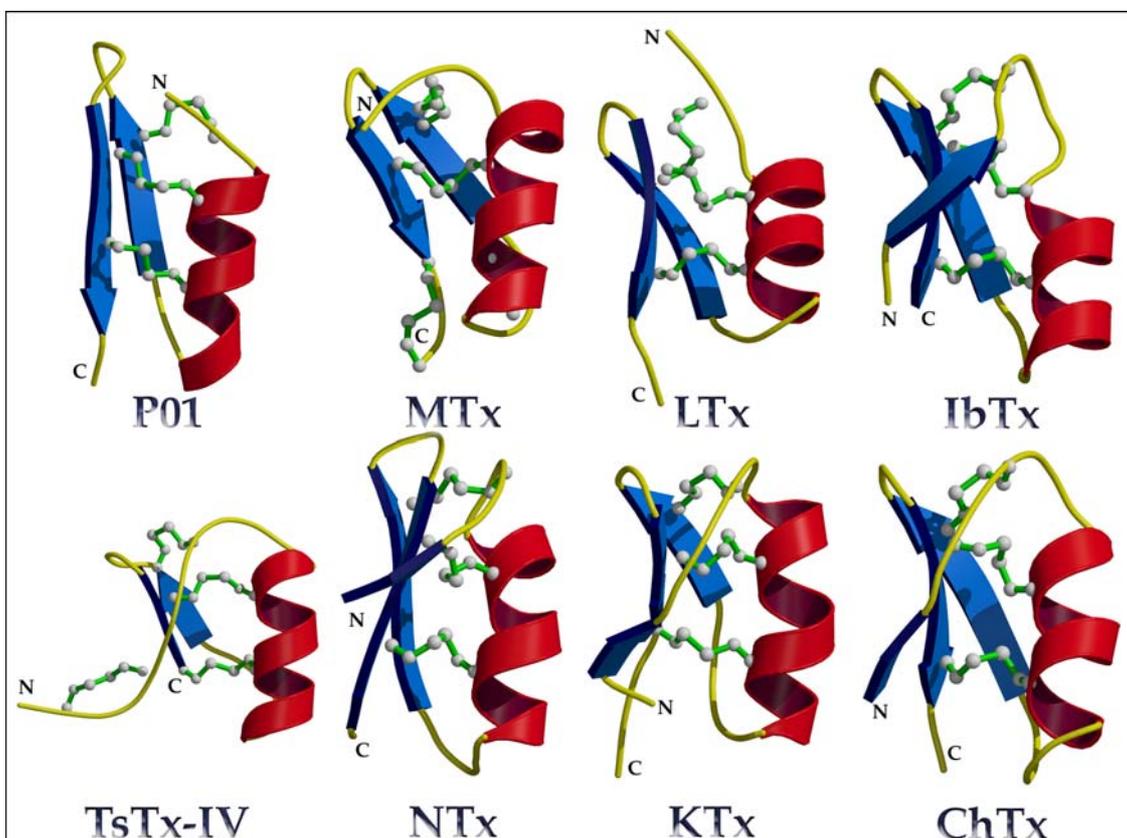


Figure 19 : Représentation des chaînes principales de toxines de scorpion actives sur les canaux K^+ s'architecturant autour du motif $Cs\alpha/\beta$. Seules La maurotoxine (MTx) et la butantoxine (TsTx-IV) possèdent 4 ponts disulfures, les autres toxines n'en contiennent que 3. Les structures tridimensionnelles sont répertoriées (et accessibles sur le site <http://www.rcsb.org/>) avec les codes : 1ACW (P01), 1TXM (MTx), 1SCY (LTx), 1C55 (TsTx-IV), 1SXM (NTx), 1KTX (KTx) et 2CRD (ChTx).

2 Les toxines de scorpion actives sur les canaux potassium

a°) Réticulation des ponts disulfures

i Les toxines à trois ponts disulfures

L'intégrité structurale des toxines courtes de scorpion est assurée par des ponts disulfures. Une catégorie de toxine comporte six demi-cystines formant trois ponts disulfures. L'analyse de la séquence (**figure 20**) de ces peptides fait apparaître un motif consensus :

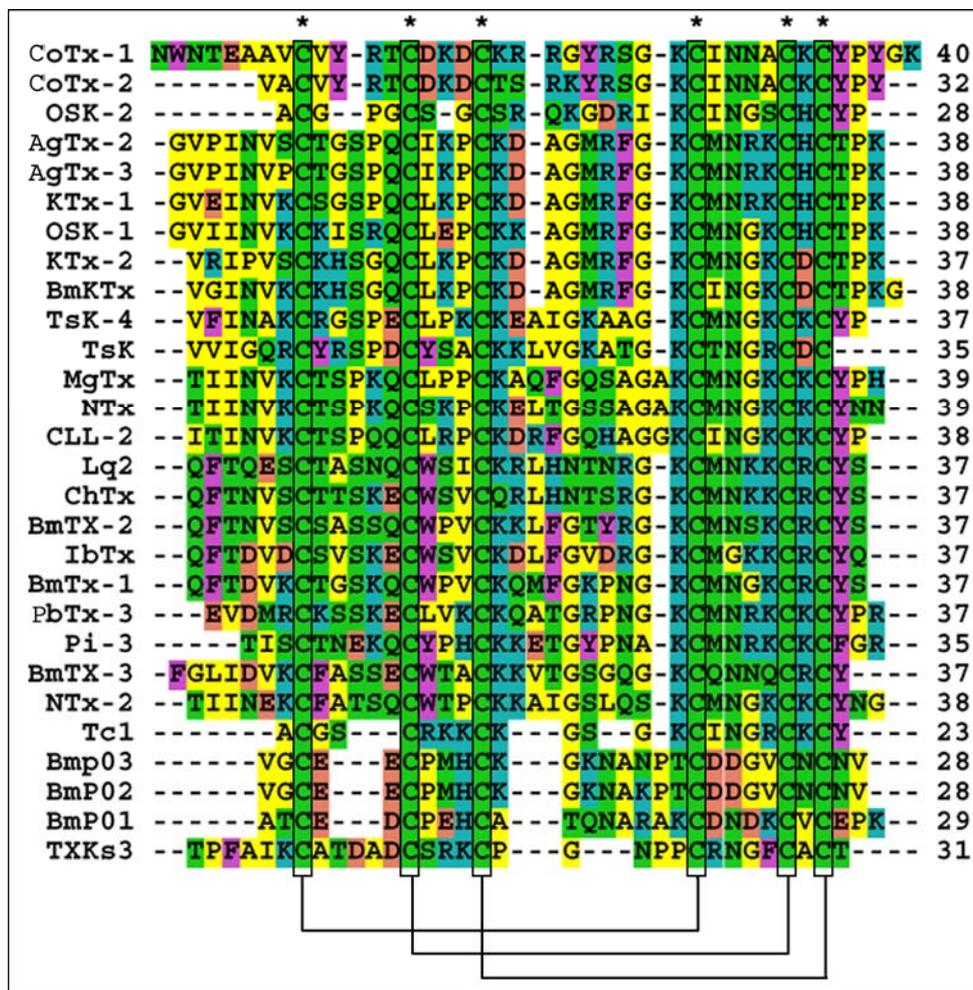


Figure 20 : Séquences de toxines courtes de scorpion à 3 ponts disulfures actives sur les canaux K^+ . Le code couleur dépend de la nature de la chaîne latérale du résidu concerné : **bleu** pour les résidus basiques, **vert** pour les polaires, **jaune** pour les aliphatiques, **violet** pour les aromatiques et **rouge** pour les acides. Les cystéines conservées sont encadrées et l'appariement des ponts disulfures est indiqué. Les astérisques (*) indiquent les résidus parfaitement conservés.

Des expériences de clivage enzymatique spécifique ont montré que ces demi-cystines s'apparient pour former des ponts disulfures de la manière suivante :



Ce motif Cs α/β impose des contraintes stériques ainsi que des angles diédraux spécifiques des structures secondaires (hélice α et feuillet β antiparallèle). De ce fait, le résidu en position -2 par rapport à la C_{IV} est presque toujours une glycine et se place entre l'hélice et le feuillet. Toutefois, l'insertion d'une proline dans l'hélice α avant la C_{III} induit une torsion dans l'hélice α et permet l'incorporation en position $C_{IV}-2$ d'une sérine ou d'une alanine.

Xu et coll ont proposé que l'insertion d'une proline à cette position entraîne une forte instabilité conformationnelle des éléments de structure secondaire (Xu et coll., 2000), malgré la conservation du motif Cs- α/β . Cette assertion est en désaccord avec les résultats de notre groupe, les structures de toxines comportant cette proline calculées par notre groupe ne montrent pas, en RMN, d'instabilité particulière (Darbon et coll., 1999).

ii Les toxines à quatre ponts disulfures

		*		*	*	*	*	*	*	*	
PI-7	----	DEAIRCTGT	---	KDCYIPCR	YITGCFNS	R	CINKSCKCYGCT	38			
MTX	----	VSCTGS	---	KDCYAPCR	KQTGCPNAK	CINKSCKCYGC	34				
PI-4	----	IEAIRCGGS	---	RDCYR	PCQKRTGCPNAK	CINKTCKCYGCS	38				
PI-1	----	LVKCRGT	---	SDCGR	PCQQQTGCPNSK	CINRMCKCYGC	35				
TsTx-IV	-	WCSTCLDLACGAS	---	RECYD	PCFKAFGRAHGK	CMNNKRCRYTN	41				
ErgTx	DRD	SCV	DKSR	CAKY	GYQEC	-QDCCKNAGHNGGTCMFFKCKCA	42				

Figure 21 : Séquences de toxines de scorpion à 4 ponts disulfures actives sur les canaux K^+ . code couleur : **bleu** pour les résidus basiques, **vert** pour les polaires, **jaune** pour les aliphatiques, **violet** pour les aromatiques et **rouge** pour les acides. Les astérisques (*) indiquent les résidus parfaitement conservés

Certaines neurotoxines courtes de scorpions possèdent quatre ponts disulfures qui stabilisent leur structure tridimensionnelle (voir **figure 21**). Elles sont regroupées en trois sous-familles suivant leurs activités. La ErgTx, qui n'a pas d'homologie de séquence avec les autres neurotoxines courtes représente une sous-famille à elle seule. La TsTx-IV est active sur les canaux BK. Sa carte fonctionnelle est proche de celle de la Charybdotoxine. Pi1 et la maurotoxine bloquent les canaux K_v et la maurotoxine est capable de se fixer également sur les canaux SK.

La répartition des demi-cystines dans la séquence est la suivante :



La réticulation des ponts disulfures de ces toxines se fait suivant le motif :



Toutefois, cette réticulation est différente pour les toxines suivantes. Ce sont les trois seuls cas connus à ce jour. La MTx et la TsTx-IV possèdent un appariement particulier de leurs demi-cystines, générant à leur extrémité C-terminale pour la MTx et N-terminale pour la TsTx-IV (butantoxine), une boucle à quatorze atomes (Kharrat et coll., 1996; Novello et coll., 1999) (**figure 22**). Ces deux toxines conservent toutefois le motif Cs α/β .

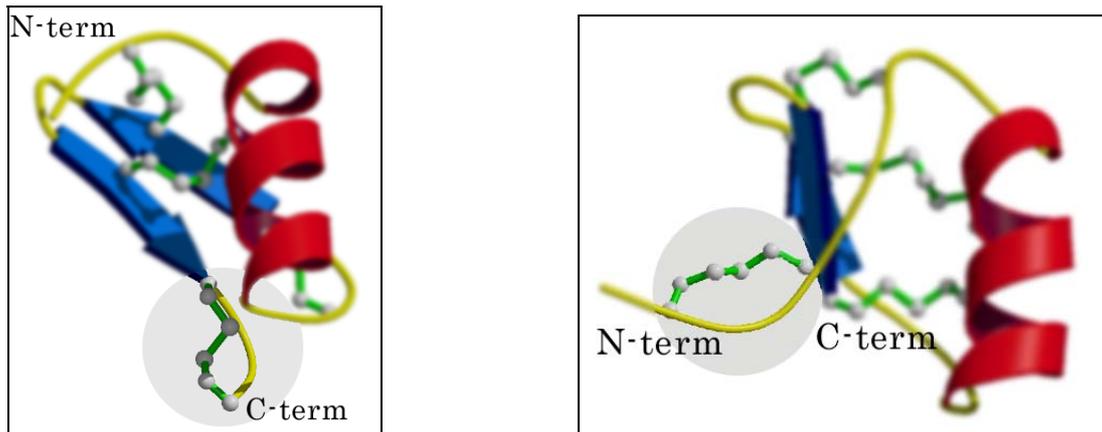


Figure 22 : L'extrémité C-terminale de la maurotoxine (**à gauche**) et l'extrémité N-terminale de la butantoxine (**à droite**) comportent une boucle à quatorze atomes.

La MTx possède un appariement de pont unique puisque les six demi-cystines qui ne sont pas impliquées dans la boucle à quatorze atomes ne s'apparient pas suivant le même motif que les toxines à trois ponts :



L'appariement des six demi-cystines de la TsTx-IV qui ne participent pas à la boucle à quatorze atomes (en bleu ci-dessous) suit le motif d'appariement des toxines à trois ponts :



Un autre cas particulier est apporté par ErgTx (ergotoxine), (Gurrola et coll., 1999). Cette toxine possède dans sa séquence deux demi-cystines vicinales. L'appariement des demi-cystines est le suivant (Bottiglieri et coll., 2000) :



Cette toxine présente une activité sur les canaux ether-a-gogo (Gurrola et coll., 1999).

iii L'analyse d'analogues de toxines

Plusieurs études de mesures de propriétés électrophysiologiques et de résolution de structures tridimensionnelles ont été menées sur des analogues de toxines présentant des réticulations différentes de leurs ponts disulfures. Ces analyses mettent en évidence l'importance variable des ponts disulfures pour la stabilité de la structure tridimensionnelle :

Des études structurales et fonctionnelles menées sur des analogues de la MTx ont montré une association différentielle des ponts disulfures d'un mutant à l'autre, avec comme conséquence des modifications significatives du positionnement de l'hélice par rapport au feuillet β (Fajloun et coll., 2000a; Fajloun et coll., 2000c). Ces modifications structurales agissent sur l'activité des mutants, suggérant que la réticulation est un critère important pour la modulation de l'activité de cette toxine.

Des analyses portant sur l'implication des ponts disulfures dans le repliement et le maintien de la structure tridimensionnelle de la ChTx ont été entreprises en remplaçant systématiquement deux demi-cystines de pont disulfure par deux résidus d' α -aminobutyrate (Abu) (Drakopoulou et coll., 1998). Il apparaît que la suppression du pont C_{II}-C_V (analogue Chab II) n'a que peu d'effet sur la structure tridimensionnelle de l'analogue et son activité de blocage, alors que la suppression du pont C_I-C_{IV} (analogue Chab I) ou du pont C_{III}-C_{VI} (analogue Chab III) ne permet pas l'obtention de molécules biologiquement actives (Song et coll., 1997). La contribution respective de chacun des trois ponts n'est donc pas identique pour la stabilisation de la structure native.

Des analogues de la leurotoxine, LTx, montrent des résultats en contradiction avec ceux obtenus sur des analogues de ChTx (Calabro et coll., 1997). L'analogue dont le pont C_I-C_{IV} est supprimé possède une structure de type LTx, alors que l'analogue sans pont C_{III}-C_{VI} ne présente pas d'éléments de structures secondaires. Le pont C_{III}-C_{VI} est nécessaire au bon repliement alors que sa présence dans l'analogue Chab II de ChTx n'a que peu d'impact sur la structuration correcte de la molécule.

b°) Surface d'interaction toxine/canal

Les toxines de scorpion actives sur les canaux K⁺ montrent des gammes d'activités variables. Certaines toxines sont spécifiques d'une seule classe de canaux K⁺, alors que d'autres présentent des gammes d'activités bien plus étendues. La production de mutants de toxines et la mesure de leurs activités de blocage de canaux K⁺, associée à la détermination de leur structure tridimensionnelle, est à l'origine de la caractérisation des résidus d'acides aminés qui sont impliqués dans la liaison aux canaux K⁺.

De l'ensemble de ces études, il ressort que les toxines de scorpion se fixent sur le pore de conduction des canaux K^+ au niveau de l'embouchure externe et inhibent le passage d'ions en obturant le pore de conduction. Dans l'optique de la compréhension des éléments structuraux responsables de l'activité des toxines courtes de scorpion, il est important de pouvoir définir l'ensemble des résidus fonctionnels (les cartes fonctionnelles) des toxines appartenant aux diverses sous-familles répertoriées.

Les cartes fonctionnelles de plusieurs toxines ont été établies par *alanine scanning* et synthèse d'analogues et ont ainsi permis de caractériser les résidus primordiaux dans la fixation des toxines aux canaux ioniques. Les cartes fonctionnelles des principales toxines de scorpion sont présentées ci-après.

i La charybdotoxine

La charybdotoxine est la toxine de scorpion la mieux caractérisée, tant au point de vue structural que pharmacologique. Elle est issue du venin de *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Gimenez-Gallego et coll., 1988). Elle se fixe sur l'embouchure externe du pore des canaux BK et de quelque canaux dépendants du potentiel (*shaker*, Kv1.2 et Kv1.3).

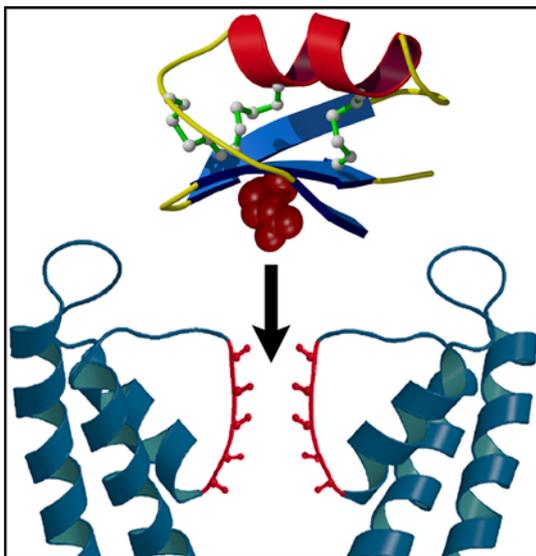


Figure 23 : Modèle général décrivant l'interaction entre les toxines de scorpions actives sur les canaux K^+ . L'inhibition du canal résulte de l'occlusion du pore de conduction par une lysine portée par la toxine. Cette lysine, critique pour l'interaction, interagit avec les groupements carbonyles du filtre de sélectivité (**en rouge**) comme indiqué par la flèche.

Le mécanisme par lequel la ChTx inhibe le flux d'ions K^+ au travers du pore de conduction dépend d'une interaction bimoléculaire avec le canal ionique (Goldstein et Miller, 1993). Cette interaction a lieu au niveau de l'embouchure externe du canal, des mutations effectuées dans cette région réduisant l'affinité de la toxine pour son site récepteur (MacKinnon et Miller, 1989b). Les résidus importants pour l'interaction de la charybdotoxine avec le canal BK et le canal *Shaker* sont situés sur la face du feuillet β de la toxine, ce qui sous-entend que cette surface interagit directement avec l'embouchure externe du pore. Les cartes fonctionnelles pour la fixation aux canaux de type *Shaker* et BK sont légèrement différentes mais le modèle général reste le même (voir **figure 23**).

Des mutations réalisées sur huit résidus du feuillet β (R25, K27, M29, N30, R34 et Y36) et deux résidus de l'hélice α (S10, W14) affectent l'affinité de la toxine pour le canal BK en augmentant le taux de dissociation du complexe (Park et Miller, 1992a, 1992b; Stampe et coll., 1994). La résolution de structure de la ChTx par RMN (Bontems et coll., 1991) a permis de repérer la disposition relative des résidus impliqués dans la liaison au canal (**figure 24**). Il a été montré que cinq résidus appartenant à la carte fonctionnelle de la ChTx contre le canal BK (K27, M29, N30, R34 et Y36) jouent un rôle crucial dans l'affinité de la toxine pour le canal *Shaker* (figure XXX) (Goldstein et coll., 1994; Naranjo et Miller, 1996). Cette carte fonctionnelle de la ChTx pour la liaison aux canaux BK (S10, W14, R25, K27, M29, N30, R34 et Y36) est bien conservée dans les autres toxines apparentées, à l'exception de l'arginine R25, qui est substituée dans la moitié des séquences par des résidus de nature variable. La mutation de ce résidu en asparagine (R25N) pourrait en particulier expliquer la plus faible affinité de la BmTx1, isolée du venin de *Buthus martensi* Karsch, pour le canal BK (Romi-Lebrun et coll., 1997).

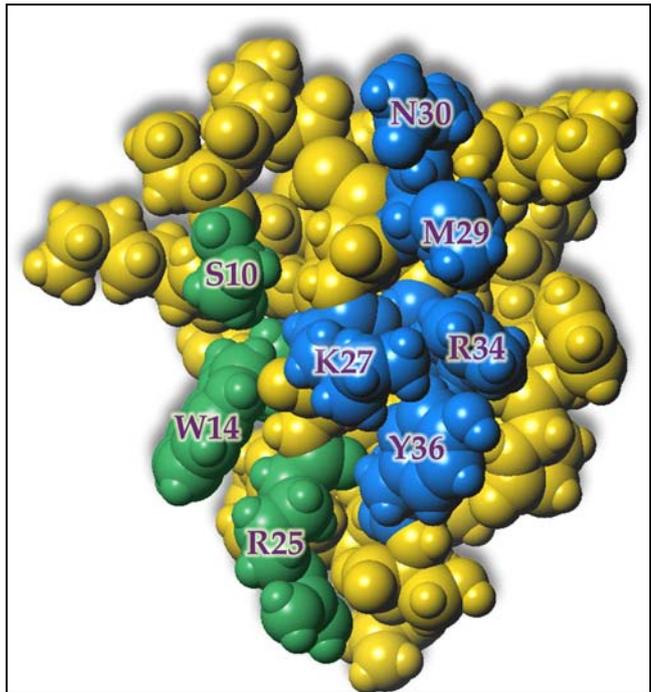


Figure 24 : Représentation de la carte fonctionnelle de la ChTx. Les résidus impliqués à la fois dans l'interaction avec les canaux K^+ de type BK et K_v sont indiqués en bleu. Les résidus impliqués pour l'inhibition des seuls canaux BK sont colorés en vert.

ii L'ibériotoxine

L'ibériotoxine, IbTx, est isolée du venin de *Buthus tamulus* (Galvez et coll., 1990) et présente 68% d'homologie de séquence avec la ChTx. Malgré cette forte homologie et une forte similarité de structure tridimensionnelle entre les deux toxines (Bontems et coll., 1991; Johnson et Sugg, 1992), aucune activité d'inhibition pour les canaux de type *Shaker* n'a été mise en évidence pour l'IbTx. Sept des huit résidus de la ChTx qui sont impliqués dans l'interaction avec le canal BK sont conservés dans l'IbTx, suggérant que les deux toxines présentent une même surface d'interaction avec le canal BK. Comme la ChTx, la lysine K27 de l'IbTx établirait une interaction électrostatique avec un site de fixation des ions K^+ à l'intérieur du pore (Mullmann et coll., 1999). Afin de localiser les régions impliquées dans la spécificité de chacune des deux toxines, des chimères comportant les parties N- ou C-terminales de l'IbTx ou de la ChTx ont été synthétisées

(ChTx₁₋₁₉-IbTx₂₀₋₃₇ et IbTx₁₋₁₉-ChTx₂₀₋₃₇). Les tests d'activité sur des canaux BK et Kv1.3 ont révélé que la chimère possédant l'extrémité C-terminale de la ChTx bloque les deux types de canaux alors que la chimère possédant l'extrémité C-terminale de l'IbTx n'agit que sur les canaux BK. Il est proposé que cette région, en particulier le segment 21-24, contrôle la spécificité d'action (Giangiacomo et coll., 1993).

iii La noxiustoxine

Cette toxine et les toxines apparentées (noxiustoxine 2 et margatoxine) agissent sur les canaux K⁺ de type *Shaker* et se caractérisent dans la plupart des cas par l'insertion d'un résidu (A ou G) entre les positions correspondant à la glycine 26 et la lysine 27 de la ChTx (Miller, 1995). La noxiustoxine, NTx, purifiée à partir du venin de scorpion mexicain *Centruroides noxius* Hoffmann, comporte 39 résidus d'acides aminés et son extrémité C-terminale est amidée. Elle a été identifiée d'après son activité sur canaux dépendants du potentiel d'axones de calmar géants (K_d = 300 nM) (Carbone et coll., 1982). Elle est active aussi sur des canaux dépendants du potentiel de lymphocytes T et B humains (K_d = 0.2 nM ; 2 nM respectivement) (Leonard et coll., 1992). Elle possède une affinité moindre pour les canaux potassium de grande conductance du muscle squelettique (K_d = 450 nM) (Valdivia et coll., 1988) et pour les canaux de faible conductance de cellules endothéliales d'aorte de bœuf (K_d = 300 nM) (Vaca et coll.,

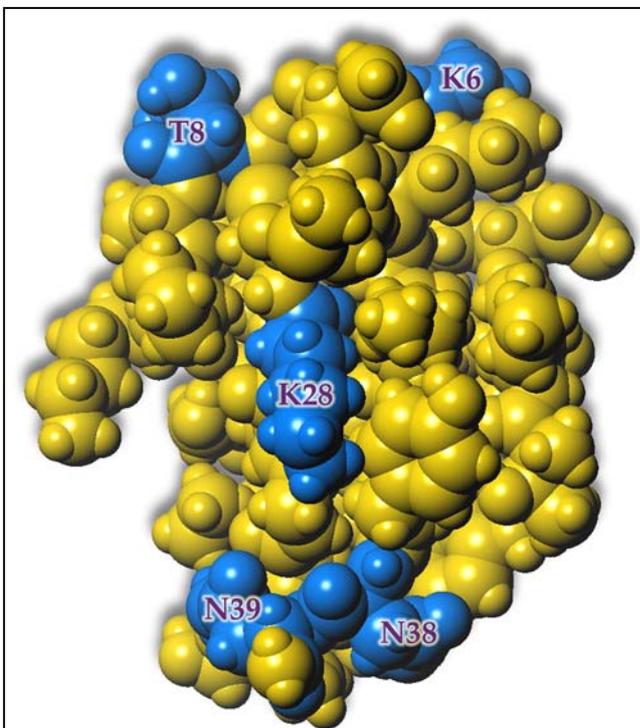


Figure 25 : Représentation de la carte fonctionnelle de la NtX. Les résidus impliqués dans la reconnaissance des canaux K⁺ de type K_v sont indiqués en bleu.

1993). L'étude du blocage de canaux K⁺ de synaptosomes de cerveaux de souris par des fragments synthétiques de NTx a montré que le domaine fonctionnel de la toxine était en grande partie porté par sa région N-terminale, notamment les neuf premiers résidus (Gurrola et coll., 1989).

La substitution de certains résidus de la NTx a mis en évidence le rôle déterminant des résidus K6, T8 et K28 (équivalent à de la lysine K27 de ChTx) (Martinez et coll., 1998) dans l'affinité de la toxine pour les canaux de type *Shaker*. La délétion des deux résidus C-terminaux (N38 et N39)

affecte aussi l'activité. La répartition de ces résidus à la surface de la toxine est reportée sur la **figure 25**.

Les toxines apparentées à la NTx conservent en majorité les résidus importants pour l'activité de blocage aux canaux dépendants du potentiel. Une exception concerne la NTx2, qui possède une phénylalanine à la place de la thréonine en position 8 (Niето et coll., 1996), ce qui pourrait expliquer sa moins bonne efficacité de blocage. D'autres mutations, en particulier celles concernant les deux résidus fonctionnels en position C-terminale de la NTx (N38 et N39) pourraient expliquer les différences d'activité observées pour d'autres toxines. Ainsi la margatoxine, MgTx, du scorpion *Centruroides margaritatus* (Garcia-Calvo et coll., 1993), comporte des substitutions pour les deux résidus de l'extrémité C-terminale, en rapport étroit avec sa spécificité d'action sur le canal Kv1.3 (Bednarek et coll., 1994).

iv La kaliotoxine

La famille de la kaliotoxine se caractérise par des toxines ayant un segment plus court entre la troisième et quatrième cystéine que les autres toxines (Miller, 1995). La KTx, purifiée du venin de scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Crest et coll., 1992) a été décrite initialement comme longue de 37 résidus, sa séquence étant révisée ensuite par l'ajout d'une lysine C-terminale (Romi et coll., 1993). La KTx bloque des canaux BK de mollusques (*Helix pomatia*), est active sur les canaux Kv1 de synaptosomes de cerveaux de rat et est décrite comme un bloqueur des canaux Kv1.3 (Kd = 0.65 nM) et Kv1.1 (Kd = 41 nM), les canaux Kv1.2 étant résistants (Grissmer et coll., 1994).

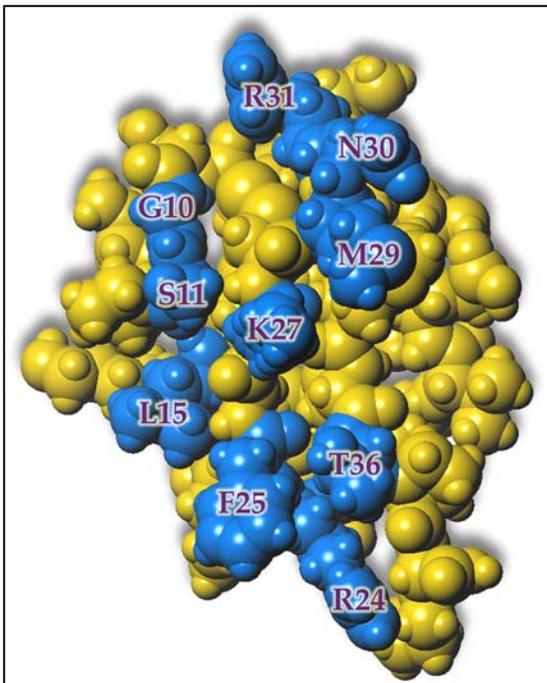


Figure 26 : Représentation de la carte fonctionnelle de la KTx. Les résidus impliqués dans l'inhibition des canaux BK sont colorés en bleu et indiqués.

La toxine adopte le motif structural commun aux autres toxines de scorpion (Aiyar et coll., 1995), bien que l'analogue sans lysine C-terminale présente de légères différences de conformation (Fernandez et coll., 1994). Des expériences de double mutants thermodynamiques menées avec des mutants du canal Kv1.3 et de la toxine ont permis de caractériser la carte fonctionnelle de la KTx. Dix résidus ont été ainsi caractérisés (**figure 26**) (G10, S11, L15, R24, F25, K27, M29, N30, R31 et T36) (Aiyar et coll., 1995; Aiyar et coll., 1996). Parmi ces dix résidus, six sont absolument conservés dans les toxines apparentées, S11, R24, F25, K27, N30 et T36. De plus, la substitution de K27R provoque une forte baisse de l'activité de la

KTx (baisse d'un facteur 100), ce qui renforce l'hypothèse de l'occlusion du pore par la K27, blocage moins efficace quand la lysine est remplacée par un résidu plus volumineux (Aiyar et coll., 1995).

La KTx2, isolée du venin de scorpion *Androctonus australis* (Laraba-Djebari et coll., 1994), est moins efficace que la KTx pour la fixation aux membranes de synaptosomes de cerveaux de rat. Cette activité plus faible pourrait être due à des mutations dans la région C-terminale de la toxine, en particulier par le remplacement de l'arginine R31 de la KTx par une glycine dans la KTx2.

v La leiurotoxine

La leiurotoxine (LTx), ou scyllatoxine (ScTx), est un bloqueur des canaux K⁺ de faible conductance activés par le calcium (SK). L'apamine est le premier ligand protéique à avoir été caractérisé comme bloqueur spécifique de ces canaux. Peptide de 18 résidus extrait du venin de l'abeille *Apis mellifera*, l'apamine est toujours considérée comme le ligand de référence de ce type de canaux.

Les premières études sur le système apamine/canal potassium ont permis de définir les résidus directement impliqués dans l'activité de la toxine comme étant les arginines R13 et R14 et la glutamine Q17. L'histidine terminale H18 intervient aussi à un niveau moindre dans l'interaction (Sandberg, 1979; Labbé-Jullié et coll., 1991). Mais, l'amidation de la fonction carboxylique C-terminale est nécessaire à l'expression de l'activité de l'apamine, la forme carboxylique libre de l'apamine perd presque la totalité de son activité (Devaux et coll., 1995).

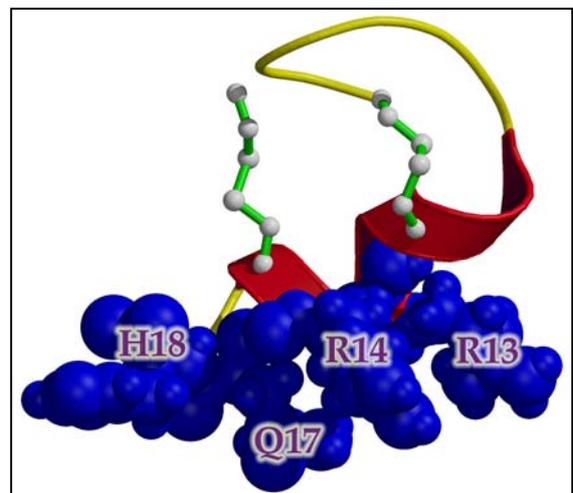


Figure 27 : Représentation de la structure en ruban de l'apamine : une hélice α reliée au reste de la molécule par 2 ponts disulfures. Les résidus impliqués l'interaction avec les canaux K⁺ de type SK sont indiqués en bleu.

La LTX, purifiée à partir du venin de *Leiurus quinquestriatus hebraeus* inhibe la fixation d'apamine mono iodée sur les membranes de synaptosomes de cerveaux de rat (Chicchi et coll., 1988).

Des études ont été entreprises pour définir le site d'interaction de la toxine sur les canaux SK. Deux résidus d'arginine R6 et R13 de l'hélice α de la toxine ont des chaînes latérales qui sont localisées à proximité spatiale (Martins et coll., 1990). La mutation de ces deux résidus entraîne une perte d'activité de la toxine (Auguste et coll., 1992; Sabatier et coll., 1994). Il est montré que le feuillet β a un intérêt limité pour l'activité de blocage du canal SK et que l'amidation du résidu H31 de l'extrémité C-terminale augmente l'activité de la toxine (Auguste et coll., 1992; Sabatier et coll., 1994). La carte fonctionnelle de la LTx inclue des résidus appartenant à l'hélice α (dont R6 et R13) et le résidu N-terminal (**figure 28**).

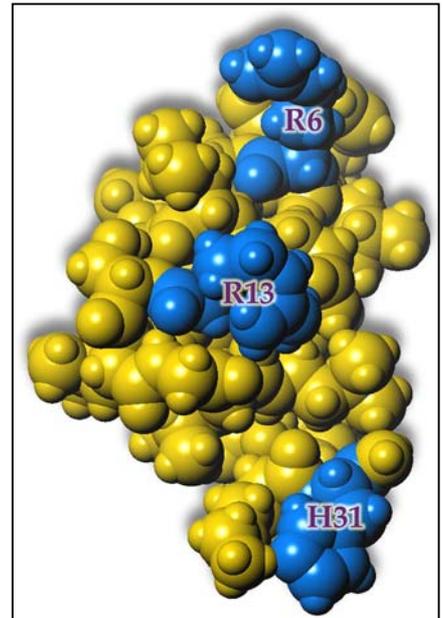


Figure 28 : Représentation de la carte fonctionnelle de la LTx. Les résidus impliqués dans l'interaction avec les canaux K^+ de type SK sont indiqués en bleu.

vi P05

P05, purifiée du venin de scorpion *Androctonus mauretanicus mauretanicus* (Zerrouk et coll., 1993), possède un motif R6-R7-C8-Q9 commun à l'apamine. Ce motif, lorsqu'il est substitué au motif R6-M7-C8-Q9 de la LTx, augmente son affinité pour le canal SK (Sabatier et coll., 1994). La mutation des deux résidus R6, R7 et R13 en leucine se traduit par une capacité d'inhibition affaiblie (Inisan et coll., 1995), témoignant de l'importance de ces résidus pour l'interaction avec le canal SK. L'amidation de l'extrémité C-terminale de P05 donne lieu à un ligand irréversible des canaux SK alors que l'iodation de l'histidine H31 réduit d'un facteur 10 son affinité pour le canal (Sabatier et coll., 1993).

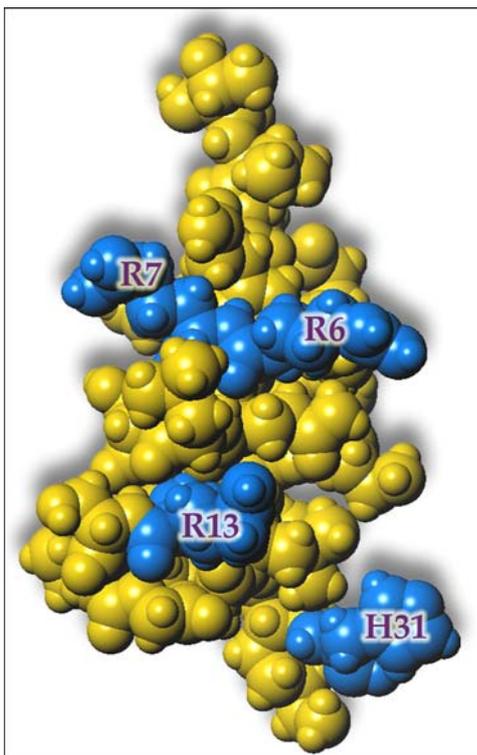


Figure 29 : Représentation de la carte fonctionnelle de P05. Les résidus impliqués dans l'interaction avec les canaux K^+ de type SK sont indiqués en bleu.

Les deux résidus R6 et R7 sont exposés sur la même face de la toxine que l'histidine H31 (**figure 29**) et délimitent la surface d'interaction entre P05 et le canal SK.

Composée de 29 résidus, P01 se distingue des toxines apparentées à la LTx par la délétion de deux résidus dans la région N-terminale, et par l'absence de résidus d'arginine au niveau de l'hélice α . Les résidus en position équivalente aux deux arginines R6 et R7 de P05 sont deux résidus acides E4 et D5. P01, purifiée du venin d'*Androctonus mauretanicus mauretanicus* en même temps que P05 (Zerrouk et coll., 1993), puis identifiée dans les venins de scorpion *Androctonus australis* et *Buthus occitanus tunetanus* (Zerrouk et coll., 1993; Zerrouk et coll., 1996) présente malgré tout une faible capacité de blocage des canaux SK, puisqu'elle inhibe la fixation de l'apamine radio iodée à la membrane de synaptosomes de cerveaux de rat ($K_{0.5} = 2 \mu\text{M}$).

Les résidus R6, R7, R13 et H31 de P05 sont remplacés par E4, D5, S13 et I29 dans P01. La conservation d'une activité résiduelle a posé la question de la composition de la carte fonctionnelle de P01 et est à l'origine d'un modèle de l'influence de l'anisotropie globale des charges pour l'activité des toxines actives sur canaux K^+ (Blanc et coll., 1996), modèle décrit dans le chapitre III.

viii La butantoxine (TsTx-IV)

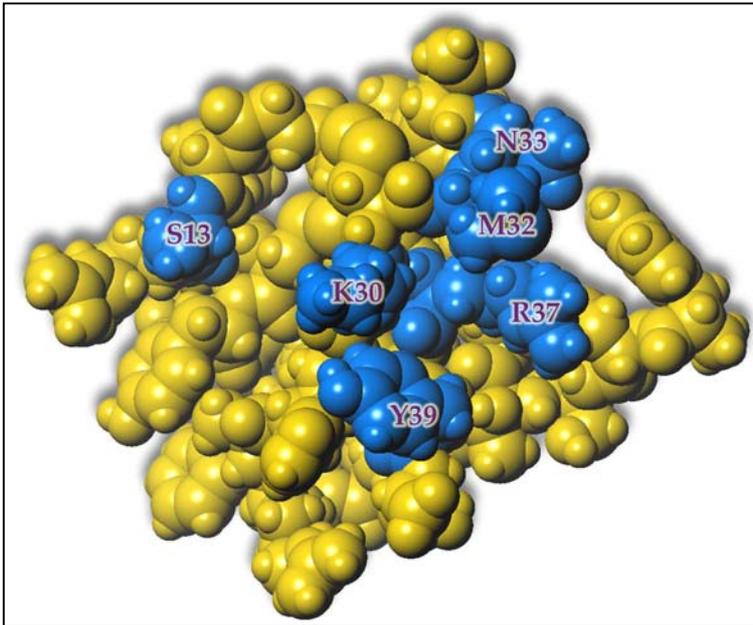


Figure 30 : Représentation de la carte fonctionnelle de la TsTx-IV. Les résidus impliqués dans l'interaction avec les canaux K^+ de type BK sont indiqués en bleu.

La TsTx-IV inhibe certains canaux K^+ activés par le Ca^{2+} de type BK et possède une séquence C-terminale homologue à la charybdotoxine et à l'ibériotoxine (Novello et coll., 1999). La comparaison de séquence de la TsTx-IV avec celle de la ChTx montre que 6 résidus de la carte fonctionnelle de la ChTx pour la fixation sur canaux K^+ de type BK (S10, K27, M29, N30, R34 et Y36) sont conservés dans la TsTx-IV (S13, K30, M32, N33, R37 et Y39) ce qui est cohérent avec sa spécificité de blocage pour les canaux de type BK (voir **figure 30**).

3 Les toxines de scorpion actives sur les canaux sodium

Les toxines de scorpion actives spécifiquement sur les canaux Na⁺ sont des peptides composés de 60 à 76 résidus (d'où la dénomination de toxines longues de scorpion) dont 8 cystéines permettant la formation de 4 ponts disulfures. Actuellement, la séquence en acides aminés de plus de 80 d'entre elles a été déterminée. La **figure 31**, ci-dessous présente la séquence de certaines d'entre elles.

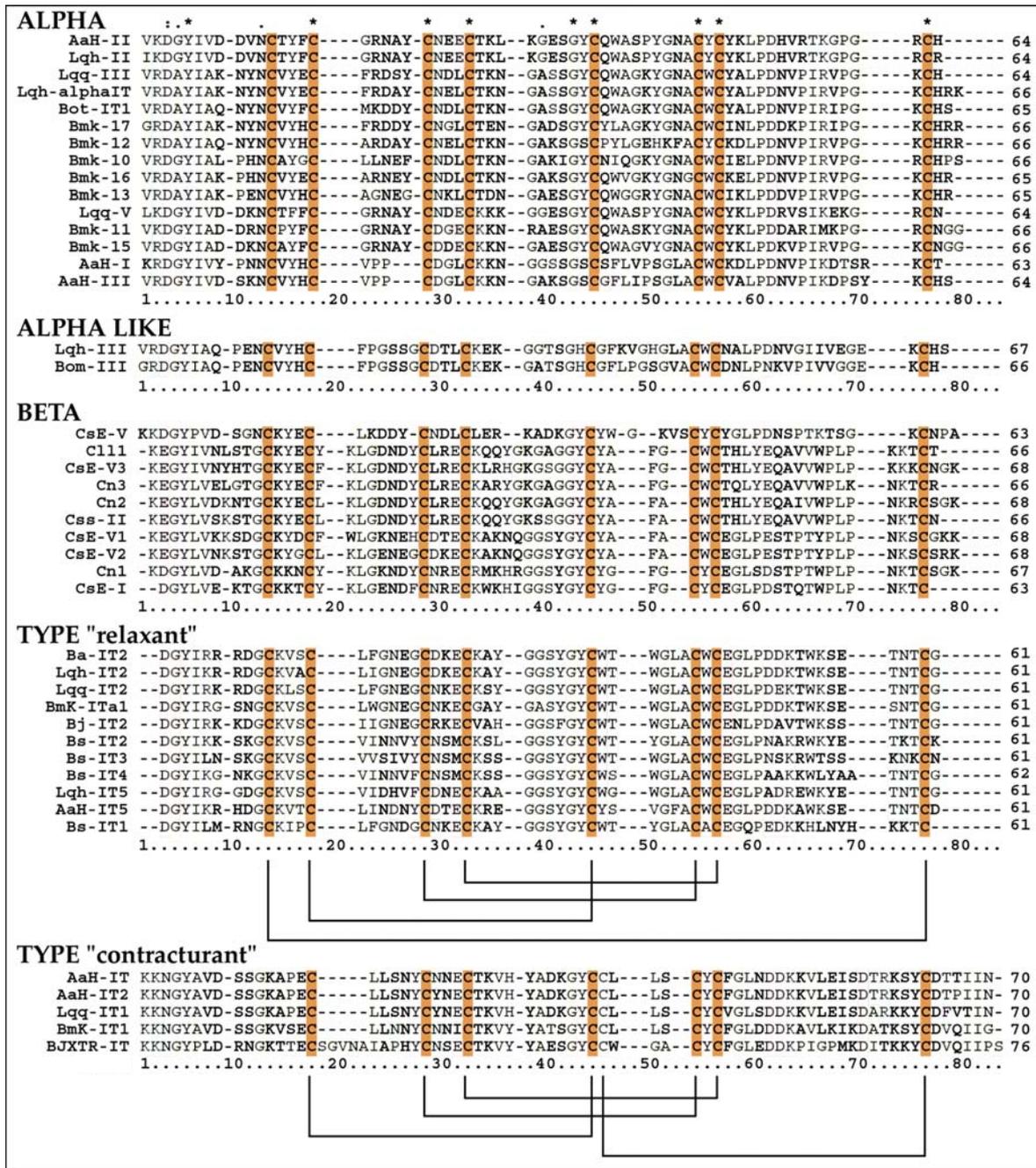


Figure 31 : Séquences de toxines longues de scorpion actives sur les canaux Na⁺. Les cystéines conservées dans les différents types de toxines sont colorées en orange. Les astérisques (*) indiquent les résidus strictement conservés. L'appariement des ponts disulfures est indiqué et on remarque l'arrangement différent de ceux-ci pour les toxines dites de type « contracturant ».

Pour certaines de ces toxines, la structure tridimensionnelle a été résolue par cristallographie aux rayons X ou par RMN. Le motif structural est conservé, soit un segment d'hélice α connecté par des boucles à un feuillet β à trois brins et stabilisée par des ponts disulfures (voir **figure 32**).

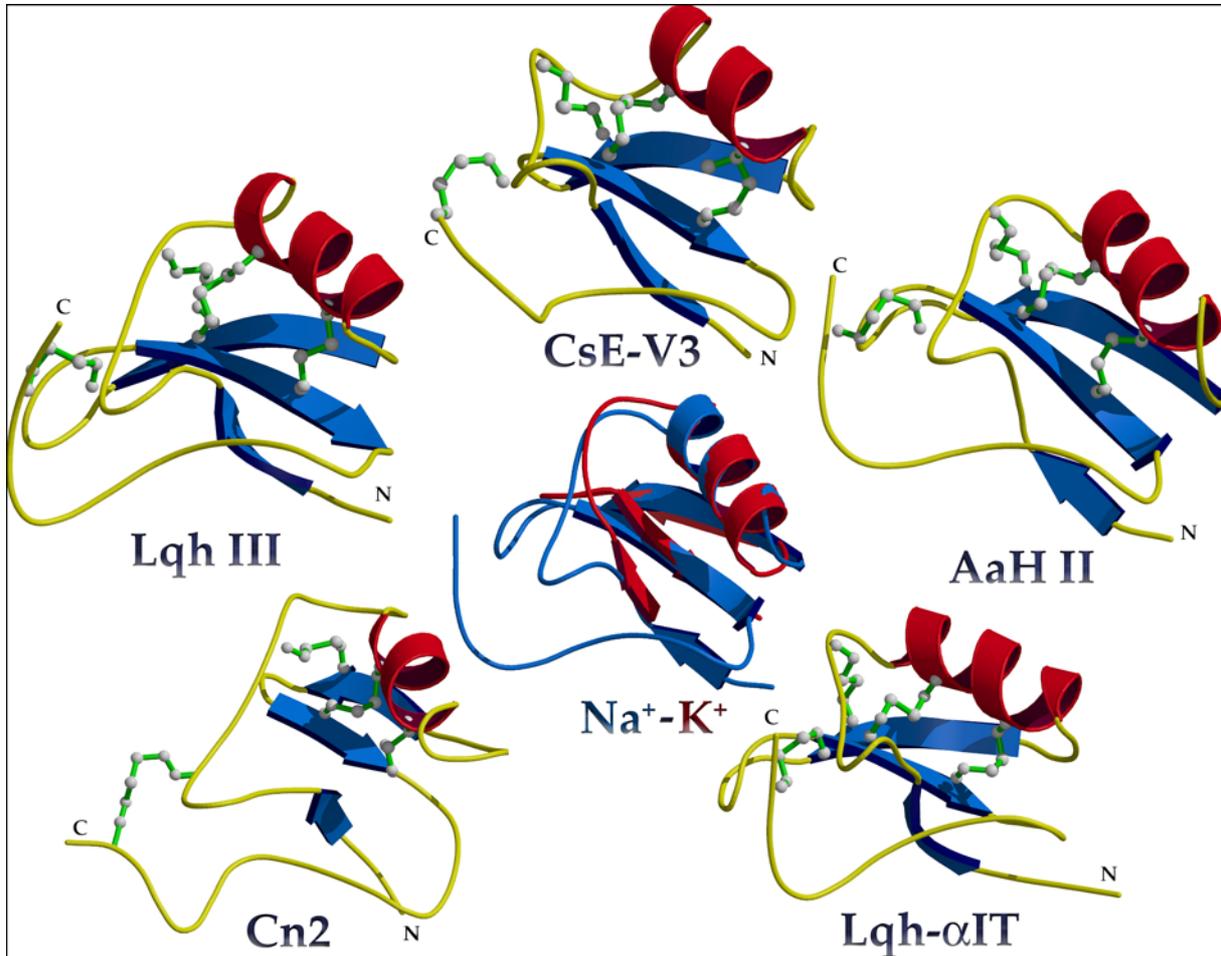


Figure 32 : Représentation des chaînes principales de toxines de scorpion actives sur les canaux Na^+ s'architecturant autour du motif $\text{Cs}\alpha\beta$. Codes PDB : 2SN3 (CsE-V3), 1PTX (AaH II), 1LQH (Lqh- α IT), 1CN2 (Cn2) et 1FH3 (Lqh III). **Au centre** : superposition de la ChTx (en **rouge**, toxine courte active sur les canaux K^+) et AaH II (en **bleu**, toxine longue active sur les canaux Na^+) : on remarque la bonne conservation du motif malgré les différences de séquences et de canaux ciblés.

Les tests électrophysiologiques ont montré que ces toxines modifient les propriétés d'ouverture des canaux Na^+ en se fixant sur des sites d'interaction différents (Martin-EauClaire et Couraud, 1995; Gordon et coll., 1998). Des différences notoires dans les tests électrophysiologiques ont permis l'établissement d'une classification de ces toxines en deux classes majeures : les toxines de classe α et β (voir les séquences **figure 31**).

Les toxines de classe α inhibent de façon voltage-dépendante l'inactivation des canaux Na^+ . Quant à elles, les toxines de classe β affectent l'activation de ces canaux sans montrer aucune sensibilité au voltage. Au delà de ces deux classes de toxines (α et β), il existe de surcroît une variation fonctionnelle caractérisée par les organismes qui y sont

sensibles ; ainsi, ces toxines peuvent être spécifiques d'un organisme donné (mammifère, insecte ou crustacé) mais aussi être toxiques simultanément pour plusieurs organismes différents. Ainsi, certaines toxines des deux classes α et β interagissent avec les canaux Na^+ de mammifères et d'insectes.

Enfin, deux groupes de toxines supplémentaires, spécifiques des canaux Na^+ d'insectes, ont été mis en exergue : les toxines de type contracturant et les toxines de type « relaxant ». La terminologie décrivant ces deux types de toxines dérive directement des effets macroscopiques observés : une contraction paralysante dans un cas et un relâchement musculaire (paralysie « relaxante » ou « flasque », traduit de l'anglais « *depressant* ») dans l'autre cas. Les toxines appartenant à ces deux groupes perturbent l'activation des canaux et sont compétitives des toxines de classe β , elles ont ainsi été incluses à la classe des toxines β (Gordon et coll., 1992; Benkhalifa et coll., 1997; Gurevitz et coll., 1998; Froy et coll., 1999; Gurevitz et coll., 2001, pour revue).

a°) Toxines de la classe α

Les toxines de cette classe montrent une variabilité dans leur toxicité apparente envers les mammifères et les insectes, une variabilité de séquence et une variabilité dans leurs propriétés pharmacologiques (Dufton et Rochat, 1984; Strichartz et Wang, 1986; Gordon et coll., 1996; Zilberberg et coll., 1996). Le mode d'action des α -toxines est caractérisé par une prolongation du potentiel d'action provoquée par l'inhibition de l'inactivation des canaux Na^+ de façon voltage-dépendante (Koppenhofer et Schmidt, 1968).

i L'archétype α anti-mammifère: AaH II

AaH II est extraite du venin du scorpion tunisien *Androctonus australis Hector*. Cette toxine est responsable à elle seule de 50% de la toxicité létale du venin. Si on tient compte de ses deux analogues, AaH I et AaH III, ces trois toxines supportent alors 90% de la toxicité du venin. Ces toxines, composées de 60 à 64 résidus et architecturées autour de 4 ponts disulfures, inhibent l'inactivation des canaux Na^+ voltage-dépendants et favorisent l'entrée d'ions Na^+ dans les cellules excitables (Martin-Eau Claire et Rochat, 1986). Ceci perturbe les systèmes neuromusculaire, respiratoire et cardiovasculaire conduisant irrémédiablement à la mort (Goyffon et coll., 1982). Etant la plus active ($K_D = 0.1\text{nM}$), AaH II est devenue l'archétype des toxines de classe α .

La structure d'AaH II a été déterminée par diffraction des rayons X à 1.8 Å de résolution (Fontecilla-Camps et coll., 1988), affinée à 1.3 Å (Housset et coll., 1994) et la résolution finalement obtenue est de 0.96 Å (Housset et coll., 2000). AaH II est composée d'une hélice α (19-28) et d'un feuillet β à trois brins antiparallèles (2-4, 45-51, 32-37). Trois coudes β de type I sont présents (27-30, 40-43, 52-55). Les résidus critiques pour l'interaction sont K58, R56 et W38 (Darbon et coll., 1983; Kharrat et coll., 1989; Kharrat et coll., 1990). On remarque que ces résidus sont localisés sur une surface majoritairement composée de résidus hydrophobes, cluster de résidus hydrophobes entouré par des résidus basiques (**figure 33**).

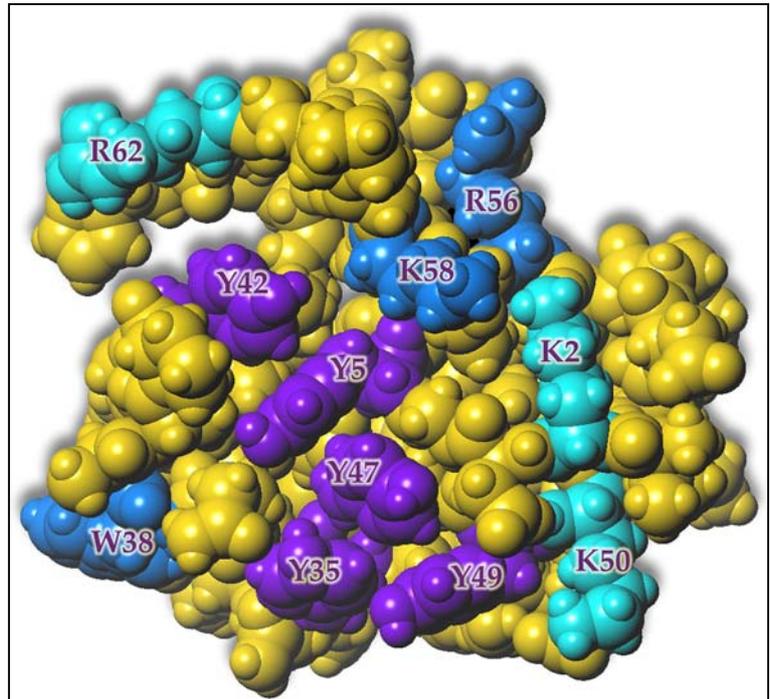


Figure 33 : Représentation de la surface d'interaction d'AaH II. Le code couleur est le suivant : les résidus importants clairement caractérisés sont colorés en **bleu**, les résidus basiques en **cyan** et les aromatiques en **violet**.

Deux protéines, non toxiques envers les mammifères ont récemment été purifiées à partir du venin du même scorpion Aah-TL1 et AaH-TL3 (Srairi-Abid et coll., 2000). La modélisation de la structure de ces toxines montre que ces peptides présentent une répartition des résidus chargés qui est différente de celle de AaH II. A cette différence de surface électrostatique s'ajoute la présence de Y59 en lieu et place du résidu critique K/R58 chez les toxines actives, la conjugaison de ces deux observations pouvant expliquer la non toxicité de ces deux peptides (Srairi-Abid et coll., 2000).

Une toxine présentant une très forte identité de séquence a été purifiée à partir du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus perméable* : Lqh II ne diffère d'AaH II que par la substitution de 2 résidus aux extrémités (Sautiere et coll., 1998). Lqh II présente la même affinité qu'AaH II sur les mammifères, mais se montre beaucoup plus active que cette dernière sur les insectes.

L'augmentation de l'affinité de Lqh II envers les canaux Na⁺ d'insectes est imputée à la substitution de H64 d'AaH II par R64 dans Lqh II Sautiere et coll., 1998), R64 visible sur la **figure 34**. L'importance de cette arginine a aussi été remarquée en comparant deux autres toxines, Lqq III ne contient pas cette arginine et présente une activité plus faible sur les insectes que Lqh αIT, qui la possède (Gordon et coll., 1996; Cestele et coll., 1997).

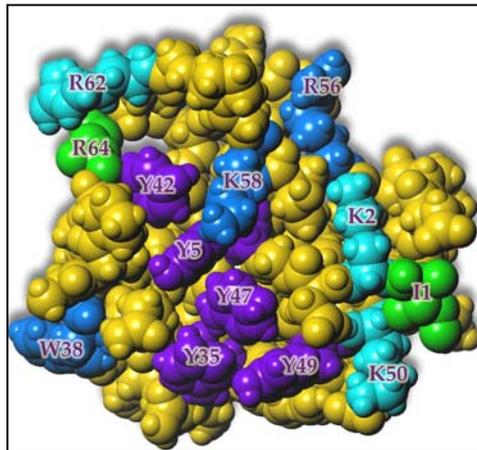


Figure 34 : Représentation de la surface d'interaction de Lqh II, modélisée à partir de la structure d'AaH II. Ces toxines ne différant que 2 résidus, la carte fonctionnelle d'AaH II est complètement retrouvée. **En vert** sont indiqués les deux résidus non conservés, dont R64 qui semble être responsable de la plus forte affinité sur les canaux d'insectes de Lqh II par rapport à AaH II.

ii Les toxines α anti-insectes

• Lqh-αIT

Lqh-αIT, composée de 64 résidus et extraite du venin du scorpion *Leiurus quiquestriatus hebraeus*, inhibe l'inactivation des canaux Na⁺ d'insectes et de muscles de rat, elle fut ainsi classée parmi les toxines α (Eitan et coll., 1990). Très active sur les neurones d'insectes ($K_d = 0.2$ nM et 0.02 nM sur les cafards et les sauterelles respectivement) ¹²⁵I.Lqh-αIT ne déplace pas AaH II de son site de fixation sur les synaptosomes de rats, et n'est toxique qu'à relativement forte concentration sur les souris (Gordon et coll., 1996). La structure de Lqh-αIT, résolue par RMN, est très

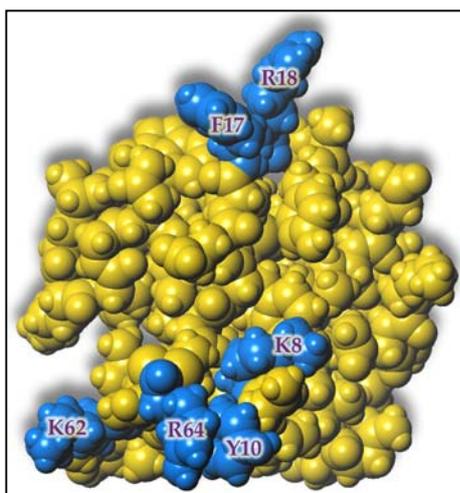


Figure 35 : Représentation de la surface d'interaction de Lqh-αIT. Les résidus importants pour l'interaction avec le canal sont colorés en bleu.

similaires autres toxines : on retrouve l'hélice α, le feuillet β à trois brins antiparallèles et les trois coudes de type I (Tugarinov et coll., 1997). On retrouve aussi un cluster hydrophobe similaire à celui rencontré dans la structure d'AaH II. Toutefois, les auteurs remarquent que les résidus compris dans le coude (8-12) engagent certains atomes dans des liaisons hydrogène avec les atomes des résidus de l'extrémité C-terminale. Ces interactions stabilisent ces deux régions de la molécule l'une par rapport à l'autre. L'étude de variants de Lqh-αIT met en évidence à la fois des résidus aromatiques (Y10 et F17) et basiques (K8, R18, K62 et R64) qui (i) pourraient interagir directement avec le site de

reconnaissance situé sur le canal Na⁺ (voir **figure 35**), (ii) sont importants pour le repliement de la toxine et (iii) contribuent à la génération d'un potentiel électrostatique qui pourrait influencer le processus de reconnaissance. Cette dernière remarque provenant du fait que le double mutant (K8D – E15A) supprime la diminution d'activité observée pour le simple mutant K8D (Zilberberg et coll., 1997).

• **Lqq III**

Purifiée à partir du venin du scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*, Lqq III se fixe avec une très haute affinité sur les canaux Na⁺ de neurone de cafards ($K_d = 72$

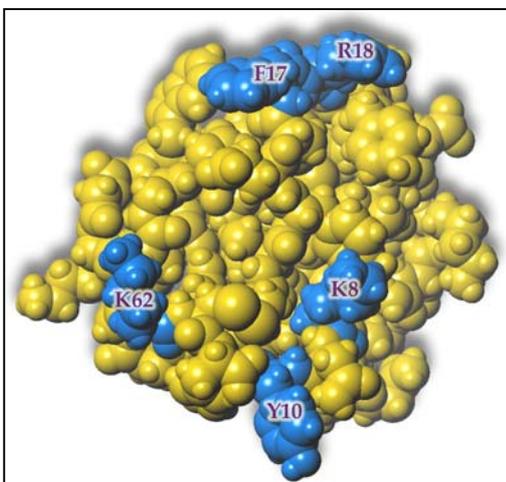


Figure 36 : Représentation de la surface d'interaction de Lqh-αIT appliquée à Lqq III. Les résidus importants pour l'interaction avec le canal sont colorés en bleu. Seul le résidu R64 est manquant comparativement à Lqh-αIT.

pM) et fixe moins bien les synaptosomes de rats ($K_d = 100$ nM) de façon compétitive à AaH II (Kopeyan et coll., 1993) ; la fixation de Lqq III est inhibée à très faible concentration de Lqh-αIT ($IC_{50} = 80$ pM), ces deux toxines ne diffèrent en séquence qu'en trois positions (Kopeyan et coll., 1993; Cestele et coll., 1997). La structure de Lqq III est analogue à celle des toxines α (Landon et coll., 1996; Landon et coll., 1997) et présente encore sur sa surface des regroupements de résidus hydrophobes séparés des résidus chargés. Les interactions hydrophobes et électrostatiques devant gouverner l'interaction et la spécificité des toxines longues de scorpion vis à vis

des canaux sodium. La carte fonctionnelle décrite pour Lqh-αIT est presque totalement retrouvée dans Lqq III (voir **figure 36**), seul le résidu R64 n'est pas présent dans Lqq III.

iii **Le groupe des α-like**

AaH II, l'archétype des toxines de classe α, a servi de base comparative pour définir un nouveau groupe de toxines qui lui sont apparentées : Les toxines dites de classe α-like (Gordon et coll., 1996; Gordon et coll., 1998; Cestele et coll., 1999).

Pour appartenir à ce nouveau groupe, la toxine doit :

- avoir une forte homologie de séquence avec les toxines de classe α
- inhiber l'inactivation des canaux Na⁺
- être active sur les seuls mammifères ou sur les mammifères et les insectes
- ne pas être compétitive d'AaH II sur le site d'interaction de cette dernière (site récepteur 3 du canal Na⁺).

Bom III et Bom IV constituent un bon exemple des effets électrophysiologiques de ces toxines de classe α -like, toxines à partir de l'activité desquelles le terme d' α -like a été proposé (Gordon et coll., 1996). Isolées à partir du venin du scorpion marocain *Buthus occitanus mardochei* (Vargas et coll., 1987), ces toxines ont été comparées avec les toxines α les plus actives sur les canaux Na^+ de mammifères (AaH II) et d'insectes (Lqh- α IT). Les résultats des tests ont montré que ces toxines inhibent l'inactivation des canaux testés, en étant moins actives sur les canaux de mammifères et non compétitives de AaH II. Mais les auteurs ont aussi remarqué que ces toxines ont un effet inhibiteur sur l'activation de ces même canaux, effet normalement observé uniquement avec les toxines de classe β . Enfin, il est à noter que Bom III et IV sont compétitives de Lqh- α IT à des concentrations nanomolaires (Gordon et coll., 1996).

Une autre toxine a été bien caractérisée : Lqh III, qui a été co-purifiée avec Lqh II et qui satisfait à toutes les conditions précitées, se situant ainsi parmi les toxines de la classe des α -like. Lqh III partage 80.6 % d'identité de séquence avec Bom III (Sautiere et coll., 1998). Très active sur les canaux Na^+ de cancrelat ($K_i = 2.2 \text{ nM}$), elle est compétitive de Lqh- α IT (toxine α anti-insectes) à de très faible concentrations ($\text{IC}_{50} = 0.43 \text{ nM}$). Sa toxicité sur les canaux Na^+ de souris est 100 fois inférieure à celle d'AaH II ($\text{LD}_{50} = 50 \text{ ng}/20\text{g}^{-1}$), sans qu'il y ai compétition entre ces deux toxines (Sautiere et coll., 1998). La structure de Lqh III a été résolue par RMN (Krimm et coll., 1999) et reste très similaire aux autres structures déjà décrites pour ces toxines. Toutefois, quelques différences structurales pour Lqh III sont à noter : (i) la zone 18-21 est mobile, zone bien définie dans les autres structures, du fait de l'insertion d'une glycine dans cette région et (ii) le coude β 8-12 est orienté différemment que dans Lqh- α IT, coude contenant 2 résidus importants (Zilberberg et coll., 1997; Krimm et coll., 1999).

Enfin, à la place de K/R58 (critique pour l'interaction) se trouve I59 dans Lqh III. cette substitution se trouve compensée par un nombre moins important de résidus acides dans Lqh III et permet de reproduire en partie la répartition classique des résidus positifs sur la surface de la toxine (Krimm et coll., 1999).

iv *Un site d'interaction commun ?*

Le fait que les toxines de classe α -like ne soit pas compétitives avec les toxines α hautement actives sur les mammifères (comme AaH II) et qu'elles n'aient pas de fixation détectable sur les canaux Na^+ de rats suggèrent que les α -like se fixent sur un site d'interaction différent des toxines α ou qu'elles reconnaissent des sous-types différents de canaux Na^+ mammifères.

D'un autre point de vue, les toxines α hautement actives sur les canaux d'insectes (comme Lqq III) peuvent être compétitives des toxines α anti-mammifères (Kopeyan et coll., 1993) et réciproquement ces même toxines anti-mammifères peuvent inhiber la fixation des toxines α anti-insectes (Gordon et coll., 1996; Cestele et coll., 1997).

Ces résultats appuient la notion que toutes les toxines de scorpion qui affectent l'inactivation des canaux Na^+ , soit les toxines α et les α -like, se fixent sur des sites d'interaction qui sont compris dans la même région du récepteur et se chevauchent, ici le site dit « site récepteur 3 » du canal sodium voltage dépendant (Gordon et coll., 1996; Gordon et coll., 1998; Cestele et coll., 1999).

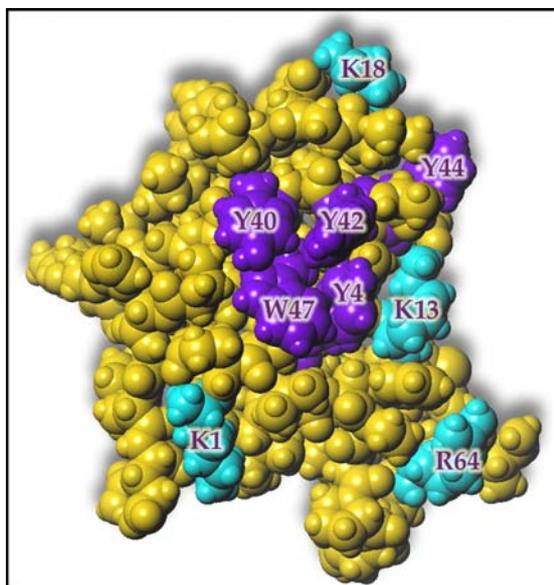
b°) Toxines de la classe β

i Les toxines β

Les toxines de classe β ont été caractérisées pour leur habilité à perturber les mécanismes d'activation des canaux Na^+ de façon voltage-indépendante (Martin-EauClaire et Couraud, 1995). L'effet macroscopique observable de ces toxines est l'apparition de trains de potentiels à la suite d'une stimulation unique, due à un déplacement de -50 mV du potentiel d'activation des canaux (Cahalan, 1975). En clair, le canal s'ouvre plus rapidement et se rouvre spontanément ensuite. Ces toxines n'agissent pas sur la phase d'inactivation des canaux. Le résidu critique pour l'interaction des toxines β avec le canal a été identifié en K13 sur la toxine Css-II (Darbon et Angelides, 1984).

CsE-V3 est une toxine de 65 résidus, très peu toxique sur les mammifères, purifiée à partir du venin du scorpion américain *Centroides sculpturatus* Ewing. Structuellement reliée aux toxines β , sa structure a été déterminée par cristallographie à 3\AA (Fontecilla-Camps et coll., 1980), 1.8\AA (Fontecilla-Camps et coll., 1981; Almasy et coll., 1983) et 1.2\AA de résolution (Zhao et coll., 1992) mais aussi par RMN (Lee et coll., 1994). Les structures déterminées avec ces deux méthodes sont homologues, mais varient sensiblement l'une par rapport à l'autre. La position des structures secondaires ne varie pas, mais la longueur de ces segments structurés sont décrites différemment : l'hélice α couvre les résidus 23-31 (23-30) et un feuillet β à trois brin est visible entre les fragments 1-5 (2-6), 45-50 (45-49) et 36-42 (38-42), les données entre parenthèses étant celles de la structure à 1.2\AA (Zhao et coll., 1992) et les autres celles déterminées par RMN (Lee et coll., 1994). Les deux structures font apparaître un *cluster* de résidus aromatiques qui représente une large bande exposée au solvant sur cette face.

D'autres toxines extraites du venin de ce scorpion ont vu leur structure résolue : CsE-V (Jablonsky et coll., 1995), CsE-I (Jablonsky et coll., 1999), Cse-V5 (Jablonsky et coll., 2001; Xu et coll., 2001) et CsE-V2 (Cook et coll., 2002).



La toxine Cn2 constitue un des composants majeurs les plus toxiques du venin extrait du scorpion mexicain *Centroides noxius Hoffmann* (Zamudio et coll., 1992). Sa structure montre un repliement classique des toxines longues de scorpion et un *cluster* de résidus hydrophobes défini par les résidus Y4, Y40, Y42, F44 et W47 sur la face du feuillet exposée au solvant entourés par les résidus basiques K1, K13, K18 et R64 (Pintar et coll., 1999) (voir **figure 37**).

Figure 37 : Représentation de la répartition des résidus basiques (en cyan), dont le résidu critique K13, et aromatiques (en violet) sur la surface d'interaction de Cn2.

ii Les toxines anti-insecte de type « relaxant »

L'effet induit par ces toxines est à l'inverse de celui observé avec des toxines de type contracturant. Les insectes testés montrent un relâchement musculaire et une paralysie entraînant la mort dans les 20 à 30 heures selon la dose administrée (Lester et coll., 1982). Peu de toxines appartenant à ce groupe ont été caractérisées, on peut citer la détermination de la séquence de Lqq-IT2 du scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Kopeyan et coll., 1990), Lqh-IT2 du scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* (Zlotkin et coll., 1991) et Bj-IT2 du scorpion *buthatus judaicus* (Zilberberg et coll., 1991). Ces toxines induisent une dépolarisation graduelle de la membrane qui aboutit à un blocage total des potentiels d'action. Malgré cette différence de pharmacologie, ces toxines « relaxantes » se lient au canal sur un site ($K_d=0.9$ nM) proche de celui des toxines contracturantes puisque étant compétitives les unes des autres, mais reconnaissent aussi un deuxième site d'interaction ($K_d=185$ nM) de moindre affinité (Zlotkin et coll., 1985; Gordon et coll., 1992).

iii Les toxines anti-insectes de type « contracturant »

Ces toxines provoquent chez les insectes des effets contracturants immédiats se traduisant par une contraction paralysante de la larve de la mouche (Zlotkin et coll., 1971) ou des mouvements désordonnés de pattes de l'insecte adulte et à court terme par une paralysie qui conduit rapidement à la mort.

Tout comme pour les toxines de type « relaxant », peu de toxines appartenant à ce groupe ont été caractérisées, et encore moins de séquences primaires sont connues. Ainsi seules les séquences de Bxtr-IT du scorpion *buthatus judaicus* (Oren et coll., 1998), de AaH-IT (et ses variants) du scorpion *Androctonus australis Hector* (Darbon et coll., 1982; Bougis et coll., 1989; Loret et coll., 1990) et de Lq-IT1 du scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus* (Kopeyan et coll., 1990) ont été déterminées. L'analyse de ces séquences permet de remarquer immédiatement que la position d'une cystéine a été déplacée vis à vis de toutes les autres séquences des toxines α et β classiques, entraînant le déplacement du pont disulfure correspondant (Darbon et coll., 1982) : par exemple, le pont incriminé C12-C63 d'AaHIII (ou C12-C65 de CsE-V3) devient l'appariement C43-C69 dans Bxtr-IT. La position particulière adoptée par cette cystéine n'est rencontrée que pour les toxines de type contracturant.

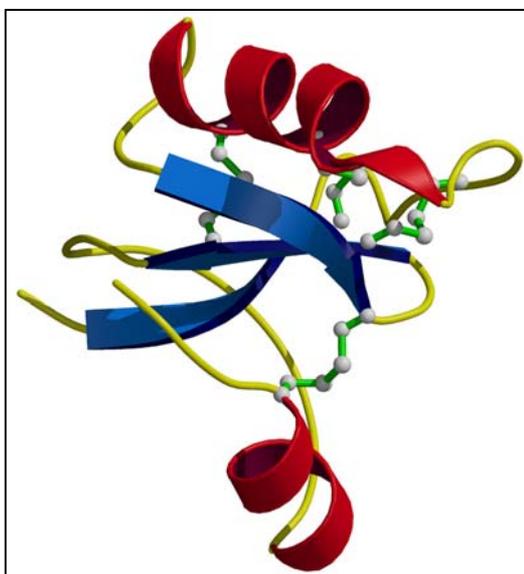


Figure 38 : Représentation de la structure de Bxtr-IT. La position des cystéines implique un nouvel appariement des ponts disulfures qui se répercute sur la structure. Le repliement des 17 derniers résidus est inédit pour les toxines longues de scorpion actives sur les canaux Na^+ : une hélice α en position C-terminale.

Il est intéressant d'analyser les implications structurales entraînées par ce déplacement du pont disulfure, qui initialement reliait les deux extrémités de la molécule. La structure de Bxtr-IT a été déterminée par cristallographie aux rayons X à 2.1Å de résolution (Oren et coll., 1998). Sur les 76 résidus que compte la protéine, les 59 premiers s'organisent en un module structural similaire aux toxines de classe α et β . Mais l'extrémité C-terminale composée des 17 derniers résidus se replie dans l'espace de façon inédite pour ces toxines : cette extrémité se compose d'un court segment d'hélice α (63-69) ancrée au module structural par le pont disulfure, hélice α suivie de 7 résidus très mobiles (voir **figure 38**). Cette région très mobile recouvre et masque donc en partie la

surface hydrophobe conservée qui est importante pour l'interaction des toxines longues classiques sur les canaux Na^+ (Oren et coll., 1998).

De plus le remplacement de ces 7 résidus terminaux par une glycine abolit l'activité de Bxtr-IT, et les délétions successives de ces résidus mettent en exergue le rôle primordial de I73 et I74 (baisse d'activité d'un facteur 100), rendant cette région de la toxine comme capitale pour la reconnaissance de Bxtr-IT à son site d'interaction sur le canal (Froy et coll., 1999; Gurevitz et coll., 2001). D'autres résidus, à une échelle de moindre importance, ont été caractérisés : le remplacement de D55, D70, N28 et Y36 induit une

légère baisse d'activité (Froy et coll., 1999). Enfin, au vu de la structure, les auteurs proposent un nouvel alignement des séquences entre les toxines β de type contracturant et les autres toxines longues, où quatre cystéines (au lieu d'une initialement) ne sont plus superposables (Oren et coll., 1998).

La structure préliminaire de AaH-IT, toxine de type contracturant faisant preuve de la plus forte affinité, $K_d = 1$ nM (Gordon et coll., 1984; Zlotkin, 1987), a été déterminée en 1991 (Darbon et coll., 1991). Plus récemment, la modélisation de la structure d'AaH-IT à partir de celle de Bjxtr-IT a permis de souligner les similitudes entre les surfaces d'interactions putatives de ces deux toxines (surfaces centrées autour de I73 et I74 de Bjxtr-IT) (Froy et coll., 1999).

En ce qui concerne la localisation sur le canal Na^+ du site d'interaction des toxines β , les informations sont moins profuses que pour les toxines α : ces toxines β classiques interagissent avec le site récepteur 4 du canal. Les toxines de type contracturant et « relaxant » ont quant à elles leur propre site d'interaction, pas encore clairement identifié mais différent du site 4 (Cestele et Catterall, 2000 pour revue).

II Les toxines architecturées autour du motif ICK

1 Le motif structural ICK

a°) Découverte du « Cystine knot »

Le terme « *Cystine Knot* » (en français « *nœud de cystine* ») a été introduit la première fois en 1993 dans des revues décrivant la structure récemment résolue de divers facteurs de croissance tels que le NGF (*Nervous Growth Factor*) ou le TGFβ2 (*Transforming Growth Factor β2*) (McDonald et Hendrickson, 1993; Murray-Rust et coll., 1993). Les auteurs notèrent que la structure de ces protéines contenait un motif non conventionnel : un anneau formé par deux ponts disulfures et leurs chaîne peptidique, anneau traversé par un troisième pont disulfure. Cet arrangement apparent en nœud des ponts disulfures était associé à plusieurs brins β dans ces structures. Alors que les premiers exemples publiés de ce type de motif étaient associés aux facteurs de croissance, il devint rapidement évident que ce motif était commun à un certain nombre de peptides plus petits.

Ainsi, au début des années 90 furent publiées plusieurs structures de peptides riches en cystéines dont des inhibiteurs de trypsine (Chiche et coll., 1989; Nilges et coll., 1991) et des toxines de cônes marins (Lancelin et coll., 1991; Ott et coll., 1991; Davis et coll.,

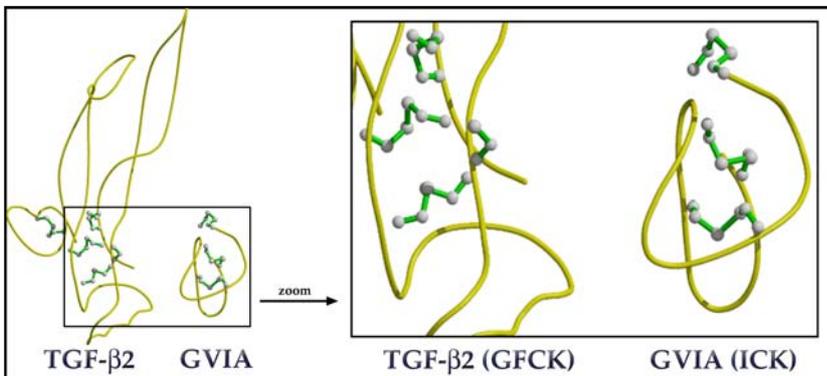


Figure 39 : Comparaison de la structure d'un facteur de croissance (TGF-β2) et d'une toxine extraite du venin d'une cône de mer (GVIA). Même si leurs tailles respectives sont très différentes (**à gauche**) on retrouve un appariement similaire des ponts disulfures : le cystine knot ou nœud de cystéines (**à droite**, par grossissement de la zone encadrée à gauche). Toutefois, le pont disulfure central est formé par le couple de cystéines **C_I-C_{IV}** dans les GFCK et **C_{III}-C_{VI}** dans les ICK.

C_{III}-C_{VI} (on numérote les cystéines de I à VI dans l'ordre croissant du N- au C-terminal en ignorant, le cas échéant, les cystéines non impliquées dans le nœud), mais lorsque la topologie de ces protéines est prise en compte, les motifs structuraux ne sont plus superposables à ceux des facteurs de croissance. Ceci a permis la distinction de la famille des « *Inhibitor Cystine Knot* » (ICK : de petites molécules riches en cystéines et

1993; Pallaghy et coll., 1993; Sevilla et coll., 1993; Skalicky et coll., 1993). Il s'est avéré que la structure de ces peptides contenait un nœud de cystéines très similaires à celui rencontré dans le

facteurs de croissance (voir

figure 39). Toutes ces

molécules partagent le même

appariement de leurs ponts

disulfures **C_I-C_{IV} / C_{II}-C_V /**

ayant toutes un rôle d'inhibition) avec celle des « *Growth Factor cystine Knot* » (GFCK) (Pallaghy et coll., 1994; Isaacs, 1995; Sun et Davies, 1995). En effet, dans la famille des GFCK, c'est le pont disulfure **C_I-C_{IV}** qui traverse l'anneau formé par les autres cystéines alors que pour la famille des ICK **C_{III}-C_{VI}** est le pont traversant l'anneau (voir **figure 39**).

Enfin, une troisième famille de protéines possédant ce nœud de cystéines a été défini (**figure 40**) : les « *Cyclic Cystine Knot* » (CCK) (Craik et coll., 1999), dont la première structure tridimensionnelle résolue fut celle de Kalata B1 (Saether et coll., 1995). Cette famille regroupe des protéines de taille similaire aux ICK qui ont la particularité d'être des molécules cycliques exprimées uniquement chez certaines plantes, ayant des rôles variés : cytotoxiques, antibactérien, antiviral. Comparativement aux ICK, la cyclisation induit la formation d'une boucle supplémentaire (Gustafson et coll., 1994; Witherup et coll., 1994; Craik, 2001 pour revue).

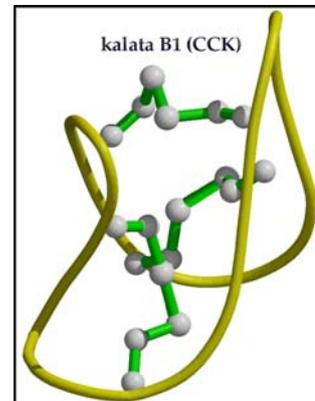


Figure 40 : Structure de Kalata B1, appartenant à la famille des CCK. La seule distinction avec les ICK est que ces protéines sont cycliques

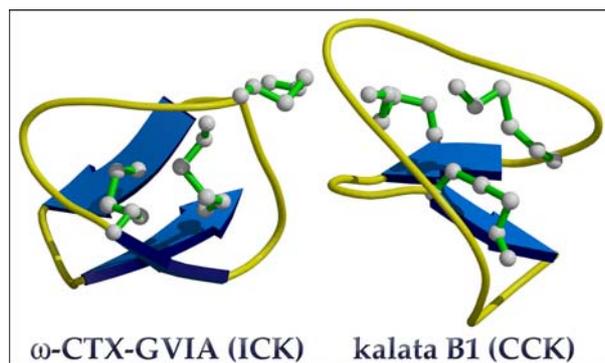


Figure 41 : Représentation de la structure d'un ICK (oméga-conotoxine GVIA) et d'un CCK (kalata B1) où les éléments de structure secondaire sont visibles, soit un feuillet β à 2 ou 3 brins antiparallèles.

b°) Le motif structural

L'élément de structure secondaire prédominant associé au nœud de cystéine dans ces toxines est un feuillet β à deux ou trois brins qui est intimement associé au nœud de cystéine (voir **figure 41**).

L'appariement des ponts disulfures **C_I-C_{IV}** / **C_{II}-C_V** / **C_{III}-C_{VI}** est une condition nécessaire mais pas suffisante pour observer la formation

du nœud de cystéine ; En effet, les toxines s'architecturant autour du motif $C\alpha\beta$ présentent les mêmes connections entre demi-cystéines sans pour autant qu'il y ait formation du nœud. Essayant de dégager une séquence consensus au sein des ICK et CCK, Pallaghy et coll. ont proposé la séquence suivante comme consensus pour ces deux familles :



La caractérisation d'un nombre croissant de toxines et de leur séquence a permis de faire évoluer ce consensus, comme ce fut le cas en 1998 :



Puis en 2001 :



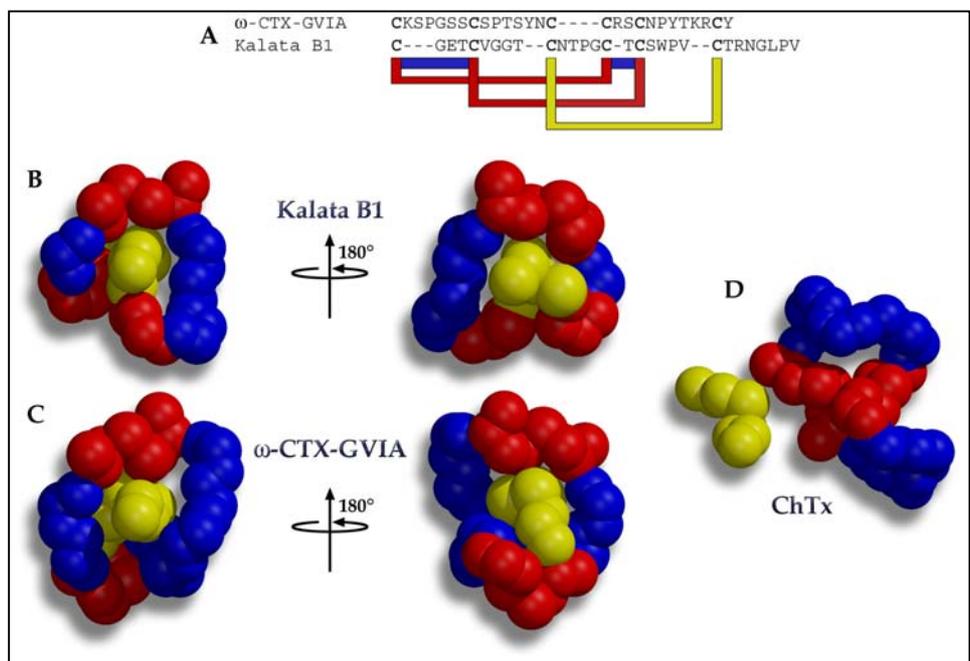
Toutefois, le consensus commun ICK – CCK reste trop vague. Si on sépare les ICK des CCK, le consensus se précise :



Sont surlignés en bleu les résidus qui forment l’anneau proprement dit du motif. Immédiatement, on remarque que la taille de l’anneau des CCK est constante (absolument conservée) et asymétrique (**figure 42**). La conservation de la longueur des boucles correspondantes (boucle 1 et 4) doit avoir son importance dans la stabilisation de la structure cyclique de ces toxines. De plus des expériences de dé-cyclisation de kalata B1 ont montré que les six mutants acycliques de topologies distinctes possédaient une structure analogue au repliement de la protéine cyclique exceptés les mutants où la coupure intervenait dans la boucle 1 et 4 (Daly et Craik, 2000). Ces résultats suggèrent que les boucles portant l’anneau sont fondamentales pour la stabilisation de la structure, et renforcent l’importance du « Cystine Knot » dans l’intégrité du repliement de ces protéines.

En ce qui concerne les ICK (voir **figure 42**), le consensus fait apparaître deux cystéines successives (C_{III} C_{IV}), un anneau de taille non constante et plus large que les CCK mais avec conservation de l’asymétrie (anneau plus grand au niveau de l’extrémité N-terminale).

Figure 42 : Mise en évidence du nœud de cystéines : **(A)** alignement de la séquence de kalata B1 (CCK) et de l’oméga conotoxine GVIA (ICK). L’appariement des ponts disulfures est indiqué et caractérise le nœud de cystéines : les deux ponts disulfures impliqués dans l’anneau sont colorés en **rouge** tandis que le pont traversant cet anneau est coloré en **jaune**. Caractérisation structurale du nœud de cystéine de kalata B1 **(B)** et de l’oméga conotoxine GVIA **(C)**, aux ponts disulfures s’ajoute la chaîne principale de la protéine impliquée dans l’anneau (**en bleu**).



(D) Représentation des résidus correspondants de la charybdotoxine (toxine articulée autour du motif C α β) qui illustre bien le fait que l’appariement des ponts disulfures C_I-C_{IV} / C_{II}-C_V / C_{III}-C_{VI} est une condition nécessaire mais pas suffisante pour observer la formation du nœud de cystine.

La **figure 43**, ci-dessous, présente les séquences des différents groupes de toxines articulées autour du motif ICK que nous allons présenter par la suite.

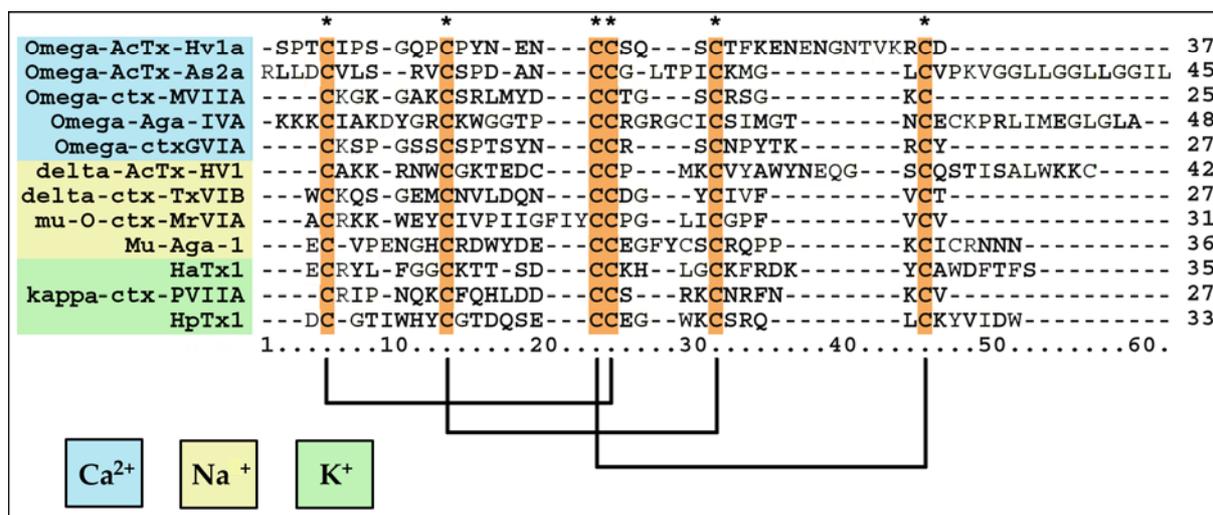


Figure 43 : Alignement de séquence de chacun des représentants des différents groupes de toxines architecturées autour du motif ICK. Les cystéines impliquées dans la formation du nœud de cystéines sont encadrées en **orange**, et le nom des toxines est coloré suivant les canaux ioniques ciblés : en **bleu** pour les canaux Ca²⁺, **jaune clair** pour les canaux Na⁺ et **vert** pour les canaux K⁺.

c°) Etudes du repliement des ICK

Une protéine contenant 6 cystéines peut, en principe, former un total de 15 variants à 3 ponts disulfures et il est bien entendu que la présence d'un nœud de cystéines dans une telle protéine reste une caractéristique peu courante. Cette fascinante particularité permet de s'interroger sur les mécanismes de repliement et d'appariement des ponts disulfures de telles protéines. De nombreuses études se sont portées sur l'analyse de l'appariement des ponts et mécanisme de repliement d'un type bien précis d'ICK : les oméga-conotoxines (décrites en détail ci-après).

Il est nécessaire de souligner en premier le rôle des ponts disulfures dans l'intégrité structurale et donc dans l'activité des ICK. L'importance des ponts disulfures dans l'oméga-conotoxine MVIIA a été étudiée par synthèse de mutants dont un ou plusieurs ponts ont été enlevés. Les résultats montrent que chaque pont disulfure influe non seulement sur la stabilisation de la conformation de la protéine native mais aussi sur l'appariement spécifique des deux autres ponts disulfures (Price-Carter et coll., 1998). Des études similaires ont été réalisées avec l'oméga-conotoxine GVIA où il apparaît là aussi clairement d'une part que chaque pont est indispensable à l'intégrité structurale de GVIA et d'autre part que lorsque la formation du pont **C_{III}-C_{VI}** est bloquée, un analogue à deux ponts disulfures d'appariement de types non natifs (**C_I-C_{II}** et **C_{IV}-C_V**) prédomine (Flinn et coll., 1999a).

L'analyse des séquences d'ADN complémentaires codant pour ces conotoxines ont montré que les oméga-conotoxines sont synthétisées sous forme de précurseurs (voir **figure 44**) composés d'une séquence signal d'adressage au réticulum endoplasmique (hautement conservée), d'un pro-peptide de fonction inconnue, de la protéine mature et dans certains cas d'une glycine terminale post-traductionnellement convertie en NH2 terminal (Woodward et coll., 1990; Colledge et coll., 1992) :

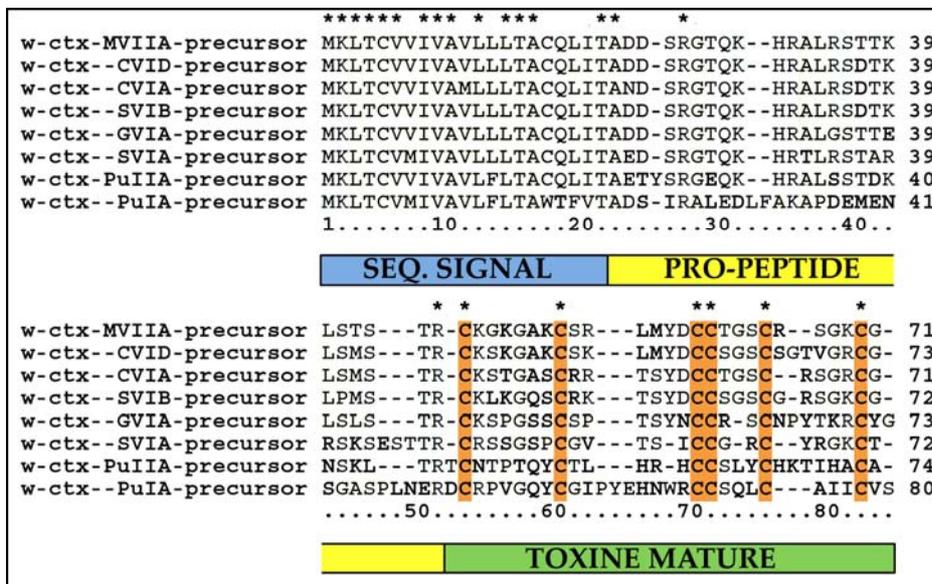


Figure 44 : Alignement des séquences de conotoxines contenant la séquence signal, le pro-peptide et la séquence de la protéine mature. Les cystéines impliquées dans le motif sont surlignées en orange et les astérisques (*) caractérisent les résidus strictement conservés. Il est à noter la très haute conservation des résidus de la séquence signal, laissant supposer un adressage particulier dans le réticulum endoplasmique où ces toxines acquièrent leur repliement.

La présence du pro-peptide pose la question suivante : la toxine mature est elle capable de se replier seule ou le pro-peptide intervient il dans le repliement correct de la toxine ?

Des éléments de réponse ont été proposés en 1996 par Price-carter et coll. d'une part en étudiant le repliement de 5 oméga-conotoxines matures synthétiques : MVIIA, MVIIC, MVIID, GVIA et SVIA (Price-Carter et coll., 1996a) et d'autre part en testant l'importance du pro-peptide et de la glycine terminale (Price-Carter et coll., 1996b).

En ce qui concerne les conotoxines synthétiques, les résultats obtenus sont que les formes matures réduites de ces toxines (issues de 3 espèces de cônes différentes) sont capables de se replier correctement avec une efficacité allant de 15 à 50%. Il est à noter que la MVIIA ainsi repliée a une activité indiscernable de la MVIIA native. Ces résultats ont permis aux auteurs de proposer que la séquence mature contient l'information qui spécifie la conformation correcte de la protéine (Price-Carter et coll., 1996a).

L'influence du pro-peptide sur le repliement a été testée par la comparaison de l'efficacité de repliement de la MVIIA native et de deux précurseurs putatifs : l'un contenant le pro-peptide et la glycine terminale (pro-peptide - MVIIA -Gly) et l'autre ne différant de la MVIIA native que par la présence de la glycine terminale (MVIIA - Gly). Les résultats montrent que l'efficacité de repliement atteint plus de 80% pour le précurseur (MVIIA -

Gly) et environ 50% pour la MVIIA native et le précurseur (pro-peptide – MVIIA –Gly). Les mesures d'activité montrent que les précurseurs (MVIIA – Gly) et (pro-peptide – MVIIA - Gly) sont respectivement 10 et 100 fois moins actifs que la MVIIA native. Ces observations suggèrent (i) que le pro-peptide ne facilite pas le repliement de ces toxines (ii) que la séquence mature contient l'information nécessaire à son repliement (iii) que la glycine terminale favorise le repliement natif et doit être convertie en NH₂ terminal une fois le processus de repliement achevé (Price-Carter et coll., 1996b).

2 Les toxines actives sur les canaux calcium

La structure de toxine actives sur les canaux calcium et architecturées autour du motif ICK sont présentées dans la **figure 45** ci-dessous :

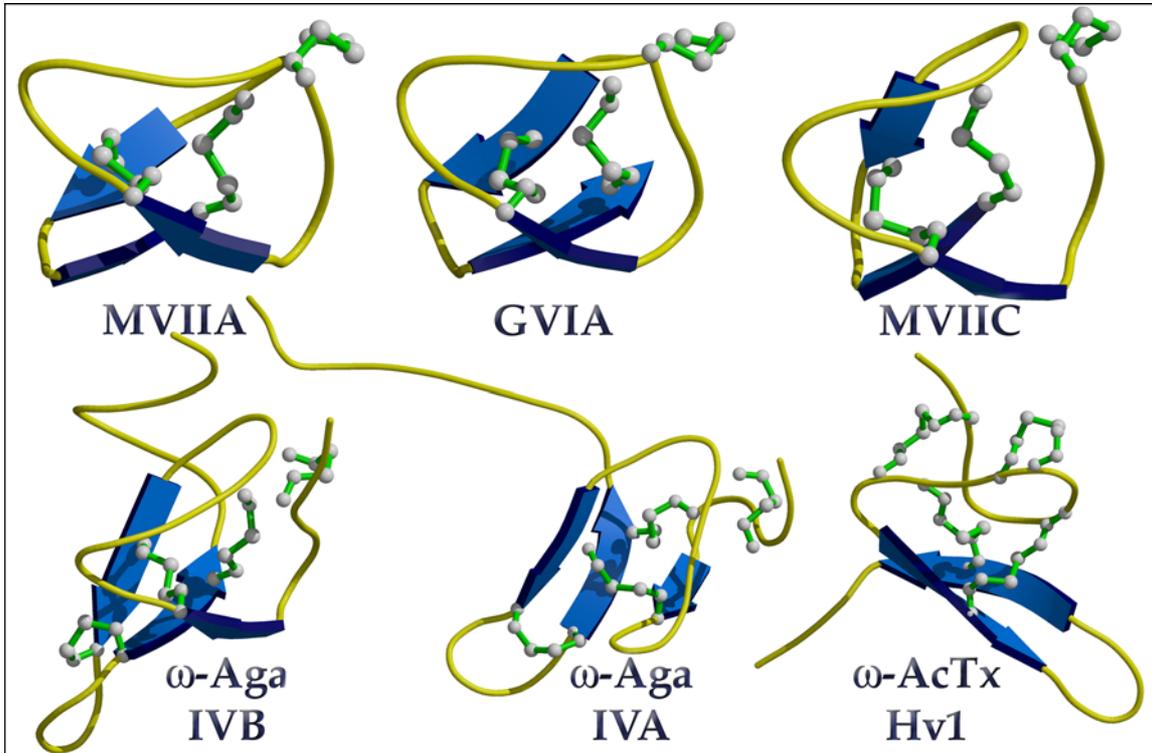


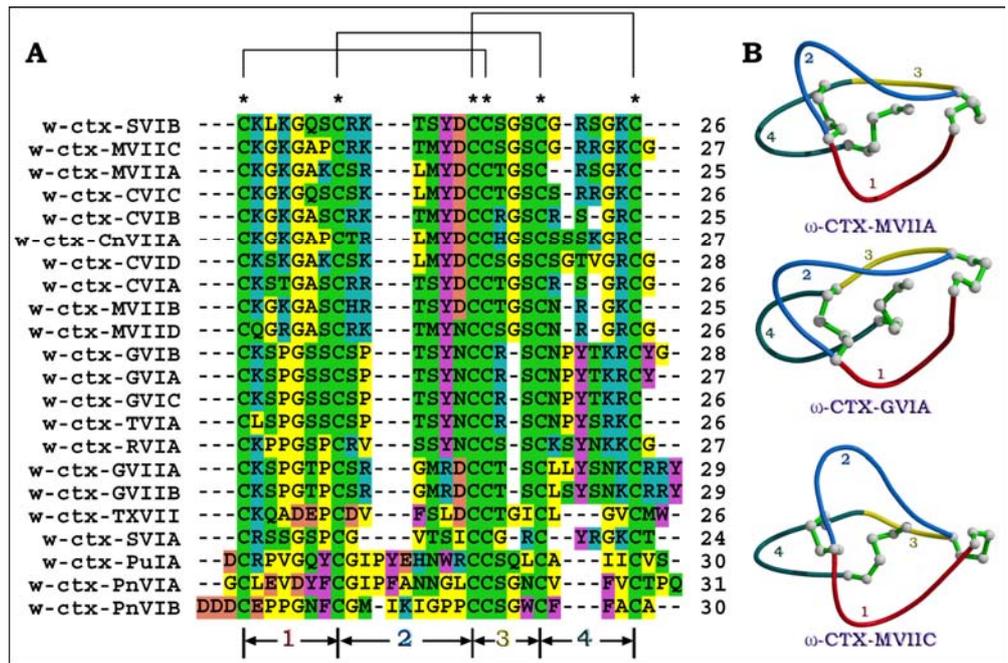
Figure 45 : Représentation de la structure d'oméga-conotoxines et de toxines d'araignées actives sur les canaux calcium. Codes PDB : 1OMG (MVIIA), 2CCO (GVIA), 1CNN (GVIA), 1AGG (ω -Aga-IVB), 1IVA (ω -Aga-IVA) et 1AXH (ω -AcTx HV1).

a°) Les oméga-conotoxines

Les cônes marins sécrètent un venin contenant une gamme variée de toxines (par extension, les conotoxines) qui, après injection, immobilise instantanément leurs proies. D'une efficacité redoutable, ces différentes toxines ont été classées en superfamilles en fonction du nombre et de l'arrangement de leurs cystéines, ces superfamilles se subdivisant en familles décrivant les canaux ioniques qu'elles inhibent : ainsi les conotoxines présentant le motif structural ICK se répartissent dans la superfamille O, à l'intérieur de laquelle on distingue les oméga-conotoxines (ω -conotoxines) qui inhibent les canaux Ca²⁺, les kappa-conotoxines (κ -conotoxines) les canaux K⁺, les delta-conotoxines (δ -conotoxines) et les muO-conotoxines (μ O-conotoxines) les canaux Na⁺ (voir Olivera et Cruz, 2001 pour revue).

Les ω -conotoxines sont composées de 24 à 34 résidus, ont leur extrémité C-terminale amidée et bloquent l'activité des canaux Ca²⁺ voltage dépendants (**figure 46**).

Figure 46 : (A) Alignement de séquences de certaines ω -conotoxines. L'appariement des ponts disulfures est visible et les astérisques (*) indiquent les résidus strictement conservés. Le code couleur dépend de la nature de la chaîne latérale du résidu concerné : **bleu** pour les résidus basiques, **vert** pour les polaires, **jaune** pour les aliphatiques et **rouge** pour les polaires. Les numéros **1, 2, 3 et 4** correspondent aux boucles délimitées par les cystéines, (B) et sont re-portés sur la structure tridimensionnelle des ω -conventionnel GVIA, MVIIA et MVIIC



i GVIA

Extraite du venin du cône marin *Conus geographus*, composée de 27 résidus et active spécifiquement sur les canaux Ca^{2+} de type N ($K_d = 25$ pM) (Olivera et coll., 1984; Kristipati et coll., 1994), sa structure (résolue par plusieurs groupes différents) est

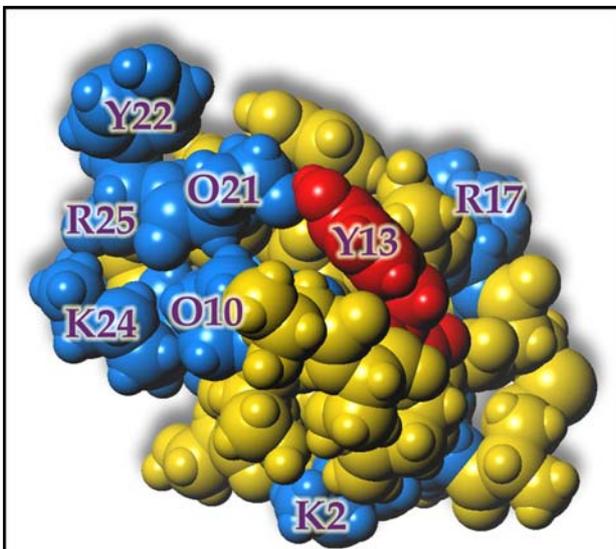


Figure 47 : Carte fonctionnelle de l' ω -CTX-GVIA. Les résidus caractérisés comme étant important pour l'interaction de la toxine avec le canal sont colorés : Le résidu **Y13 critique** pour l'activité (**en rouge**) et les autres résidus ayant une influence sur la fixation de la toxine (**en bleu**). O21 et O10 correspondent à des hydroxyprolines.

caractéristique du motif ICK (Davis et coll., 1993; Pallaghy et coll., 1993; Sevilla et coll., 1993; Skalicky et coll., 1993; Pallaghy et Norton, 1999). Un certain nombre d'études ont permis de mettre en évidence les résidus importants pour l'activité de la toxine : le résidu Y13 est critique, avec une forte influence de l'hydroxyle du groupement phénol (Kim et coll., 1994; Kim et coll., 1995b) et K2 est aussi importante pour l'interaction de GVIA avec le canal (Sato et coll., 1993). Initialement restreinte à ces deux résidus, la carte fonctionnelle s'est faite plus précise par la proposition de deux régions importantes pour l'interaction : la première, capitale, est composée des résidus

K2, Y13 et R17 alors que la seconde contient Y22, K24, O10, O21 et R25 (Lew et coll., 1997). Ces observations sont illustrées par la **figure 47**. Les mutants K2R et K24R ne montrent aucune variation d'activité, ce qui semble indiquer que GVIA interagit avec le vestibule externe du canal plutôt que directement avec le pore comme cela avait été proposé (Ellinor et coll., 1994; Flinn et coll., 1999b).

ii MVIIA

Purifiée à partir du venin du cône marin *Conus magus*, MVIIA ne partage que 40% d'homologie de séquence avec GVIA mais elle possède la même spécificité et une constante d'affinité comparable ($K_d = 10$ pM) sur les canaux Ca^{2+} voltage dépendants de type N (McIntosh et coll., 1982; Olivera et coll., 1987; Kristipati et coll., 1994). MVIIA et GVIA sont des inhibiteurs compétitifs, interagissant avec le canal au niveau d'un site de reconnaissance commun. La structure tridimensionnelle de MVIIA, déterminée par RMN (Basus et coll., 1995; Kohno et coll., 1995), s'organise classiquement autour du motif

ICK. Dans le but de définir les résidus impliqués dans l'interaction toxine/canal, Nadasdi et son équipe ont étudié l'importance de chacune des 4 lysines, des 2 arginines (par mutations ponctuelles) et du groupement amine à l'extrémité N-terminale (N-acétylation) ainsi que l'importance de la boucle 2 (par clivage enzymatique) (Nadasdi et coll., 1995). Les résultats montrent que K2, R10, R21 et l'extrémité N-terminale sont les parties

basiques les plus importantes pour l'activité de MVIIA (voir **figure 48**). K4 et K7 sont de moindre importance et le remplacement K24A n'a pratiquement pas d'influence sur

l'interaction, alors qu'on remarque la présence d'un résidu basique en cette position dans toutes les ω -conotoxines (Ramilo et coll., 1992). En ce qui concerne la boucle 2, le clivage chymotrypsique de la liaison peptidique Y13-D14 conduit à une perte quasi-totale d'activité, ceci soulignant l'importance de cette boucle dans l'intégrité structurale de MVIIA (Nadasdi et coll., 1995). Tout comme pour GVIA, le résidu critique pour l'activité de la toxine envers les canaux Ca^{2+} de type N est la tyrosine 13 (Kim et coll., 1995b;

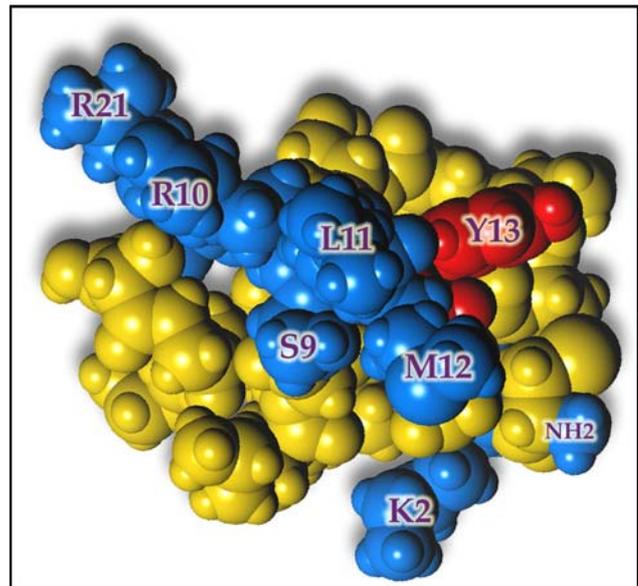


Figure 48 : Carte fonctionnelle de l' ω -CTx-MVIIA. Les résidus caractérisés comme étant important pour l'interaction de la toxine avec le canal sont colorés : Le résidu **Y13 critique** pour l'activité (**en rouge**) et les autres résidus ayant une influence sur la fixation de la toxine (**en bleu**).

Nielsen et coll., 1999b). Enfin, les résidus proches de cette Y13 sont eux aussi impliqués (**figure 48**). Du fait du remplacement de la région 9-RKTS-12 de SVIB (ω -conotoxine spécifique des canaux de type P/Q, de très faible affinité pour le type N) par la région correspondante de MVIIA (9-SRLM-12), l'affinité de cette chimère pour les canaux Ca^{2+} de type N s'en trouve augmentée d'un facteur 50 (Nadasdi et coll., 1995).

iii MVIIC

Secrétée par le même cône marin que MVIIA, MVIIC partage 70% d'identité de séquence (80% homologie) avec cette dernière. Sa structure tridimensionnelle, résolue par RMN, est similaire à celle de MVIIA (Farr-Jones et coll., 1995; Nemoto et coll., 1995). Malgré toutes ces caractéristiques communes, MVIIC inhibe les canaux Ca^{2+} de type P/Q ($\text{IC}_{50} = 3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$) (Sato et coll., 1997). Toutefois, MVIIC n'est pas réellement spécifique puisque montrant une certaine affinité pour les canaux de type N ($\text{IC}_{50} = 6.5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$) (Sato et coll., 1997). Les divergences de séquence se retrouvent essentiellement dans la boucle 2 (9-SRL-11 pour MVIIA et 9-RKT-11 pour MVIIC) et dans la boucle 4. Parmi ces quelques différences se trouve la clé définissant la spécificité de l'affinité d'une toxine pour un type de canal donné, type N ou P/Q (voir **figure 49**).

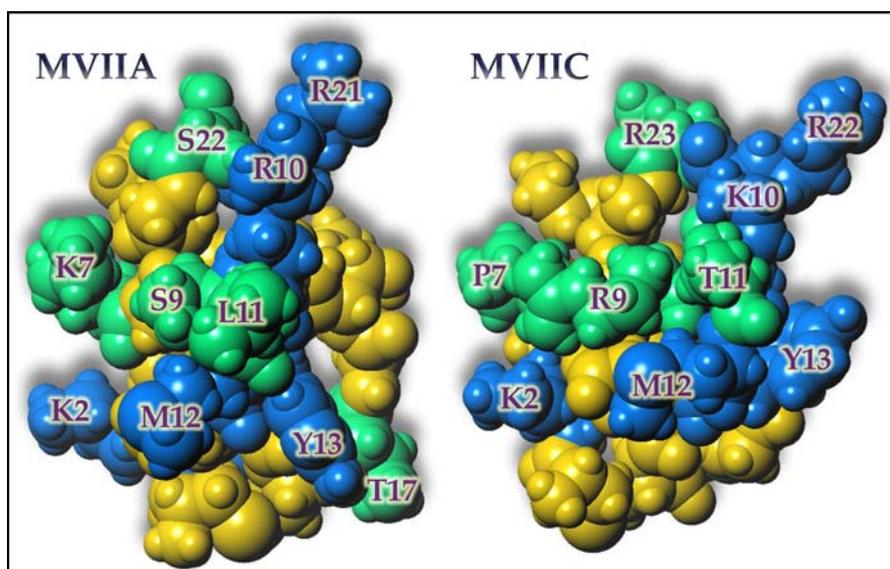


Figure 49 : Mise en évidence des points communs et des différences dans la composition des cartes fonctionnelles de MVIIA et MVIIC. La surface présentée correspond à celle impliquée par MVIIA contre les canaux de type-N. **En bleu** sont caractérisés les résidus importants pour la reconnaissance des canaux Ca^{2+} de **type-N** et qui sont **communs** à MVIIA et MVIIC. **En vert** sont représentés les résidus qui **diffèrent** dans MVIIA et MVIIC : parmi ces résidus se trouvent ceux responsables de la spécificité des toxines envers les canaux Ca^{2+} de type P/Q.

L'étude du comportement d'analogues de MVIIC sur des canaux Ca^{2+} de type N et de type P/Q a montré que les résidus T11, Y13 et K2 sont capitaux à la fixation de MVIIC sur les deux types de canaux et que K4 et R22 sont importants pour l'interaction avec les canaux de type P/Q (Sato et coll., 2000). Toutefois, la présence d'un résidu aliphatique à longue chaîne latérale en position 11 est plus favorable pour l'interaction avec les canaux de type N (Minami et coll., 2001).

Enfin, la synthèse de chimères MVIIA-MVIIC par permutation d'une ou de plusieurs boucles a donné lieu à des résultats contradictoires : Kazuki Sato et son groupe ont

cystéines : 12 au total (voir **figure 50**). Des quatre sous-types qui ont été identifiés (A, B, C et D), seule ω -Aga-IIIa présente la particularité d'avoir une forte affinité ($IC_{50} < 1$ nM) aussi bien pour les canaux Ca^{2+} de type L que ceux de type N (Mintz et coll., 1991; Venema et coll., 1992; Ertel et coll., 1994). Le spectre d'activité de ω -Aga-IIIa s'est élargi avec la mise en évidence de sa capacité à déplacer I^{125} - ω -Aga-IVA (décrite ci-après), une toxine spécifique des canaux Ca^{2+} de type P (Mintz, 1994). Il a d'ailleurs été proposé que ω -Aga-IIIa interagisse avec tous ces types de canaux par l'intermédiaire d'un site commun localisé au niveau du vestibule externe de ces canaux (Yan et Adams, 2000). Malgré ce spectre d'activité particulier, la structure tridimensionnelle de ω -Aga-IIIa n'a pas encore été résolue et la surface fonctionnelle pour chaque type de canal n'est toujours pas connue.

iv Les ω -agatoxines IV

De plus grand intérêt car spécifiques des canaux Ca^{2+} de type P (Mintz et coll., 1992) et de plus faible affinité pour les canaux de type Q (Sidach et Mintz, 2000), les ω -Aga-IV sont composées de 48 résidus et s'architecturent autour de 4 ponts disulfures (voir **figure 51**). L'homologie entre la séquence des deux toxines les plus répandues, ω -Aga-IVA et ω -Aga-IVB, atteint 71%.

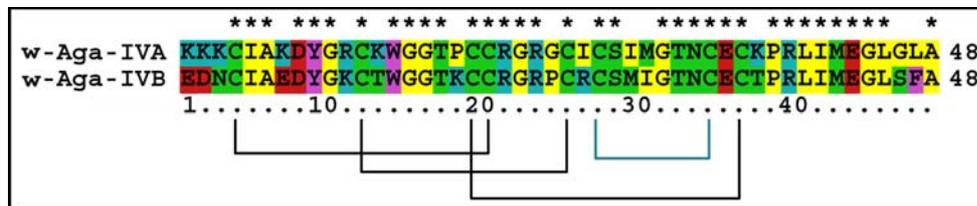


Figure 51 : alignement de séquence des ω -agatoxines IVA et IVB. Les astérisques (*) indiquent les résidus conservés et montrent que ces deux séquences sont hautement homologues. Code couleur : **vert** pour les résidus polaires, **bleu** pour les basiques, **jaunes** pour les aliphatiques, **violet** pour les aromatiques et **rouge** pour les acides. L'appariement des ponts disulfures est représenté : en **noir** pour les ponts disulfures du motif ICK et en **bleu** le pont supplémentaire.

La structure de ces deux toxines a été résolue : ω -Aga-IVA et ω -Aga-IVB sont très similaires et présentent les mêmes caractéristiques structurales, soit un repliement ICK classique duquel protrude une extrémité C-terminale, englobant les résidus 37 à 48, très mal définie (Adams et coll., 1993; Yu et coll., 1993; Reily et coll., 1994; Kim et coll., 1995a; Reily et coll., 1995). De plus, toutes les deux possèdent un pont disulfure supplémentaire C27-C34, n'intervenant pas dans le nœud de cystéines.

Malgré tous ces points communs, on observe une différence au niveau de la cinétique de l'interaction toxine/canal : ω -Aga-IVB bloque les canaux de type P 8 fois plus lentement que ω -Aga-IVA. L'analyse comparée des séquences montre que le segment contenant les résidus 1 à 7 diffère entre les deux toxines, notamment d'un point de vue

électrostatique : segment majoritairement cationique pour ω -Aga-IVA (KKKCIAK) et anionique pour ω -Aga-IVB (EDNCIAE). Le transfert du segment 1-7 de ω -Aga-IVB sur ω -Aga-IVA induit un ralentissement de la cinétique de blocage, rendant ce segment responsable de cette cinétique plus lente (Reily et coll., 1994).

c°) Les ω -atracotoxines

Les ω -atracotoxines (ω -ACTX) sont purifiées à partir du venin d'araignées du genre *Hadronyche* et *Atrax*, appartenant à la sous-famille des Atranicae (d'où découle le nom de ces toxines). Les ω -ACTX sont très étudiées car totalement spécifiques des canaux Ca^{2+} voltage-dépendants d'insecte et non actives sur les canaux Ca^{2+} de mammifères (Fletcher et coll., 1997b), les rendant très attractives pour la lutte contre les insectes devenus résistants aux pesticides chimiques.

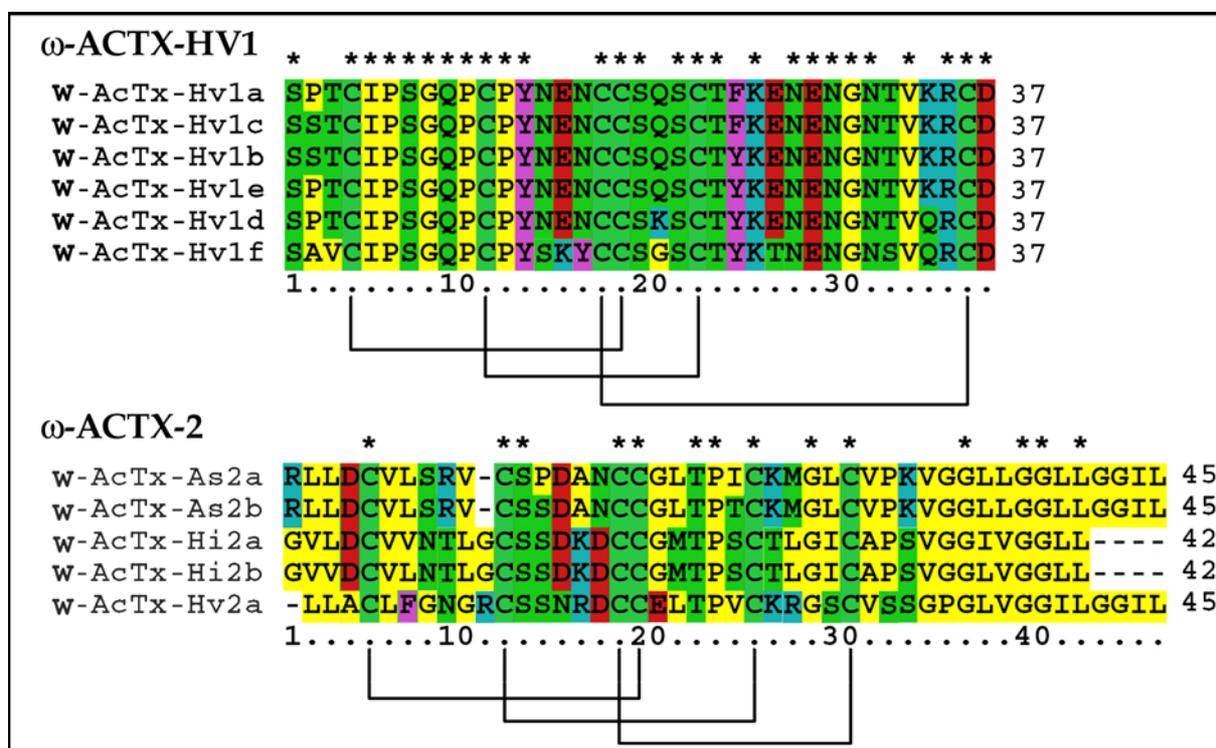


Figure 52 : alignement de séquence des ω -atracotoxines 1 et 2. Les astérisques (*) indiquent les résidus conservés et montrent que ces deux séquences sont hautement homologues. Code couleur : **vert** pour les résidus polaires, **bleu** pour les basiques, **jaunes** pour les aliphatiques, **violet** pour les aromatiques et **rouge** pour les acides. L'appariement des ponts disulfures est représenté

Composées de 36-37 résidus (**figure 52**), les ω -ACTX-1 partagent 75% d'homologie entre elles et la résolution de la structure de ω -ACTX-Hv1 (qui se nommera ω -ACTX-Hv1a après purification de plusieurs sous-types ω -ACTX-Hv1 par Wang et coll., 1999) a permis de mettre en évidence un feuillet β , plus long que celui observé pour les ω -conotoxines, qui émerge nettement du cœur hydrophobe de la molécule (Fletcher et coll., 1997b). Des

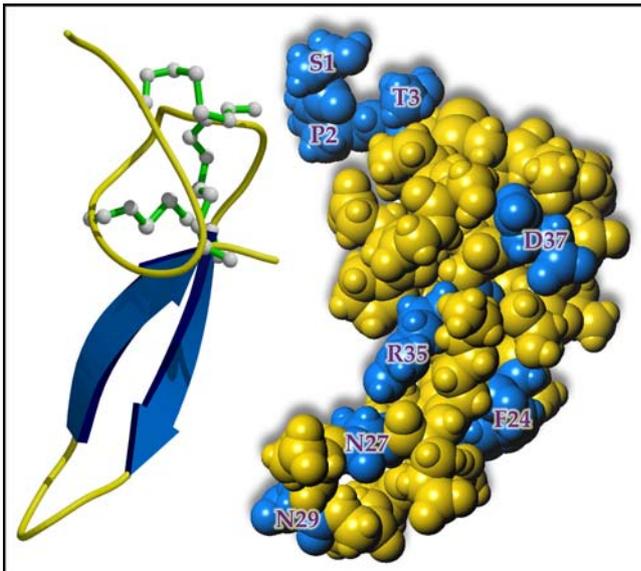


Figure 53 : Structure de ω -ACTX-HV1 et résidus impliqués dans l'interaction avec le canal. **A gauche** : la structure consiste en un cœur compact contenant le nœud de cystéines duquel émerge le feuillet β . **A droite** : en gardant la même orientation que précédemment, les résidus importants pour l'activité de la toxine sont colorés en **bleu**.

expériences de mutagenèse dirigée ont permis de proposer les résidus importants pour l'activité de la toxine (voir **figure 53**) : Y/F24, N29, N27, R35 et D37 (Wang et coll., 1999; Tedford et coll., 2001) ainsi que les résidus 1 à 3 bien que cette région soit particulièrement mal définie dans la structure RMN de ω -ACTX-Hv1a (Wang et coll., 1999).

Toutefois, une nouvelle famille de ω -ACTX a été caractérisée : les ω -ACTX-2, plus longues et peu homologues en séquence à la première famille (45 résidus, voir **figure 52**). La différence majeure entre les séquences des deux familles réside dans le fait que la boucle 4 est composée de 13

résidus pour les ω -ACTX-1 contre 4 résidus pour les ω -ACTX-2. Cette boucle 4 plus courte se trouvant compensée par un long segment C-terminal composé par la triple répétition de la séquence $(^G/P)G(^L/I)(^L/V)$. La résolution de la structure d'un membre de cette famille, ω -ACTX-Hv2a, met en évidence un cœur structural compact très bien défini de type ICK (avec toutefois la présence d'un segment d'hélice α) duquel le segment C-terminal, non contraint mais indispensable pour l'activité de la toxine, émerge (Wang et coll., 2001). Les auteurs ont proposé de façon plutôt audacieuse que ce segment lipophile permettrait d'ancrer la toxine au niveau de la membrane alors que le motif structural classique interagirait avec le canal.

d°) La maurocalcine

La résolution de la structure de cette toxine a permis de mettre en évidence pour la première fois un repliement de type ICK pour une toxine extraite du venin d'un scorpion, *Scorpio maurus* (Mosbah et coll., 2000). La maurocalcine (Mca) est active sur les canaux Ca^{2+} sensibles à la ryanodine (Fajloun et coll., 2000b) et comporte un nombre importants de résidus basiques (11 au total) qui pourraient interagir avec des résidus acides du canal, reconnaissance qui serait ainsi essentiellement gouvernée par des interactions électrostatiques (Samsou et coll., 1999).

3 Les toxines actives sur les canaux potassium

Comparativement aux toxines se reliant suivant le motif actives sur les canaux Ca^{2+} , peu de toxines actives sur les canaux K^+ ont été caractérisées. La **figure 54** présente la séquence des hanatoxines (HaTx), des hétéropodatoxines (HpTx) et de la kappa-conotoxine PVIIA.

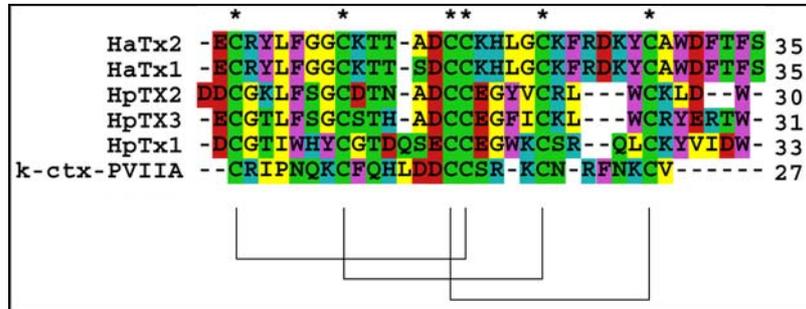


Figure 54 : aligment de séquence des toxines actives sur les canaux K^+ . Code couleur : **vert** pour les résidus polaires, **bleu** pour les basiques, **jaunes** pour les aliphatiques, **violet** pour les aromatiques et **rouge** pour les acides. Les astérisques (*) indiquent les résidus conservés. L'appariement des ponts disulfures est représenté.

a°) Kappa-conotoxine PVIIA

Composée de 27 résidus, la κ -PVIIA a été caractérisée pour sa capacité à inhiber les canaux K^+ voltage-dépendants de type *shaker* (Terlau et coll., 1996a; Shon et coll., 1998; Naranjo, 2002). Tout comme la charybdotoxine, κ -PVIIA interagit au niveau de la région du pore mais la fixation doit être différente puisque le mutant F425G du canal *shaker* augmente l'affinité de la charybdotoxine et diminue dramatiquement celle de la κ -

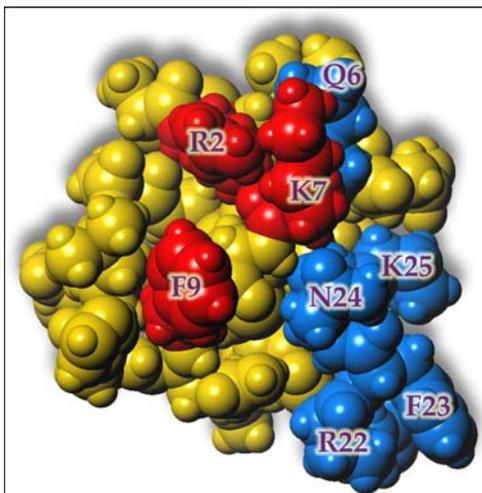


Figure 55 : Carte fonctionnelle de PVIIA déterminée par *alanine scanning*. Les résidus en **rouge** sont critiques pour l'interaction et ceux colorés en **bleu** sont également important, mais de moindre influence sur l'activité de la toxine.

PVIIA (Shon et coll., 1998). La résolution de la structure de cette toxine, isolée à partir du venin du cône marin *Conus purpurascens*, a pour la première fois mis en évidence une toxine s'organisant autour du motif ICK dont la cible naturelle est un canal K^+ (Scanlon et coll., 1997; Savarin et coll., 1998). Les deux équipes ayant publié la structure de PVIIA ont proposé des surfaces d'interaction différentes en se basant sur des considérations structurales. Scanlon et coll. ont proposé K19 comme étant le résidu critique par analogie à la Charybdotoxine (Scanlon et coll., 1997) ; Savarin et coll. proposent K7 et F9 comme dyade capitale à l'interaction, en rejetant K19, car trop proche de résidus acides qui perturberaient

la reconnaissance, et K25, car trop peu accessible pour pouvoir plonger dans le filtre de sélectivité du canal (Savarin et coll., 1998). Les résultats de l'alanine scanning pratiqué sur PVIIA montrent que R2, K7 et F9 sont critiques pour l'interaction avec le canal et que Q6, R22, F23, N24 et K25 influent sur la fixation de PVIIA sur sa cible (Jacobsen et coll., 2000) (**figure 55**).

b°) Les hanatoxines

Les deux toxines caractérisées (HaTx1 et HaTx2) sont composées de 35 résidus (4.1 kDa) et ne diffèrent entre elles que par la substitution d'une sérine (HaTx1) par une alanine (HaTx2) en position 13. Les HaTx sont actives sur les canaux $K_{v2.1}$ et $K_{v4.2}$ (Swartz et MacKinnon, 1995) et interagiraient non pas en occluant physiquement le pore, mais plutôt en altérant les propriétés d'ouverture de ces canaux voltage-dépendants (Swartz et MacKinnon, 1997b, 1997a; Li-Smerin et Swartz, 2000).

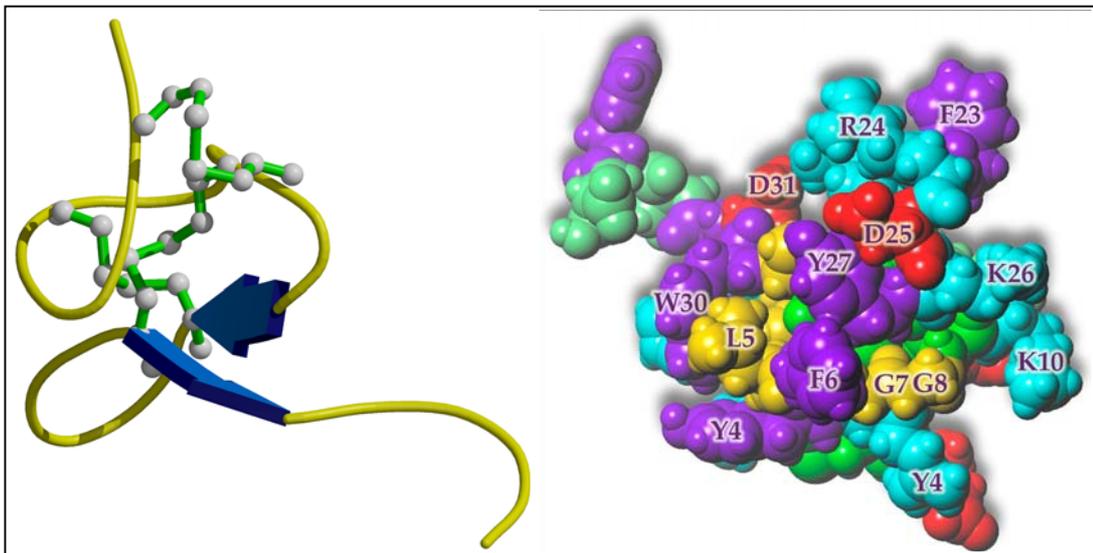


Figure 56 : Représentation de la structure de l'hanatoxine (**à gauche**) et de la surface d'interaction putative proposée, centrée autour des résidus F6 et L5 (**à droite**).

La structure de HaTx1 a été résolue (**figure 56**) et montre que le motif comporte un feuillet β à deux brins antiparallèles au lieu des trois rencontrés dans la majorité des ICK (Takahashi et coll., 2000). La comparaison avec d'autres toxines altérant les propriétés d'ouverture des canaux Na^+ et Ca^{2+} voltage-dépendants indique que la combinaison d'une région hydrophobe et de résidus basiques est responsable de la fixation de ces toxines sur ces canaux voltage-dépendants (Li-Smerin et Swartz, 2000; Takahashi et coll., 2000; Li-Smerin et Swartz, 2001).

c°) Les hétéropodatoxines

Ces toxines (HpTx) sont secrétées par l'araignée *Heteropoda venatoria*, araignée qui ne tisse pas de toile mais chasse ses proies à même le sol en les paralysant avec son

venin. Composées de 30 à 33 résidus, les trois HpTx mises en évidence sont actives spécifiquement sur les canaux K^+ voltage-dépendants de type $K_{V4.2}$ du tissu cardiaque (Sanguinetti et coll., 1997). Les HpTx sont homologues en séquence aux HaTx à hauteur de 40%, laissant supposer qu'elles adoptent le même repliement dans l'espace et peut être partagent elles le même site de fixation sur les canaux $K_{V4.2}$.

d°) Les phrixotoxines

Isolées à partir du venin de la tarentule *Phrixotrichus auratus*, les deux phrixotoxines (PaTx) caractérisées, PaTx1 et PaTx2, sont composées de 29 et 31 résidus respectivement. Ces toxines sont totalement spécifiques et très affines des canaux K^+ voltage-dépendants de type $K_{V4.2}$ et $K_{V4.3}$ (aucune activité sur les K_{V1} , K_{V2} ou K_{V3}). PaTx1 a plus d'affinité pour ces canaux que PaTx2 (IC_{50} de 5 nM et 34 nM respectivement) bien que la séquence de ces deux toxines ne diffère qu'en deux positions (11-SA-12 chez PaTx1 remplacé par 11-EE-12 PaTx2) avec rajout de deux résidus en C-terminal pour PaTx2 (Diochot et coll., 1999). Ces toxines altèrent les propriétés d'ouverture de ces canaux et pourraient ainsi interagir avec le canal de façon analogue au modèle décrit pour l'hanatoxine, soit la combinaison d'une région hydrophobe et de résidus basiques (Li-Smerin et Swartz, 2000; Takahashi et coll., 2000; Li-Smerin et Swartz, 2001).

4 Les toxines actives sur les canaux sodium

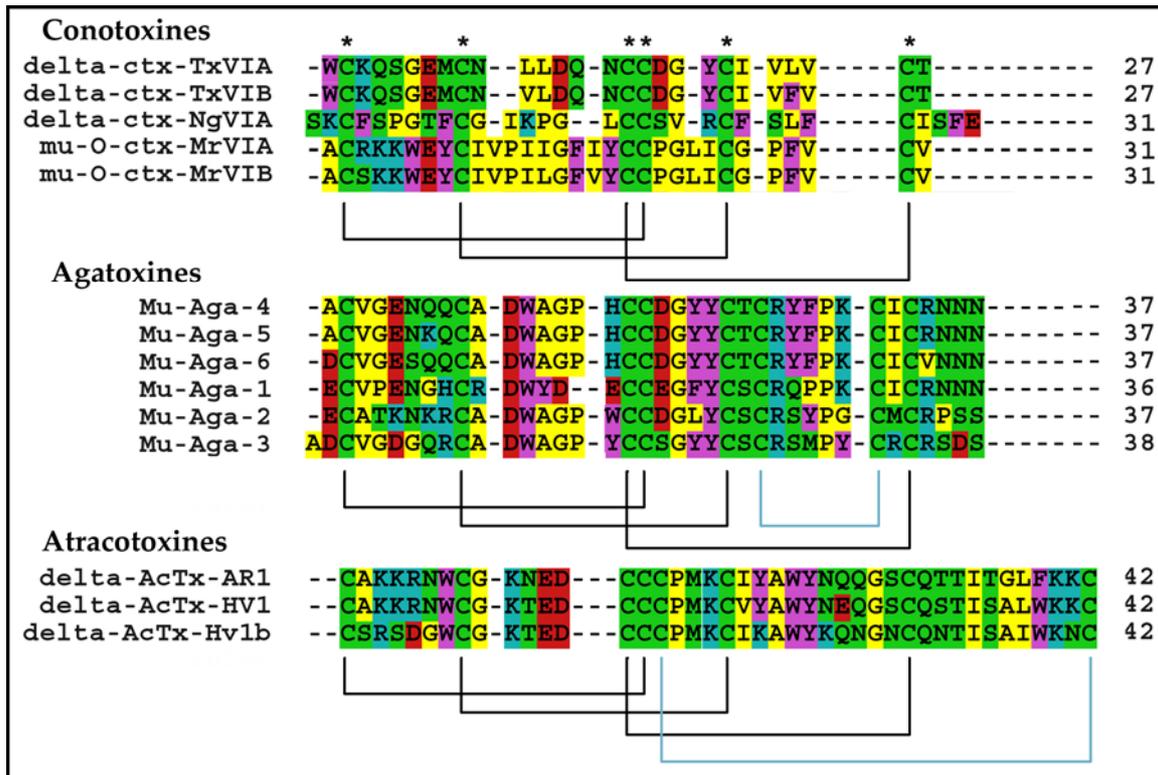


Figure 57 : Alignement de séquences des conotoxines et des toxines d'araignées actives sur les canaux Na⁺. Code couleur : **vert** pour les résidus polaires, **bleu** pour les basiques, **jaunes** pour les aliphatiques, **violet** pour les aromatiques et **rouge** pour les acides. Les astérisques (*) indiquent les résidus conservés. L'appariement des ponts disulfures est représenté : en **noir** pour les ponts disulfures du motif ICK et en **bleu** le pont supplémentaire.

a°) Les conotoxines

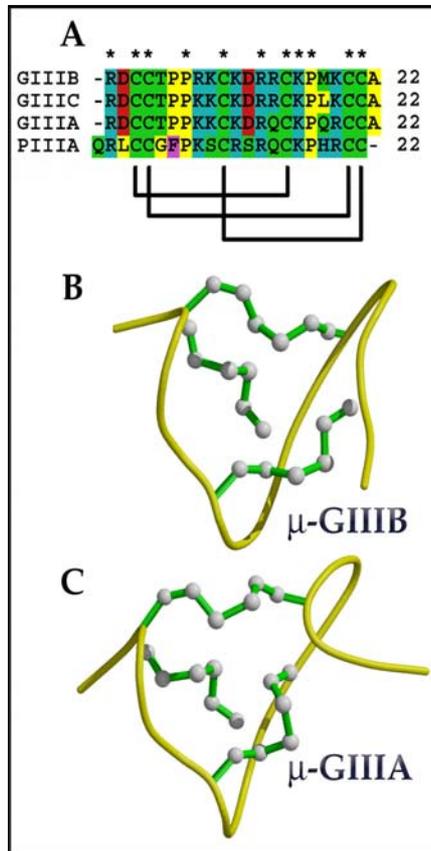
i Les μ O-conotoxines

En ce qui concerne les μ O-conotoxines (μ O-CTX), seuls deux membres de cette famille ont été caractérisés : MrVIA et MrVIB qui sont présentes dans le venin du cône marin *Conus marmoreus* (Fainzilber et coll., 1995b; McIntosh et coll., 1995). Composées de 31 résidus (**figure 57**), ces toxines ne sont pas compétitives de la saxitoxine (STX) et n'interagissent donc pas au niveau du site récepteur 1 du canal Na⁺ (Terlau et coll., 1996b). Ni structure ni information sur les résidus impliqués dans la fixation de la toxine n'ont encore été rapportées.

Les μ O-conotoxines ne doivent surtout pas être confondues avec les μ -conotoxines (μ -CTX). En effet, tout comme les μ O-CTX, les μ -CTX sont purifiées à partir du venin de cônes marins et sont actives sur les canaux Na⁺. Mais par contre, les μ -CTX s'architecturent autour d'un motif structural différent du motif ICK. Plus courtes, elles

ont un arrangement particulier de leur 6 cystéines tout en conservant l'appariement des ponts typique des ICK sans qu'il y ait formation du nœud de cystéines (voir **figure 58**).

Les deux représentants les plus connus sont μ -GIIIA et μ -GIIIB : composées de 22 résidus, leur structure a été résolue (Wakamatsu et coll., 1992; Hill et coll., 1996) et leur



site d'interaction sur le canal a été localisé sur le site récepteur 1, correspondant à une occlusion directe du pore (Moczydlowski et coll., 1986a; Yanagawa et coll., 1986, 1987) mais site légèrement différent de celui de la tetrodotoxine (TTX) puisqu'un canal rendu résistant à la TTX reste sensible aux μ -CTX (Stephan et coll., 1994). Leur carte fonctionnelle a été établie et implique le résidu R13 comme critique pour l'occlusion du pore (Sato et coll., 1991; Chang et coll., 1998; Nakamura et coll., 2001) et les résidus R1, Q14, K16 et Hyp-17 (hydroxyproline) comme périphérique à l'arginine centrale (Dudley et coll., 2000).

Figure 58 : (A) Séquence des μ -conotoxines : Code couleur : **vert** pour les résidus polaires, **bleu** pour les basiques, **jaunes** pour les aliphatiques, **violet** pour les aromatiques et **rouge** pour les acides. L'organisation des cystéines **..CC...C..C..CC..** et l'appariement des ponts disulfures est représenté. Les astérisques (*) indiquent les résidus conservés. (B) et (C) structure de μ -GIIIA et μ -GIIIB.

ii Les δ -conotoxines

Les premiers peptides caractérisés comme appartenant à cette famille ont été extraits du venin de cônes marins chasseurs de mollusques (Hillyard et coll., 1989; Fainzilber et coll., 1991; Hasson et coll., 1993; Shon et coll., 1994; Hasson et coll., 1995a; Hasson et coll., 1995b). Les δ -conotoxines sont composées de 27 à 32 résidus (voir **figure 57**) et inhibent l'inactivation des canaux Na^+ voltage-dépendants (Hasson et coll., 1993; Hasson et coll., 1995a). Des toxines extraites de cônes chasseurs de poissons ont ensuite été caractérisées (Fainzilber et coll., 1995a; Shon et coll., 1995). Aujourd'hui, une dizaine de ces toxines ont été caractérisées. Il est à noter qu'une forte similitude de séquence est partagée entre toxines extraites de cônes chasseurs de poissons, notamment la stricte conservation du segment 9-FCGIHOGGLCCS-19.

Le rôle d'une de ces toxines dans la stratégie de capture de la proie a été élucidé pour le cône *Conus purpurascens* (Terlau et coll., 1996a) : C'est en fait la combinaison de la δ -conotoxine PVIA et de la κ -conotoxine PVIIA (inhibiteur de canaux K^+) qui provoque

l'apparition de trains de potentiels d'action responsables de paralysie de la proie. L'étude de mutants de PVIA montre que les résidus strictement conservés F9 et I12 sont capitaux pour l'activité (Bulaj et coll., 2001).

C'est le comportement de la δ -conotoxine TxVIA qui a permis d'identifier le site d'interaction des δ -conotoxines sur le canal Na^+ . Cette toxine est hautement active sur les mollusques et bien que sa toxicité soit très réduite sur les vertébrés, TxVIA se fixe aussi bien pour les canaux Na^+ du système nerveux central de mollusques et de rats avec une forte affinité (Fainzilber et coll., 1994). TxVIA induit une prolongation marquée du potentiel d'action, résultat d'une inhibition spécifique de l'inactivation des canaux Na^+ (Hasson et coll., 1993). Bien que TxVIA provoque les mêmes effets physiologiques que les toxines α de scorpion, interagissant au niveau du site 3 du canal, sa fixation est indépendante du potentiel de membrane. De plus, Sa fixation est modulée par d'autres toxines se liant sur des sites différents du site 3. Tout ceci a permis de proposer un nouveau site d'interaction sur le canal : le site récepteur 6, qui n'a toujours pas été identifié sur le canal (Fainzilber et coll., 1994). La structure de la δ -CTx-TxVIA, qui vient tout juste d'être résolue par RMN (Kohno et coll., 2002), s'organise autour du repliement classique des ICK mais les résidus importants ne sont pas encore identifiés (**figure 59**).

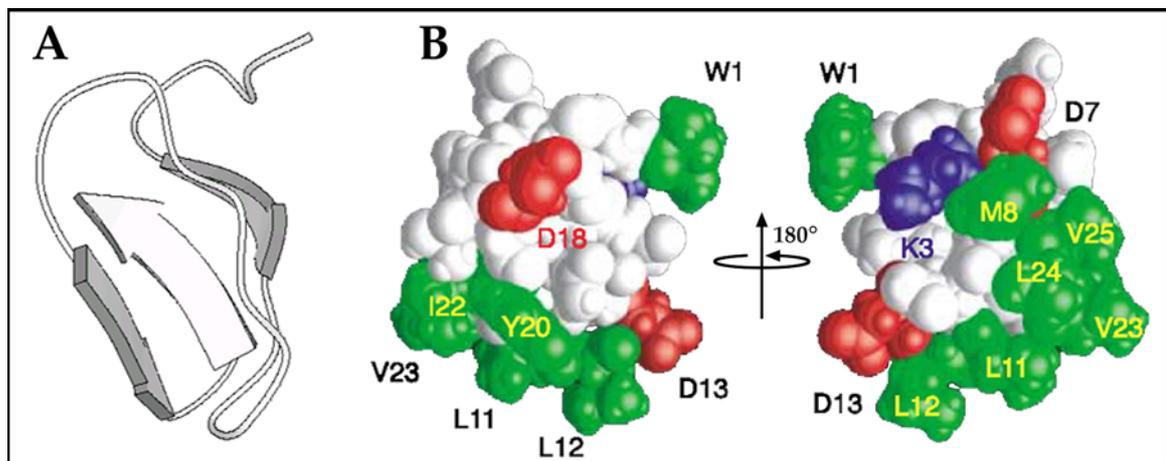


Figure 59 : Les coordonnées atomiques (code PDB : 1FU3) n'étant pas encore accessibles, les figures sont extraites de la publication. **(A)** Représentation de la structure de la δ -CTx-TxVIA **(B)** répartition des résidus acides (**en rouge**), du seul résidu basique de la toxine (**en bleu**, K3) et des résidus hydrophobes (**en vert**) à noter qu'une méthionine est notée comme étant hydrophobe alors que ce résidu est polaire.

b°) Les μ -agatoxines

La découverte des μ -agatoxines dans le venin de l'araignée américaine *Agelenopsis aperta*, les premières toxines d'araignées actives sur les canaux Na^+ , est relativement récente (Adams et coll., 1989; Skinner et coll., 1989). Les μ -agatoxines sont constituées de 36 à 37 résidus dont 8 cystéines permettant la réticulation de 4 ponts disulfures (voir **figure 57**). Ces toxines augmentent le flux d'ions Na^+ à travers la membrane, et ont

toutes un mode d'action commun, similaire à celui des toxines α de scorpion ou d'anémones de mer : elles inhibent l'inactivation des canaux Na^+ (Adams et coll., 1989). Un seul représentant de cette famille a vu sa structure résolue expérimentalement : la structure μ -Agatoxine-I (μ -Aga-I), à partir de laquelle la structure de μ -Agatoxine-IV a été modélisée (Omeckinsky et coll., 1996). μ -Aga-I est composée de 36 résidus et son extrémité C-terminale est amidée ; Sa structure consiste en un feuillet β à trois brins englobant les résidus 7-9, 20-24 et 30-34, repliement ICK typique. Aucune information sur les résidus impliqués dans l'interaction avec le canal n'est aujourd'hui disponible.

c°) Les δ -atracotoxines

Les δ -atracotoxines ont été caractérisées dans le venin des araignées *Hadronyche versuta* et *Atrax robustus* pour leur toxicité envers les primates et les souris (Mylecharane et coll., 1989; Nicholson et coll., 1994). La robustoxine (δ -atracotoxin-Ar1 ; δ -ACTX-Ar1) et la versutoxine (δ -atracotoxin-Hv1 ; δ -ACTX-Hv1) sont composées de 42 résidus, dont 8 cystéines permettant l'appariement de 4 ponts disulfures, et partagent 83% d'identité de séquence (Sheumack et coll., 1985; Yatani et coll., 1988). Leurs séquences ont la particularité de contenir 3 cystéines successives (14-15-16) (**figure 57**). Les dernières données électrophysiologiques publiées concernent δ -ACTX-Hv1 (désormais désignée comme δ -ACTX-Hv1a depuis la caractérisation du variant Hv1b). Les résultats indiquent que δ -ACTX-Hv1 est hautement active sur les canaux Na^+ d'insectes ($K_d = 0.42$ nM) et montre une sensibilité à l'état de polarisation de la membrane de synaptosomes de rats : K_d de 6.5 et 0.6 nM aux potentiels membranaires de 0 et -55 mV respectivement (Gilles et coll., 2002). L'analyse de l'effet électrophysiologique de ces toxines montre clairement que δ -ACTX-Hv1 et δ -ACTX-Ar1 inhibent l'inactivation des canaux Na^+ de façon similaire aux toxines α de scorpions, indiquant peut-être un même site d'interaction : le site récepteur 3 du canal Na^+ (Nicholson et coll., 1994; Nicholson et coll., 1996; Nicholson et coll., 1998). Cette hypothèse est renforcée par le fait que δ -ACTX-Hv1 est compétitive de AaH II (sur les cerveaux de rats) et Lqh α IT (sur synaptosomes de cafards), deux toxines α se fixant sur le site récepteur 3 (données non publiées mais rapportées par Fletcher et coll., 1997a).

La structure de δ -ACTX-Hv1, déterminée par RMN, consiste en un cœur compact où est présent un feuillet β à trois brins comprenant les résidus 6-7, 18-21, 30-33. De ce cœur compact, classiquement rencontré dans le motif ICK, émerge très nettement la boucle 22-29. Enfin, les résidus 35-41 s'organisent en hélice 3_{10} ancrée au cœur compact par l'intermédiaire du pont disulfure supplémentaire ne participant pas au motif ICK (Fletcher et coll., 1997a).

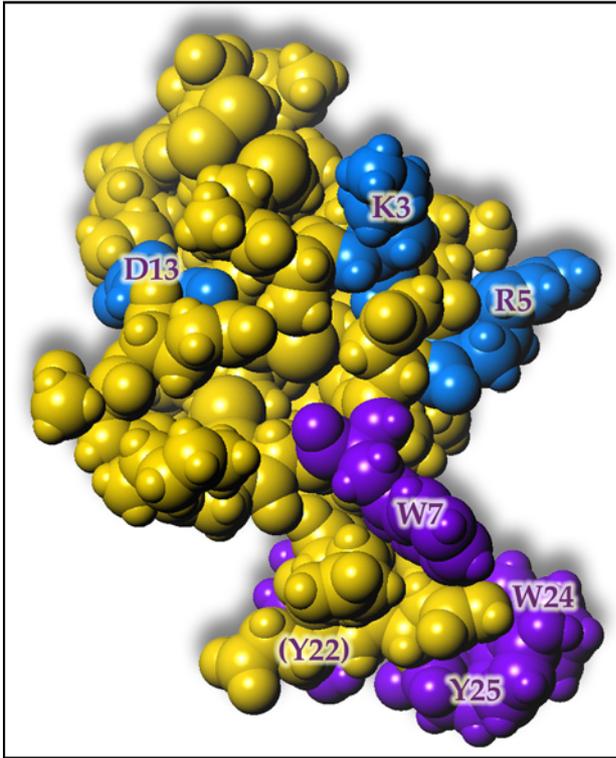


Figure 60 : (en bleu) Mise en évidence des deux résidus basiques, K3 et R5, et du résidu basique, D13, proposés comme interagissant avec les résidus du canal E1616, E1613 et K1617 respectivement. (en violet) Résidus aromatiques conservés, (Y22) se trouve de l'autre côté de la surface de la δ -ACTX-Hv1.

et (D8)/D13-K1617 (voir **figure 60**). Enfin, on note la présence d'un *patch* de résidus aromatiques (W7, W23 et Y24), résidus strictement conservés dans δ -ACTX-Ar1 (Fletcher et coll., 1997a).

Certains résidus du site récepteur 3 du canal Na^+ ont été identifiés comme cruciaux pour la fixation des toxines en ce site (Rogers et coll., 1996): les résidus incriminés sont chargés (E1613, E1616 et K1617), ceci étant consistant avec les résidus chargés caractérisés comme important chez les toxines. De plus, la superposition de la structure d'Aah II et de δ -ACTX-Hv1 permet de retrouver des surfaces très analogues : ainsi les résidus K2, K58 et D8 d'AaH II deviennent R5, K3 et D13 chez δ -ACTX-Hv1. D'ailleurs, les auteurs proposent que le *cluster* comprenant deux résidus basiques et un

acide interagisse avec leurs complémentaires électrostatiques sur le canal, soient les interactions ((AaH II)/ δ -ACTX-Hv1-canal) suivantes : (K2)/R5-E1613, (K58)/K3-E1616

III L'anisotropie de répartition des charges

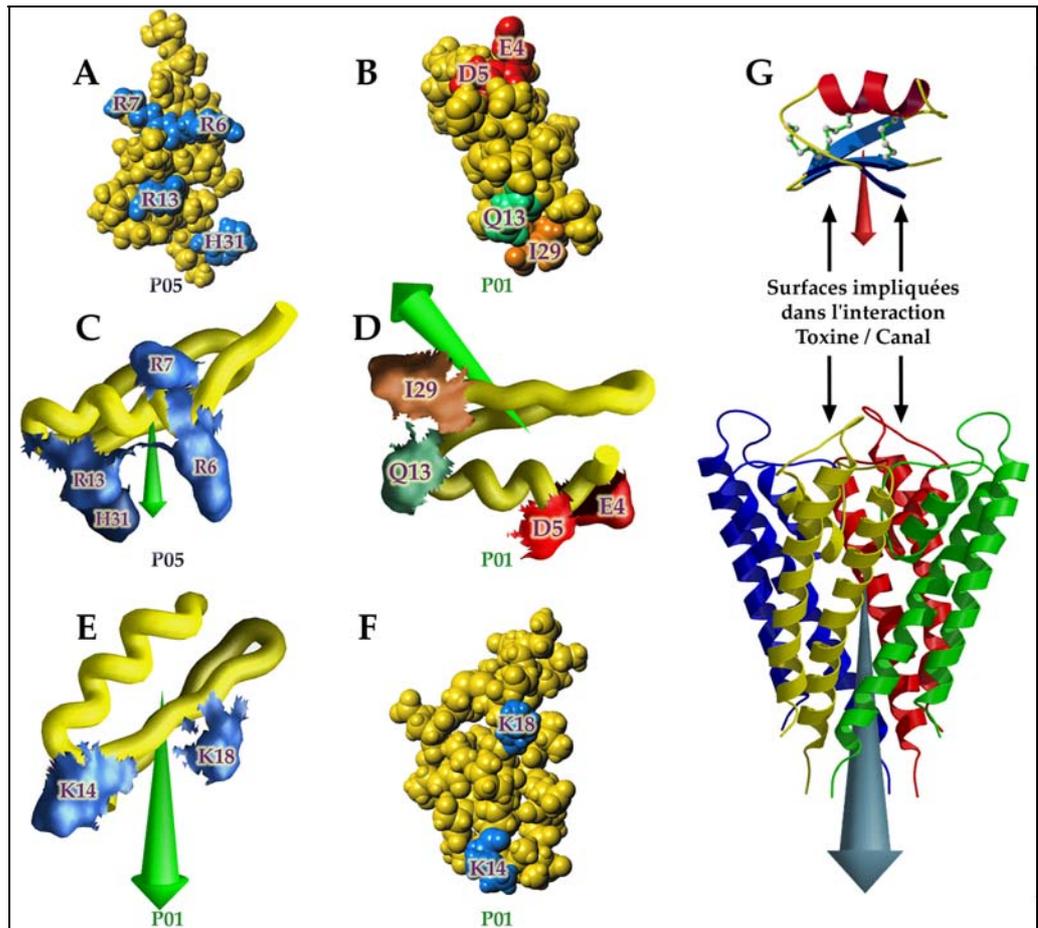
Les toxines de scorpion contiennent un certain nombre de résidus chargés positivement (basiques) ou négativement (acides). La résolution de la structure de ces toxines a permis de mettre en évidence le caractère amphiphile de ces peptides, c'est à dire que l'on observe dans la structure tridimensionnelle un regroupement des résidus basiques sur une face donnée de la toxine et des résidus acides sur la face opposée. Cette répartition hétérogène des charges, ou anisotropie de charge électrostatique, polarise fortement la molécule. Restait à mettre en évidence l'influence de cette anisotropie de charge électrostatique sur l'efficacité de la reconnaissance entre la toxine et sa cible.

1 Description du modèle

L'hypothèse de départ a été échaudée à partir de l'activité de P01, une toxine de scorpion faiblement active sur les canaux K^+ de type SK. Sa séquence de 29 résidus diverge de celle de P05 et de la LTX, deux toxines hautement spécifiques du canal SK (Castle et Strong, 1986; Chicchi et coll., 1988; Zerrouk et coll., 1993). Les résidus R6, R7 et H31 ont été soulignés comme importants pour l'activité de P05 (Sabatier et coll., 1994; Inisan et coll., 1995) et LTX (Sabatier et coll., 1994), ces toxines interagissant avec le canal suivant la surface moléculaire portée par l'hélice α . Les résidus correspondants dans P01 sont E4, D5 et I29. Malgré ces différences, P01 présente une activité résiduelle à l'encontre des canaux SK.

L'anisotropie de charge électrostatique trouve sa résultante dans l'existence du moment dipolaire. Le moment dipolaire calculé pour P05 et LTX émerge par la surface portée par l'hélice, alors que pour P01 il émerge par la surface portée par le feuillet (Fremont et coll., 1997). L'orientation du dipôle dans P01 a permis aux auteurs de proposer la dyade K18-K14 portée par le feuillet, et qui expliquerait cette activité résiduelle de P01 envers le canal SK (la mise en évidence de l'influence de l'anisotropie des charges électrostatiques sur l'activité des toxines envers les canaux K^+ est décrite en détail dans la **figure 61**).

Figure 61 : mise en évidence de l'influence de l'anisotropie des charges électrostatiques sur l'activité des toxines envers les canaux K⁺. Si les résidus de la carte fonctionnelle de P05 (**A**) sont reportés sur P01, en lieu et place de R6, R7, R13 et H31 sur P05, on trouve E4, D5, Q13 et I29 sur P01 qui présente tout de même une faible activité (**B**). Le dipôle calculé pour P05 (**C**) émerge à travers la surface moléculaire portant les résidus importants pour son activité. Si on oriente P01 de façon similaire à P05 (**D**), le dipôle émerge à travers la surface opposée. Pour une meilleure visualisation, P01 en (**D**) est orientée de façon légèrement différente par rapport à P05 en (**C**).



En analysant dans P01 les résidus portés par la surface moléculaire par laquelle émerge le dipôle, K14 et K18 sont les seuls résidus qui peuvent potentiellement interagir avec le canal (**E**) et sont reportés sur la surface fonctionnelle ainsi proposée (**F**). Le modèle ainsi décrit peut être généralisé (**G**) : le dipôle intervient dans l'orientation de la toxine pour que celle-ci présente sa surface fonctionnelle au niveau du site d'interaction situé sur le canal. La toxine s'oriente vis à vis du dipôle propre au canal.

Afin de vérifier cette hypothèse, les auteurs ont analysé le comportement pharmacologique d'un analogue électrostatique de l'ibériotoxine, toxine hautement spécifique envers les canaux K⁺ de grande conductance activés par le calcium (BK) qui interagit via la surface portée par le feuillet β . La mutation envisagée est celle de D19, résidu à porté par l'hélice et se trouvant donc à l'opposé de la surface d'interaction (voir **figure 62**). L'analogue D19R bloque efficacement les canaux BK. Les durées moyennes de temps de blocage se répartissent en deux populations distinctes : des temps de blocage longs (plus de 200 s) similaires à ceux produits par la toxine native, et des temps de blocage beaucoup plus courts (7.6 s) jamais observés avec la toxine native. Cette dualité dans les temps de blocage suggère que l'analogue bloque les canaux BK selon un mécanisme différent de celui suivi par la toxine native.

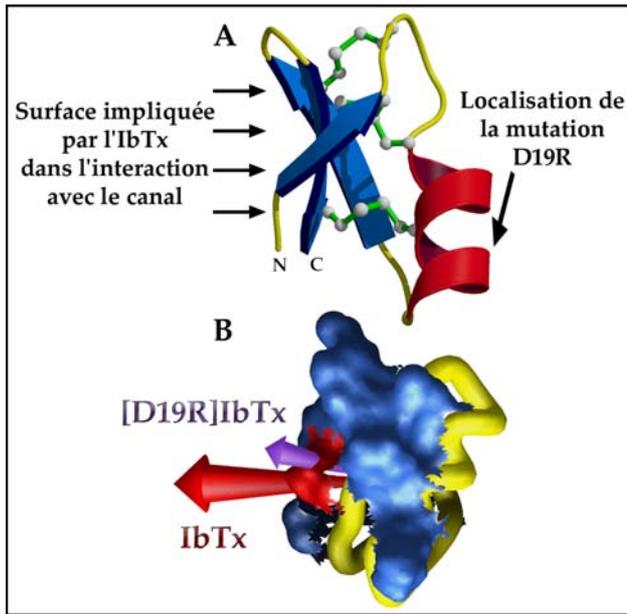


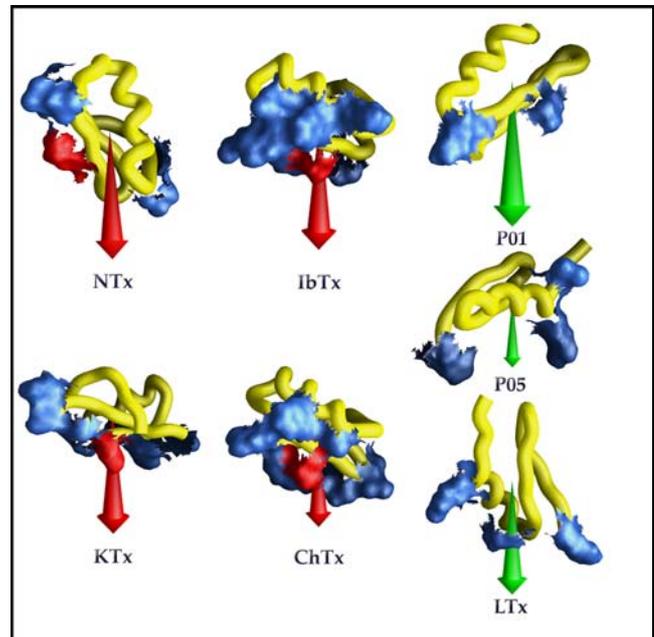
figure 62 : La mutation D19R intervient à l'opposé de la surface fonctionnelle de l'IbTx **(A)**. comparaison des dipôles de l'IbTx native et du mutant D19R **(B)**.

La comparaison des dipôles de la toxine native et de son analogue (**figure 62**) montre une variation d'orientation entre les deux, avec une plus faible polarité pour l'analogue du fait de la soustraction d'une charge négative côté hélice (Fremont et coll., 1997). Ces résultats indiquent que l'orientation du moment dipolaire peut influencer sur l'interaction des toxines de scorpion interagissant au niveau du pore des canaux potassium.

2 L'extension du modèle

Le résultat du calcul du moment dipolaire des toxines courtes de scorpion architecturées autour du motif $C\alpha\beta$ actives sur les canaux K_v , BK et SK est en accord avec les cartes fonctionnelles définies pour celles-ci (**figure 63**).

Figure 63 : Représentation du dipôle de différentes toxines de scorpion actives sur les canaux Potassium. Les **dipôles** colorés en **vert** indiquent les toxines qui interagissent avec le canal via la surface portée par l'hélice (sauf P01, comme décrit précédemment) et les **dipôles** colorés en **rouge** montrent les toxines qui interagissent avec le canal via la surface portée par le feuillet. Les résidus importants pour l'interaction sont en **bleu**, et en **rouge** figure la lysine critique qui occlue physiquement le pore de conduction du canal.



L'application du calcul du moment dipolaire aux autres toxines (toxines adoptant le motif structural ICK) sera abordé dans la discussion des résultats.

IV Résolution de la structure des toxines par RMN

Seuls quelques noyaux sont capables de donner des signaux RMN simples, ce sont les atomes d'hydrogène ^1H , de carbone ^{13}C , d'azote ^{15}N et de phosphore ^{31}P . Les seuls présents, naturellement, en grande quantité dans les molécules organiques sont l'hydrogène et le phosphore ; le ^{13}C et le ^{15}N , étant des isotopes rares des atomes ^{12}C et ^{14}N , doivent être apportés artificiellement pour être utilisés en RMN hétéronucléaire.

Pour les protéines, l'étude par RMN mono-dimensionnelle du proton est insuffisante. Le chevauchement des signaux résultant du trop grand nombre de protons ne permet pas d'identifier clairement les pics observés, on utilise alors la RMN bidimensionnelle. La deuxième dimension est créée en appliquant une deuxième impulsion électromagnétique avant que les protons n'aient fini de relaxer à la suite de la première impulsion, le temps séparant les deux impulsions étant incrémenté au fur et à mesure de l'enregistrement.

1 Les séquences d'impulsion

Les expériences de RMN homonucléaire à deux dimensions permettent de visualiser les couplages entre protons. Il existe différents types d'expériences, nous pouvons citer celles qui sont principalement utilisées :

L'expérience COSY (COrrélation SpectroscopY) permet le transfert d'aimantation via les nuages électroniques de la liaison covalente (couplage scalaire). Le couplage scalaire est un des effets les plus connus de la RMN puisqu'il est responsable des structures fines des raies spectrales. La constante de couplage permet d'appréhender quantitativement la manière dont le transfert est effectué. Cette constante de couplage est liée à la géométrie des liaisons covalentes impliquées, décrite par une fonction qui, dans le cas de l'angle dièdre ϕ d'un acide aminé, est de la forme :

$${}^3J_{\text{HN-H}\alpha} = 1.9 - 1.4\cos(\phi) + 6.4\cos^2(\phi)$$

(${}^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ étant la constante de couplage entre le proton amide et le proton α du même résidu)

L'expérience TOCSY (TOtal COrrélation SpectroscopY) permet un transfert de cohérence de type scalaire par relais. On obtient une corrélation entre deux spins non directement couplés pourvu que les deux soient couplés à un même troisième spin (**figure 64**).

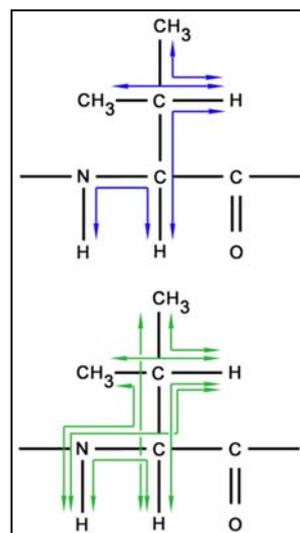


Figure 64 : Vision des couplages inter-protons observés sur un spectre COSY (**en bleu, en haut**) et TOCSY (**en bas, en vert**).

L'expérience de type NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) permet d'obtenir le transfert d'aimantation entre deux noyaux en interaction dipolaire. Le transfert se fait par le voisinage spatial (dans la limite de 5Å). Cette expérience nécessite un temps de mélange (τ_m) pendant lequel le couplage dipolaire s'exprime sous la forme de nOe (nuclear Overhauser effect).

2 Attribution des spectres et détermination de la structure

a°) Système de spin

Le couplage scalaire est fonction de l'angle de torsion et du nombre de liaisons entre deux protons : au-delà de trois liaisons le couplage devient trop faible pour être visible. Les acides aminés d'une protéine sont liés par une liaison peptidique, séparant ainsi le proton $H\alpha_i$ du proton HN_{i+1} par quatre liaisons, ce qui interdit le couplage scalaire au travers de la liaison peptidique. Un ensemble de protons couplés de façon scalaire définit un système de spins, un acide aminé peut aussi être décrit par un ou deux systèmes de spins. L'attribution des spectres COSY et TOCSY nous permet donc de déterminer l'ensemble des résonances des protons d'un résidu : le système de spins (voir **figure 65**). Il existe cependant des ambiguïtés dans la mesure où des acides aminés différents peuvent être représentés par un même système de spins :

Les AMX : ce groupe comprend les résidus sérine, cystéine, aspartate, asparagine et la chaîne aliphatique de l'histidine et des résidus aromatiques phénylalanine, tyrosine et tryptophane.

Les AMPX : ce groupe comprend les résidus glutamate, glutamine et méthionine.

Certains acides aminés sont décrits par deux systèmes de spins (acides aminés aromatiques).

b°) Attribution des spectres

La méthode la plus couramment utilisée pour l'attribution des spectres bidimensionnels du proton a été mise au point par K. Wüthrich. La première étape de cette méthode est l'attribution des systèmes de spins, c'est à dire la description individuelle de chaque acide aminé en terme de couplages scalaires. Le pic de corrélation $H\alpha$ -HN est repéré sur le spectre COSY et la chaîne latérale correspondante est identifiée grâce au spectre TOCSY (figure 16). L'étape suivante est la détermination des couplages dipolaires inter-résidus et, en particulier, séquentielles (corrélations (i-i+1)) qui vont permettre d'assembler les systèmes de spins entre eux. On utilise les proximités spatiales $H\alpha_{(i)}$ - $HN_{(i+1)}$, $HN_{(i)}$ - $HN_{(i+1)}$, $H\beta_{(i)}$ - $HN_{(i+1)}$. La description des corrélations moyenne portée (i à i+4) permet de détecter les structures hélicoïdales et les boucles. L'attribution

des spectres se termine par l'attribution de la totalité des effets nOe longue portée (i-i+a avec $a \geq 5$).

c°) Collection des nOe

Lorsque l'attribution séquentielle est terminée, on attribue la totalité des pics nOe (détermination des couples de protons donnant lieu à un pic de corrélation dipolaire). Une étape d'intégration permet de mesurer le volume des pics. Le volume des pics est relié à la distance (r) séparant les deux spins par la relation suivante :

$$I_{nOe} = f (\tau_m \cdot \tau_c / r^6)$$

τ_m est le temps de mélange, τ_c le temps de corrélation (qui caractérise la mobilité du vecteur liant les deux protons donnant lieu à l'effet nOe considéré).

De ce fait, il n'est pas possible d'obtenir des distances exactes puisque τ_c reste inconnu. Nous attribuerons donc à une intensité nOe donnée, un intervalle de distance dont la borne inférieure correspond à la distance de Van der Waals, et la borne supérieure correspond à la distance maximale pouvant séparer ces deux protons lorsqu'ils sont très mobiles. Une courbe de calibration est tracée à l'aide de distances connues, distances inter protons rencontrées dans les structures secondaires. Ceci permet la transformation du volume des pics en contraintes de distance.

d°) Calcul de structure

Du fait de l'imprécision de la mesure des distances inter-protons, la méthode ne permet pas de calculer une structure unique. Le résultat du calcul de structure réside en une famille de solutions toutes satisfaisant les contraintes injectées, donc toutes équiprobables. Le calcul de structure commence par la génération de structures aléatoires qui sont ensuite corrigées par l'introduction progressive des contraintes de distances suivant la chronologie suivante : contraintes intra-résiduelles, séquentielles, moyenne et longue portée. Le programme DIANA, utilisé dans le calcul de structure, travaille dans un espace multidimensionnel non cartésien en représentant la structure par ses angles dièdres. Les longueurs de liaison, les angles de valence et les angles dièdres des plans peptidiques sont fixes ; les structures sont corrigées en modifiant leurs angles dièdres qui sont traités comme des valeurs indépendantes. Une fonction cible est construite : elle tient compte des valeurs des angles dièdres déduits des constantes de couplage, des distances proton-proton déduites des mesures des taches nOe et des rayons de Van der Waals. La valeur de cette fonction cible traduit la qualité de l'adéquation entre les contraintes injectées et la géométrie de la structure résultante.

Cette valeur est utilisée comme critère de sélection des structures en adéquation avec les contraintes appliquées.

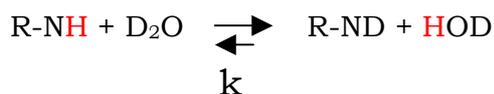
Le logiciel DIANA travaillant uniquement dans un espace angulaire, et de ce fait ne tenant pas compte des contacts Van de Waals défavorables, on fait subir aux solutions issues du calcul une minimisation énergétique sous contrainte RMN (en utilisant le programme CNS). Le but principal de cette minimisation est de corriger ces violations sur les rayons de Van der Waals et d'affiner la géométrie obtenue.

e°) Contraintes supplémentaires

La qualité des structures calculées dépendant directement du nombre de contraintes utilisées, il est important d'augmenter ce nombre. Dans ce but, nous pouvons appliquer les contraintes supplémentaires déterminées comme suit :

i Echange des protons amide

Le signal du deutérium n'est pas visible dans le domaine des fréquences de résonance du proton. Ainsi, lorsqu'un proton amide est échangé avec un deutérium, on observe progressivement la disparition du signal du proton amide. Si un proton est échangé lentement, il est peu accessible au solvant et est à priori impliqué dans une liaison hydrogène stable. La disposition des protons lentement échangeables le long de la séquence permet de confirmer le type de structure secondaire formée par la chaîne principale. L'étude de l'échange des protons amide avec les protons du solvant est réalisé dans 100% D₂O . Il suffit donc de déshydrater la protéine en solution, puis de l'hydrater à nouveau dans D₂O et mesurer la disparition des signaux des protons amide. Ecrivons la réaction de l'échange considéré :



La décroissance des signaux suit une loi exponentielle :

$$I_t = I_0 \cdot e^{-kt}$$

I_t est l'intensité du pic de corrélation impliquant le proton amide au temps t .

I_0 est l'intensité du pic de corrélation impliquant le proton amide au temps 0.

k est la constante de vitesse de l'échange.

On peut donc tracer la courbe représentant l'intensité du pic en fonction du temps et calculer la constante de vitesse d'échange (k) pour chaque proton amide de la séquence, on obtient ainsi un renseignement sur la structure secondaire de la molécule. La recherche du partenaire oxygène des protons NH se fait par analyse visuelle des structures préliminaires calculées en utilisant les effets nOe uniquement. Une fois ce

partenaire identifié, on applique une distance O-NH de 2Å, contrainte injectée dans le calcul.

ii Constantes de couplage

Le couplage scalaire des protons nous donne accès à une information structurale différente des contraintes de distance. En effet, la mesure des constantes de couplage $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ nous permet d'appréhender quantitativement la manière dont le transfert d'aimantation est effectué. Cette constante de couplage étant liée à la valeur de l'angle dièdre, nous pouvons ainsi obtenir des contraintes angulaires en fonction de la valeur de cette constante de couplage. On définit ainsi les angles comme suit :

Si $J < 7\text{Hz}$ alors $-80 < \phi < -40$ et si $J > 8\text{Hz}$ alors $-160 < \phi < -80$ (entre 7 et 8 Hz, J est considérée comme non significative et n'est pas retranscrite en contrainte angulaire).

f°) Qualité de la structure

i Précision de la structure

La précision du jeu de structures obtenues est décrite par un indice, le RMSD (Root Mean Square Deviation exprimé en angströms) qui permet d'analyser la convergence des solutions obtenues :

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum d^2}{n}}$$

d est la distance séparant les deux même atomes sur deux structures différentes, n est le nombre total de distances considérées.

Ce calcul tient compte de tous les atomes de toutes les structures calculées. Plus cet indice est faible et plus les structures convergent vers une solution unique. On peut calculer un RMSD global (qui prend en compte tous les atomes de la molécule), un RMSD sur des portions de structures, ou un RMSD ne portant que sur le squelette ou que sur les C_α . Ce dernier type de RMSD doit être inférieur à 1Å pour que la structure déterminée puisse être considérée comme précise.

ii Exactitude de la structure

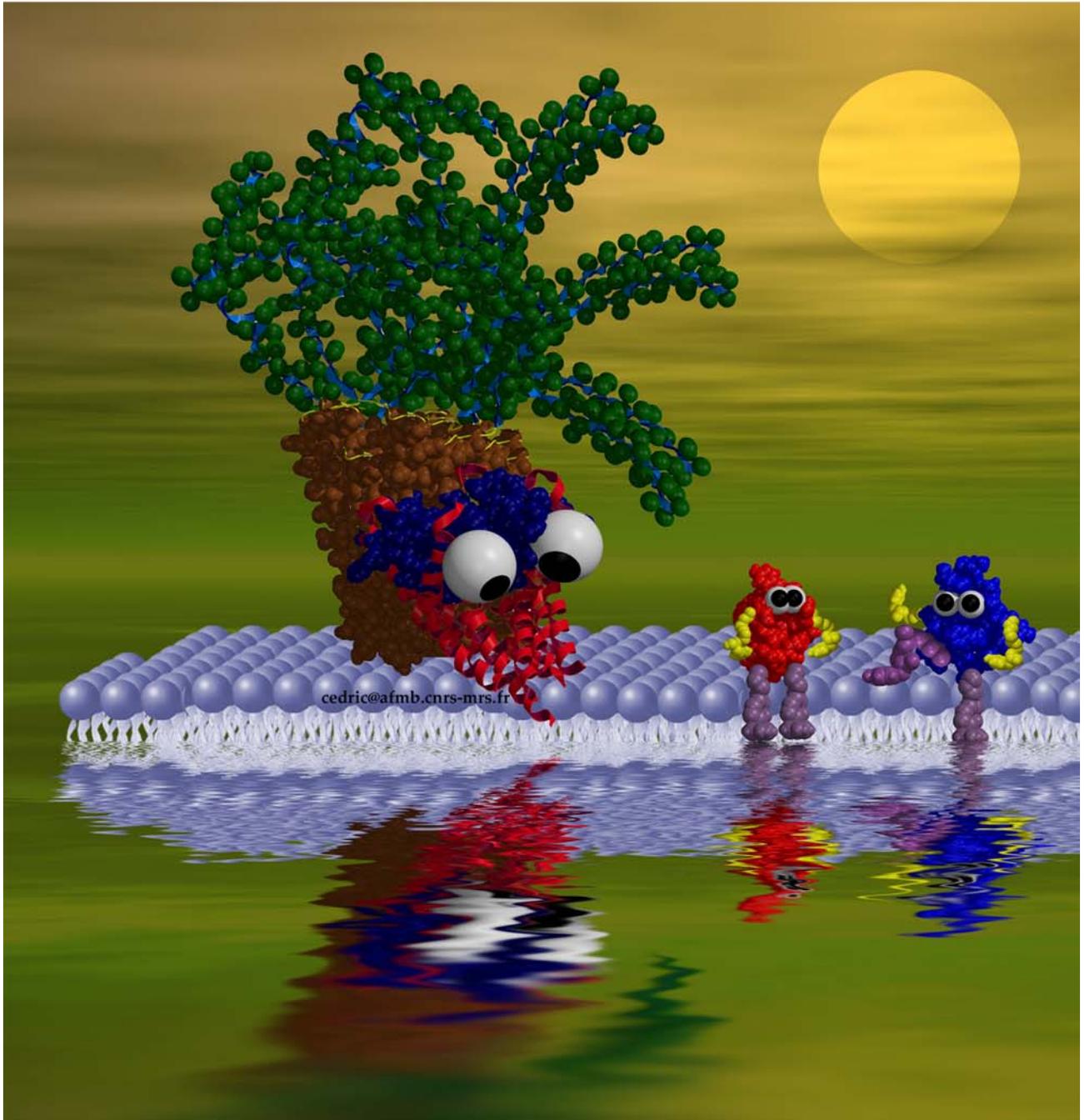
Les structures doivent non seulement converger vers une solution unique, mais encore faut il qu'elles soient justes. L'exactitude de la structure ne peut être quantifiée. Pour augmenter le degré de fiabilité de la solution, on tente d'avoir le plus de contraintes structurales possible. On peut ainsi calculer le nombre moyen de contraintes appliquées sur chaque résidu de la protéine. Il n'y a pas de critères préétablis concernant le nombre

minimal de contraintes expérimentales appliquées à la structure, mais une moyenne de 10 contraintes par résidu est un résultat considéré comme acceptable. On peut affiner l'analyse de l'exactitude de la structure en quantifiant le nombre de contraintes pour chaque résidu, et en isolant les contraintes longue portée responsables du repliement général, des contraintes moyenne (structures secondaires) et courte portée (géométrie locale).

iii Analyse de la géométrie

Une structure doit être en adéquation avec les contraintes expérimentales, suivre les géométries canoniques ou posséder une géométrie non canonique mais explicable par son activité. À cet effet, nous pouvons juger la conformité des angles du squelette protéique (diagramme de Ramachandran), la réalité des structures secondaires envisagées (par le biais du programme PROCHECKNMR) et la validité des structures retenues (par calcul et minimisation des énergies des structures finales).

Résultats



Le travail effectué au cours de cette thèse est sous-tendu par une idée maîtresse, améliorer encore la connaissance et la compréhension de l'interaction d'une toxine et de sa cible, le canal. Ces connaissances ont diverses répercussions : la caractérisation encore plus fine des propriétés des différents types de canaux exprimés mais aussi la création de molécules thérapeutiques à la spécificité contrôlée pour un certain type de canal donné. Ce contrôle de la spécificité, qui doit être total, implique une connaissance parfaite des caractéristiques physico-chimiques qui régissent cette spécificité. Les connaissances en la matière sont maintenant nombreuses, mais les zones d'ombre, qu'il reste à dévoiler, le sont plus encore. La mutagénèse dirigée, la création de molécules chimériques et les tests électrophysiologiques ont été largement utilisés pour mieux cerner les résidus critiques pour l'interaction de la toxine et affiner ainsi le modèle de l'interaction entre une toxine et un canal ionique. Toutefois, l'émergence et l'utilisation désormais courante des techniques de détermination de la structure des protéines ouvre un nouveau champ d'analyse qui se base sur la comparaison des structures et plus précisément permet l'établissement de véritables cartes fonctionnelles de ces toxines envers un type de canal donné. Aux analyses de la structure des toxines s'ajoute désormais un paramètre supplémentaire à prendre en compte : l'anisotropie de répartition des charges électrostatiques qui influence la reconnaissance entre la toxine et son récepteur.

Les résultats obtenus s'articulent autour de la détermination de la structure de toxines s'architecturant autour des motifs $Cs\alpha\beta$ et ICK.

Article I

**Structural Basis for α -K Toxin Specificity for K⁺ Channels Revealed through the
Solution ¹H NMR Structures of Two Noxiustoxin-Iberitoxin Chimeras**

Cédric Bernard, Gilles Ferrat, Valerie Fremont, Theodore J. Mullmann,
Kathleen M. Giangiacomo, and Hervé Darbon

Biochemistry, 2001, **47** : 55-72

Les neurotoxines de scorpions sont actives sur des types de canaux variés. Cette spécificité ainsi que leur petite taille en fait des cibles de choix pour créer des molécules chimériques et ainsi diriger la spécificité de la molécule obtenue vers le type de canal souhaité.

La noxiustoxine (NxTX) et l'ibériotoxine (IbTX) présentent des spectres d'activité très différents vis à vis des canaux potassiques activés par le Ca^{2+} de large conductance et les canaux potassiques dépendant du voltage KV1.3. Les structures tridimensionnelles de ces deux toxines s'articule autour du motif Cs α/β et diffèrent au niveau du coude β reliant l'hélice au feuillet et dans la longueur de leur squelette carboné. Pour comprendre

le rôle de ces différences dans la spécificité de ces deux toxines, nous avons construit deux chimères, NxTX-ibTX I et NxTX-ibTX II, et résolu leur structure tridimensionnelle par RMN bidimensionnelle du proton. Pour NxTX-ibTX I, sept résidus comprenant le coude α/β de la toxine ont été remplacés par six résidus de IbTX correspondant au même coude (YGSSAGA₂₁₋₂₇FGVDRF₂₁₋₂₆). Pour NxTX-ibTX II, une mutation S14W et la délétion des résidus N et C terminaux viennent s'ajouter à cette substitution. Les deux chimères voient leur structure spatiale globale conservée et restent fidèles au motif commun aux toxines

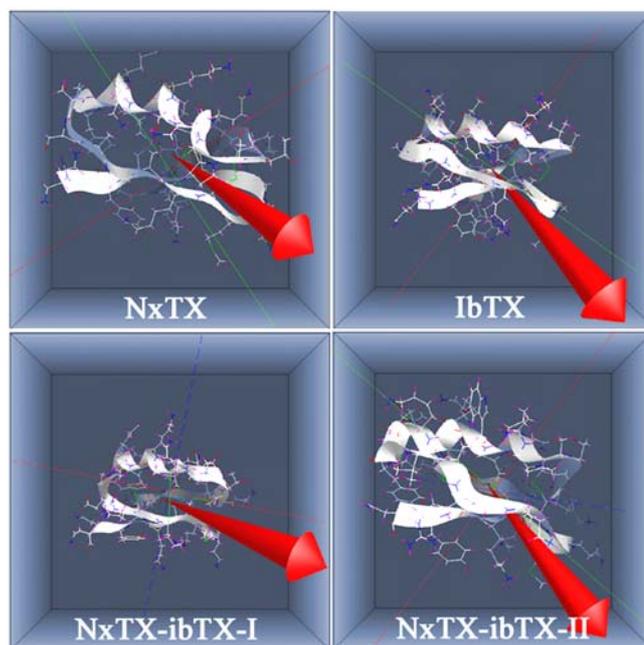


Figure 65 : Représentation vectorielle des dipôles électrostatiques de la noxiustoxine, de l'ibériotoxine et des deux chimères. Les quatre molécules présentent leur feuillet β face à l'embouchure externe du canal potassique.

courtes de scorpion. La répartition des charges des chimères n'est pas bouleversée par les mutations lorsqu'on la compare à celle des molécules initiales et le dipôle électrostatique de NxTX-ibTX I et NxTX-ibTX II émerge de la surface moléculaire par la face correspondant au feuillet β (**figure 65**). La description détaillée des structures est donnée dans l'article I, ci-après, ainsi que l'implication fonctionnelle

Structural Basis for α -K Toxin Specificity for K^+ Channels Revealed through the Solution 1H NMR Structures of Two Noxiustoxin–Iberitoxin Chimeras[†]

Gilles Ferrat,^{‡,§} Cedric Bernard,^{‡,§} Valerie Fremont,^{||,§} Theodore J. Mullmann,^{||,§} Kathleen M. Giangiacomo,^{||,§} and Herve Darbon^{*,§}

AFMB, CNRS UPR 6098, Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France, and Department of Biochemistry, Temple University School of Medicine, 3420 North Broad Street, Philadelphia, Pennsylvania 19140

Received February 2, 2001; Revised Manuscript Received June 7, 2001

ABSTRACT: Noxiustoxin (NxTX) and iberitoxin (IbTX) exhibit extraordinary differences in their ability to inhibit current through the large-conductance calcium-activated potassium (maxi-K) and voltage-gated potassium (Kv1.3) channels. The three-dimensional structures of NxTX and IbTX display differences in their α/β turn and in the length of the α -carbon backbone. To understand the role of these differences in defining specificity, we constructed two NxTX mutants, NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II, and solved their solution structures by 1H NMR spectroscopy. For NxTX–IbTX I, seven amino acids comprising the α/β turn in NxTX are replaced with six amino acids from the corresponding α/β turn in IbTX (NxTX-YGSSAGA_{21–27}FGVDRF_{21–26}). In addition, NxTX–IbTX II contained the S14W mutation and deletion of the N- and C-terminal residues. Both NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II exhibit an α/β scaffold structure typical of the α -K channel toxins. A helix is present from residues 10 to 19 in NxTX–IbTX I and from residues 13 to 19 in NxTX–IbTX II. The β -sheet, defined by three antiparallel strands, is one residue longer in NxTX–IbTX I relative to NxTX–IbTX II. The two toxins also differ in the structure of the α/β turn with NxTX–IbTX I resembling that of IbTX and with NxTX–IbTX II resembling that of NxTX. These differences in the β -sheet and α/β turn alter the dimensions of the toxin–channel interaction surface and provide insight into how these NxTX mutations alter K^+ channel specificity for the maxi-K and Kv1.3 channels.

The α -K channel toxin (α -KTx)¹ peptides, from scorpion venoms, represent a family of small, highly basic peptides that inhibit the flow of potassium ions through potassium channels by binding to and occluding the extracellular pore of the channel (1–3). The α -KTx peptides can be grouped into three subfamilies (α -KTx 1.x, α -KTx 2.x, and α -KTx 3.x) on the basis of differences in their amino acid sequences (4, 5). These subfamilies display remarkable differences in their specificity for voltage-gated potassium (Kv) and large-conductance, calcium-activated potassium (maxi-K) channels. In particular, iberitoxin (IbTX or α -KTx 1.3) is highly specific for the maxi-K channel and does not inhibit Kv channels with high affinity (6, 7). In contrast, noxiustoxin (NxTX or α -KTx 2.1), which inhibits some Kv channels with

high affinity (8), displays an extraordinary ability to discriminate against the maxi-K channel (9). Because these α -KTx peptides bind to the potassium channel pore, the determinants for binding specificity may provide insight into differences in the architecture of the Kv and maxi-K channel vestibules.

The three-dimensional structures of the α -KTx peptides, determined by 1H NMR spectroscopy, may disclose structural elements that control binding specificity. The structures for α -KTx peptides from the three subfamilies, α -KTx 1.x (10, 11), α -KTx 2.x (12, 13), and α -KTx 3.x (14, 15), have been solved. All display a α/β motif with a β -sheet formed from two or three antiparallel strands on one face of the molecule and an α -helix on the other. The helix and sheet form a compact structure held together by two of the three disulfide bonds. Thus, the overall tertiary structure of the α -KTx peptides is similar. However, the α -KTx subfamilies show differences in the length of their α -carbon backbone and in the α/β turn that may underlie their observed specificity.

To understand how these differences in the α -carbon backbone alter the toxin binding surface, we constructed two NxTX mutants (NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II). Each of these mutants was altered in the length of the α -carbon backbone and in the α/β turn relative to NxTX (Table 1). For both mutants, seven amino acids comprising the α/β turn in NxTX (TSSAGA_{21–27}) were replaced with six structurally equivalent residues from IbTX (FGVDRG_{21–26}). In addition to this mutation, NxTX–IbTX II includes deletion of T1

[†] This work was supported in part by NIH Grant GM52179 and in part by la Fondation pour la Recherche Médicale.

* Corresponding author. E-mail: herve@afmb.cnrs-mrs.fr. Tel: 33 491 16 45 35. Fax: 33 491 16 45 36.

[‡] AFMB, CNRS UPR 6098, Chemin Joseph Aiguier.

[§] G.F. and C.B. have contributed equally to this work.

^{||} Temple University School of Medicine.

¹ Abbreviations: α -KTx, α -K channel toxin; α -KTx 1.1, charybdotoxin; α -KTx 1.3, iberitoxin; α -KTx 2.1, noxiustoxin; α -KTx 3.2, agitoxin 2; AgTX2, agitoxin2; ChTX, charybdotoxin; DQF-COSY, double-quantum-filtered two-dimensional correlation spectra; IbTX, iberitoxin; Kv channel, voltage-gated potassium channel; maxi-K channel, large-conductance calcium-activated potassium channel; NOE, nuclear Overhauser effect; NOESY, phase-sensitive two-dimensional nuclear Overhauser effect spectra; NxTX, noxiustoxin; TOCSY, clean total correlation spectra.

Table 1: Amino Acid Sequence Alignment of IbTX, NxTX, NxTX-IbTX I, and NxTX-IbTX II

	1	5	10	15	20	25	30	35	37																													
IbTX	Z	F	T	D	V	D	C	S	V	S	K	E	C	W	S	V	C	K	D	L	F	G	V	-	D	R	G	K	C	M	G	K	K	C	R	C	Y	Q
NxTX	T	I	I	N	V	K	C	T	S	P	K	Q	C	S	K	P	C	K	E	L	Y	G	S	S	A	G	A	K	C	M	N	G	K	C	K	C	Y	N
NxTX-IbTX I	T	I	I	N	V	K	C	T	S	P	K	Q	C	S	K	P	C	K	E	L	F	G	V	-	D	R	G	K	C	M	N	G	K	C	K	C	Y	N
NxTX-IbTX II	-	I	I	N	V	K	C	T	S	P	K	Q	C	W	K	P	C	K	E	L	F	G	V	-	D	R	G	K	C	M	N	G	K	C	K	C	Y	N

and N38 and the site-directed mutation, S14W. The latter S14W mutation incorporates a residue that is critical for a high-affinity interaction with the maxi-K channel (16). Functional studies reveal that the interactions of NxTX-IbTX I and NxTX-IbTX II display opposing changes in their binding specificity for maxi-K and Kv1.3 channels (9). For the maxi-K channel, NxTX-IbTX I and NxTX-IbTX II both display measurable binding interactions, in the nanomolar to micromolar range, while NxTX does not. Conversely, for the Kv1.3 channel, the two mutants display a significantly weaker interaction relative to recombinant NxTX (NxTX-IbTX I, 60-fold; NxTX-IbTX II, 1500-fold).

To understand the structural basis for these changes in binding specificity, we examined the solution structures of NxTX-IbTX I and NxTX-IbTX II by ¹H NMR spectroscopy. The structures obtained differ in the length of the β -sheet face and in the $\alpha\beta$ turn. Together, these differences in the backbone conformation alter the shape of the toxin binding surface. These structural studies are consistent with functional studies and suggest that the maxi-K channel is exquisitely sensitive to the dimensions of the toxin β -sheet face compared to the Kv1.3 channel (9). Thus, the backbone of the α -KTX peptides presents an extraordinarily sensitive way for altering toxin-channel specificity.

MATERIALS AND METHODS

Expression and Purification of Recombinant NxTX-IbTX Peptides. NxTX-IbTX I and NxTX-IbTX II were expressed and purified as described previously (9). The identity of the purified peptides used for ¹H NMR spectra was confirmed by MALDI-MS mass spectrometric analysis (Protein Chemistry Laboratory, University of Pennsylvania).

Sample Preparation. NxTX-IbTX I (2.5 mg) and NxTX-IbTX II (7.5 mg) were dissolved in 0.5 mL of H₂O/D₂O (90/10 v/v), pH = 3, uncorrected for isotope effects, leading to concentrations of 1.2 and 3.6 mM, respectively.

NMR Spectroscopy. Proton 2D NMR spectra were first routinely recorded at 283 and 300 K in order to solve assignment ambiguities. All of the data were collected on a Bruker DRX 500. Double-quantum-filtered two-dimensional correlation spectra (DQF-COSY) (17) were acquired in the phase-sensitive mode by time-proportional phase incrementation of the first pulse (TPPI) (18). Clean total correlation spectra (TOCSY) (19, 20) were acquired with a spin lock of 80 ms. Phase-sensitive two-dimensional nuclear Overhauser effect (NOE) spectra (NOESY) (21, 22) with watergate (23) composite were acquired using the TPPI method with mixing times from 80 to 150 ms. The solvent-OH resonance was suppressed either by low-power irradiation during the relaxation delay or, for NOESY spectra, during the mixing time or by using a watergate 3-9-19 pulse train (23) using a gradient at the magic angle obtained by applying simultaneously x -, y -, and z -gradients prior to detection.

For determination of amide proton exchange rates, the peptide was lyophilized twice and solubilized in 100% D₂O. Immediately after solubilization, a series of NOESY spectra with mixing times of 80 ms were recorded at 283 K, the first one during a time period of 1 h (1024 complex points with 256 experiments), followed by spectra of 10 h (1024 complex points with 512 experiments).

Data Processing. All of the data were processed using the Bruker software XWINNMR running on a Silicon Graphic INDY R4000 workstation. The matrices were transformed with a zero filling to the next power of two in the acquisition dimension and to 1024 points in the other. The signal was multiplied by a shifted sine-bell window in both dimensions prior to Fourier transform, and a fifth-order polynomial baseline correction was applied. Spectra had finally a 12 ppm width with a digital resolution of 2.93 Hz/point in the ω_2 dimension and 5.85 Hz/point in the ω_1 dimension.

Spectral Analysis. The spectral analyses were performed using the XEASY software (24) running on a Silicon Graphic R10000 workstation. The identification of amino acid spin systems and the sequential assignment were performed using the standard strategy described by Wüthrich (25). The comparative analysis of COSY and TOCSY spectra recorded in water gave the spin system signature of the protein. The spin systems were sequentially connected using the NOESY spectra.

Experimental Restraints. The integration of NOE data using manual integration in the XEASY software permitted us to obtain volumes and to convert them into distance restraints using the CALIBA routine of the DIANA package, according to calculated curves, function of $1/r^6$ for intraresidual and sequential NOE involving HN, H α , and H β , as well as medium- and long-range NOE involving backbone protons, and function of $1/r^4$ for others. We thus obtained a set of restraints with upper limits defined for each volume. The ϕ torsion angle constraints resulted from the $^3J_{\text{HN}\alpha}$ coupling constant measurements obtained by INFIT routine from XEASY software. For a given residue, separated NOESY cross-peaks with the backbone amide proton in the ω_2 dimension were used. Several cross sections through these cross-peaks were selected that exhibited a good signal to noise ratio. They were added up, and only those data points of the peak region that were above the noise level were retained. The left and the right ends of the peak region were then brought to zero intensity by a linear baseline correction. After extending the baseline-corrected peak region with zeros on both sides, which is equivalent to oversampling in the time domain, an inverse Fourier transformation was performed. The value of the $^3J_{\text{HN}\alpha}$ coupling constant was obtained from the first local minimum. The constants were then divided into small (<7 Hz) and large (>7.5 Hz) and translated into $-40^\circ/-70^\circ$ and $-70^\circ/-170^\circ$ angle restraints.

respectively. The stereospecific assignment was made using the HABAS routine of the DIANA software (26, 27) on the basis of the upper limit restraints and $^3J_{\text{HN}\alpha}$, $^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta 2}$, and $^3J_{\text{H}\alpha\text{H}\beta 3}$. Pseudoatom corrections were applied by DIANA when stereospecific assignments could not be obtained.

Structure Calculations. Distance geometry calculations were performed with the variable target function program DIANA 2.8. A preliminary set of 1000 structures was initiated including only intraresidual and sequential upper limit distances. From these, the 500 best were kept for a second round, including medium-range distances, and the resulting 250 best for a third one, with the whole set of upper limit restraints, and some additional restraints, used to define the disulfide bridges (i.e., $d\text{S}\gamma/\text{S}\gamma$, 2.1 Å; $d\text{C}\beta/\text{S}\gamma$, 3.1 Å). Starting from the 100 best structures, according to their target function, a REDAC (27) strategy was used in the last step in order to include the dihedral constraints together with the additional distance restraints coming out from hydrogen bonds.

The 25 structures exhibiting the lowest target function were then energy-minimized over 2500 iterations of the Powell algorithm of the X-PLOR 3.1 (28) package using the CHARMM force field (parameter files parm11h6x.pro and top11h3x.pro).

The visual analysis of the resulting structures was carried out with TURBO (29) graphic software as well as with MOLMOL (30) software. RMSD data were obtained by MOLMOL software. The quality of the structures was analyzed using PROCHECK-NMR (31) software.

Electrostatic Calculations. The electrostatic potential throughout the volume of the toxin and toxin dipole moments together were calculated using Grasp (32) as described (33). The electrostatic potential maps were calculated using two different charge sets. One includes only ionizable groups at the N- and C-termini and on arginine, lysine, aspartate, and glutamate. The second set assigns partial charges to all ionizable groups and to atoms in the α -carbon backbone.

RESULTS

Sequential Assignment. Both NxTX–IbTX peptides were sequentially assigned following the standard method of Wüthrich (25). Below is the description of the sequential assignment for NxTX–IbTX II. For NxTX–IbTX I, the same pattern has been obtained except for the N-terminus where the spin system lacking the amide proton frequency was a threonine instead of an isoleucine. The spin systems were identified on the basis of both COSY and TOCSY spectra recorded in water at 300 and 283 K. The use of two temperatures for recording allowed us to resolve overlapping signals in the fingerprint region, leading to complete assignment of intraresidue HN–H α cross-peaks. Starting from them, each spin system was characterized by its connectivities in the COSY and checked in the TOCSY spectra. Few methyl groups have only one chemical shift frequency, due to their strict degeneracy or uncertainty in overcrowded regions. The sequential connectivities were obtained from NOESY spectra, recorded in water at both 300 and 283 K, with a mixing time of 80 ms. The H α –HN, HN–HN pathways are illustrated in Figure 1. The NxTX–IbTX II peptide contained only one leucine, one threonine, and one serine. Those spin systems were unambiguously attributed: leucine 19, threonine 7, and

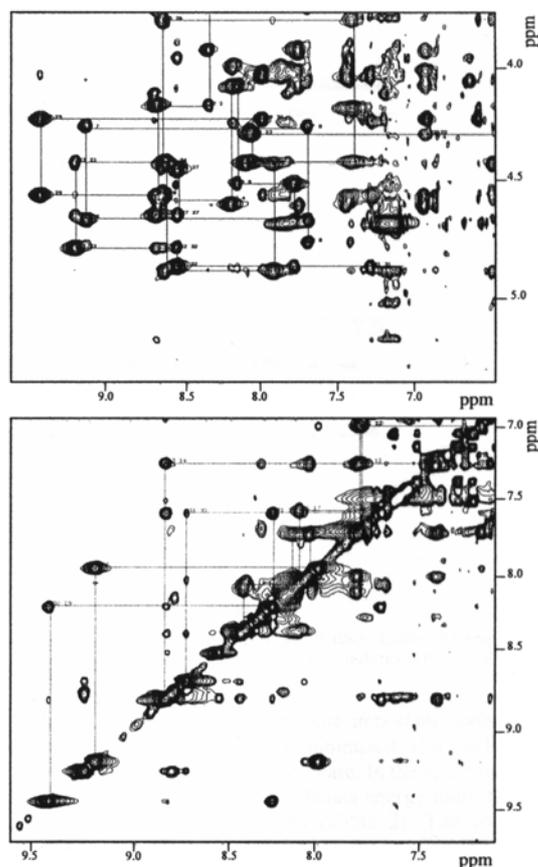


FIGURE 1: Contour plots of a NOESY spectrum recorded on NxTX–IbTX I peptide. Top: Fingerprint region. Bottom: Amide proton region. Some sequential connectivities are illustrated by lines.

serine 8. The discrimination of the two isoleucines of the molecule was done assuming the isoleucine 1 NH₂ group is in fast exchange with water and therefore lacks the TOCSY tower on the HN frequency. Conversely, the one which produced a TOCSY tower on the HN frequency was assigned as isoleucine 2. These assigned spin systems were used to assign the rest of the spin systems by sequentially connecting them by virtue of sequential H α –HN for the extended structures or HN–HN for the helical structures. These connections are confirmed by H β –HN or H γ –HN connectivities. These results are summarized in Figure 2.

Additional Restraints. We measured 27 $^3J_{\text{HN}\alpha}$ coupling constants on NOESY spectra of NxTX–IbTX II by using the INFIT software. The missing constants correspond to the three glycines, the two prolines, the isoleucine 1, the phenylalanine 20, the lysine 31, and the asparagine 36, for which INFIT did not succeed in determining $^3J_{\text{HN}}$ coupling constants.

A total of 20 $^3J_{\alpha\beta}$ constants for NxTX–IbTX II were obtained from the COSY spectra (digital resolution 0.73 Hz/point), compared with simulated signals. β protons of asparagine 3, cysteine 12, and serine 8 were stereospecifically assigned. We measured the exchange rate of amide protons with the solvent. The amide protons still giving rise to NOE

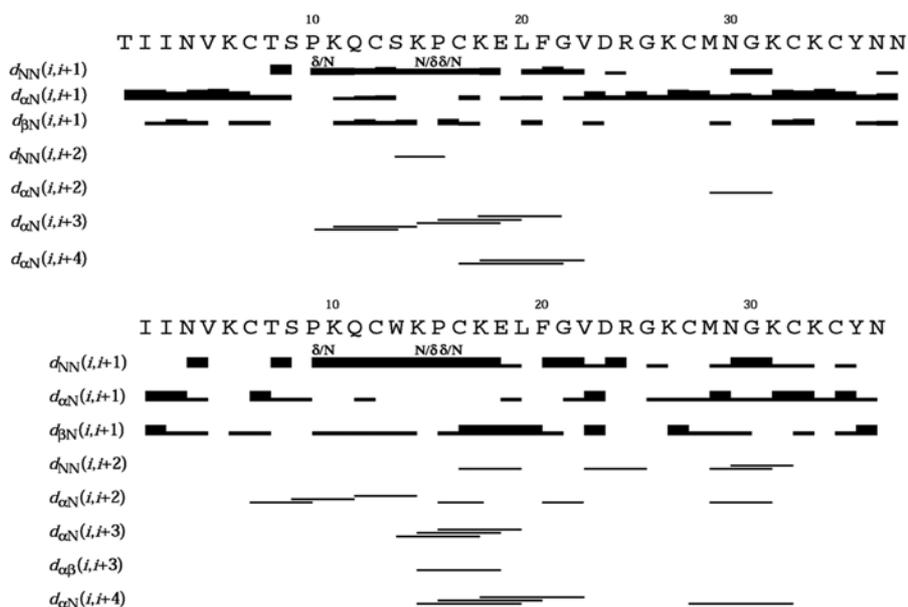


FIGURE 2: Sequence-specific assignments of NxTX-IbTX I (top) and NxTX-IbTX II (bottom) from NOE data. Collected sequential NOE's are classified into strong and weak NOE's and are indicated by thick and thin bars, respectively. The medium-range NOE's are indicated without mention of their intensity.

Table 2: Structural Data from the 25 Best Structures of NxTX-IbTX I and NxTX-IbTX II

	NxTX-IbTX I	NxTX-IbTX II
RMSD (Å)		
backbone (C, C α , N)	0.96 (± 0.23)	0.85 (± 0.23)
all heavy atoms	1.90 (± 0.23)	1.75 (± 0.23)
energy (kcal/mol)		
total	-219.57	-134.04
bonds	0.57	11.82
van der Waals	-220.68	-165.67
dihedral	0.78	1.33
NOE	0.78	0.10

cross-peaks after 50 h of exchange were considered as being engaged in hydrogen bonds. Most of them occurred in the regular structures, such as HN of C6, Q11, C12, W13, and C16 in the α -helix and of V22, K26, M28, G30, K31, C32, and K33 in the β -sheet. The partner of the C6 HN has been identified as the V4 CO group.

Structure Calculations. For NxTX-IbTX II (NxTX-IbTX I), the whole set of constraints included 433 (346) distance restraints extracted from NOE's 119 (117) intraresidues, 132 (110) sequential, 90 (27) medium-range, and 59 (37) long-range restraints, 33 restraints taken out from hydrogen-exchange analysis and 24 angle restraints extracted from coupling constant measurements [i.e., an average of 12.7 (11.2) restraints/residue; see Table 2]. The distance geometry calculations using this whole set of restraints led to a single family of 25 structures for NxTX-IbTX I and NxTX-IbTX II; see Figure 3a. These 25 structures are all consistent with the experimental restraints, and none of them present NOE violations larger than 0.2 Å. Furthermore, no residual unassigned NOE cross-peaks were present at the end of the calculation process.

These 25 structures, having some important nonbonded bad contacts, have been energy minimized with the Powell algorithm of the X-PLOR 3.1 software. In the resulting final structures, the negative van der Waals energy indicates the absence of nonbonded contacts (Table 2). The covalent geometry is respected as indicated by the low RMSD values on the bond lengths and the valence angles. No NOE violation larger than 0.15 Å was detected. The RMSD of these 25 structures are 0.85 Å for the backbone atoms and 1.75 Å for all of the heavy atoms (according to the MOLMOL software, Figure 3a). The overall backbone geometry is in agreement with predicted torsion angles. Ramachandran analysis (not shown) revealed 61.2% of the residues in the most favored regions, 38.5% in additional and generously additional regions, and 0.2% in disallowed regions, according to the PROCHECK-NMR software nomenclature.

Structure Description of NxTX-IbTX I and NxTX-IbTX II. The calculated structures of NxTX-IbTX II and NxTX-IbTX I share the same fold which is characteristic of the α -KTx family of peptides. The RMSD values of the 25 structures allow us to describe the classic $\alpha\beta$ scaffold: a three-stranded β -sheet and an α -helix (Figure 3b). The precise location of these secondary structures has been done by PROCHECK-NMR, which indicates the presence of an α -helix running from residues 10 to 19 (two turns and a half of helix) for NxTX-IbTX II and from residues 13 to 19 for NxTX-IbTX I. In addition, the β -sheet is made of stretches 2-3, 25-28, and 31-34 for NxTX-IbTX II and 2-3, 24-29, and 32-36 for NxTX-IbTX I. The 2-3 stretch is nonclassical since it is only two residues long and situated at the N-terminus of the molecule. The second and the third strands are connected by an undefined β -turn formed by

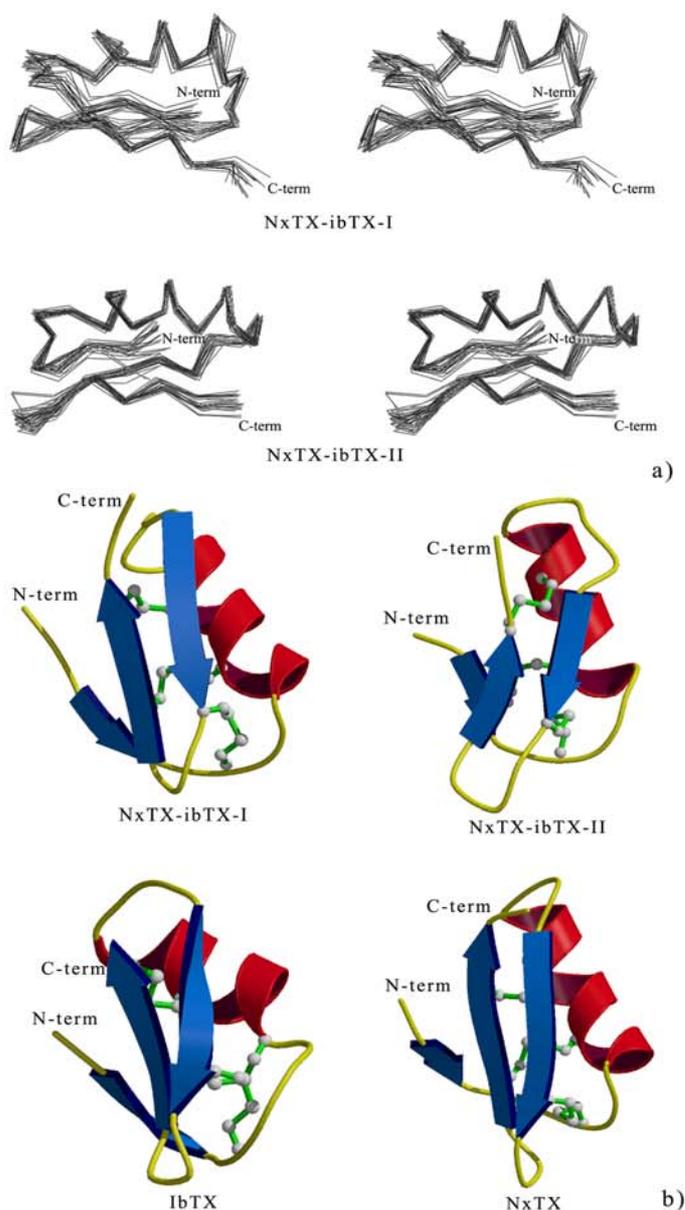


FIGURE 3: (a) Stereoview of the 25 best structures for NxTX–IbTX I (top) and NxTX–IbTX II (bottom). Only the C α traces are displayed. (b) Molscript diagrams showing the secondary structures for NxTX–IbTX I, NxTX–IbTX II, IbTX, and NxTX.

residues N29 and G30 for NxTX–IbTX II and N30 and G31 for NxTX–IbTX I. The high RMSD of this region shows that this part of the peptide is flexible, as in the original NxTX (12). Despite the presence of $i,i+2$ correlations between the amide protons of residues 28–30 and 29–31 and the hydrogen bond between the carbonyl of the M28 and the amide proton of K31, it has been impossible to classify this turn. These secondary structures for NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II are in full accordance with the experimental data.

Electrostatic Features of NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II. The α -KTx peptides are highly charged peptides, and these charges have been shown to have profound effects on their interactions with the extracellular vestibules of K channels (33–35). Similar to NxTX, NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II both have a large net positive charge of 6. However, the total number of ionizable charges in these NxTX–IbTX (+9, –3) chimeras is greater than in NxTX (+8, –2). The extra ionizable residues in the chimeras derive from the presence of an Asp and Arg in the α/β turn (Table

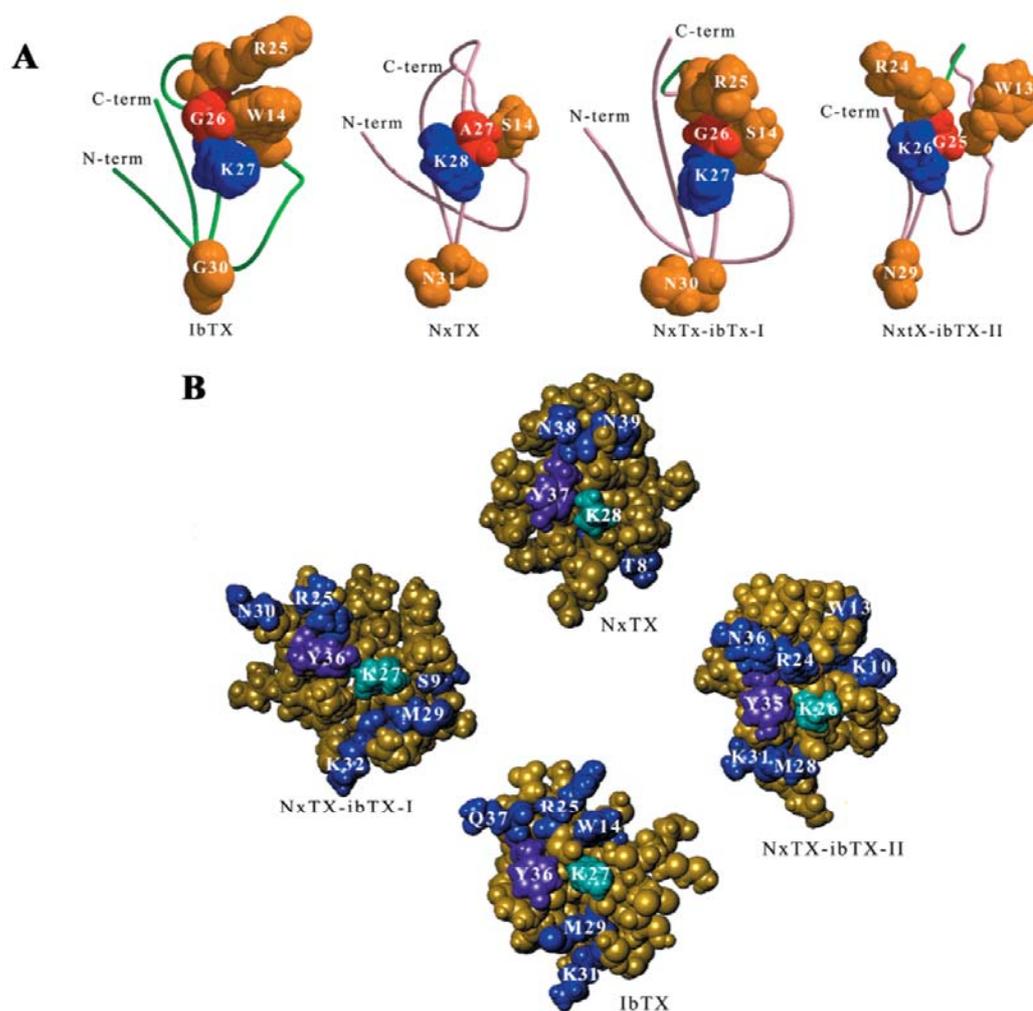


FIGURE 4: Comparison of NxTX–IbTX chimera structures to NxTX and IbTX. (A) Molscript diagrams of structures for NxTX–IbTX I, NxTX–IbTX II, NxTX, and IbTX. Key residues are in CPK representation. Lys27, colored blue, interacts with a K^+ binding site in the maxi-K channel pore (33, 35). Arg25 and Trp14, colored yellow, are uniquely critical for a high-affinity interaction with the maxi-K channel (16). Residues in the β -turn, colored yellow, form an important part of the toxin–K channel interaction surface (2, 16, 36). Gly26, colored red, in IbTX (α -KTx 1.3) is reported to define the orientation of the helix and sheet in the α -KTx 1.x subfamily (41). The structural equivalent of this residue in NxTX is Ala27. Structurally equivalent residues in NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II are similarly color coded. (B) CPK representation of the interaction surface of IbTX, NxTX, NxTX–IbTX I, and NxTX–IbTX II. The residues involved in the binding of the toxins are in blue for all but the critical lysine (in light blue) and the aromatic residue (in purple).

1). To understand how these extra charges influence their electrostatic structures, we calculated the dipole moments and electrostatic potential around the NxTX–IbTX molecules. The calculated dipole moments for NxTX–IbTX I (87 D) and NxTX–IbTX II (66 D) are slightly larger than that for NxTX (55 D). However, the relative orientations of the dipole moments for both chimeras (Figure 5) are similar to that of NxTX. Figure 5 also shows the positive (turquoise) and negative (magenta) isopotential surfaces at 2 kT overlaying the α -carbon backbones for NxTX–IbTX I (parts A and B) and NxTX–IbTX II (parts C and D). Consistent with the large net positive charge, the positive isopotential surfaces enclose a much larger volume than the negative isopotential surfaces. At low ionic strength, parts A and C of Figure 5, the positive isopotential surfaces enclose a large volume,

$\sim 39\,000\ \text{\AA}^3$. Indeed, these surfaces extend far ($\sim 10\ \text{\AA}$) beyond the molecular surface (not shown). In contrast, at high ionic strength (150 mM), parts B and D of Figure 5, the positive isopotential surfaces enclose a much smaller volume, $\sim 4000\ \text{\AA}^3$. This large change in volume with ionic strength is consistent with the finding that the association rate constants for NxTX–IbTX II are exquisitely sensitive to external ionic strength (9).

DISCUSSION

Comparison of NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II to Related Toxins. NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II adopt the classical scorpion toxin α/β scaffold (C α/β motif), which has been described as a α -helix covalently linked through two disulfide bridges to an antiparallel β -sheet. This motif

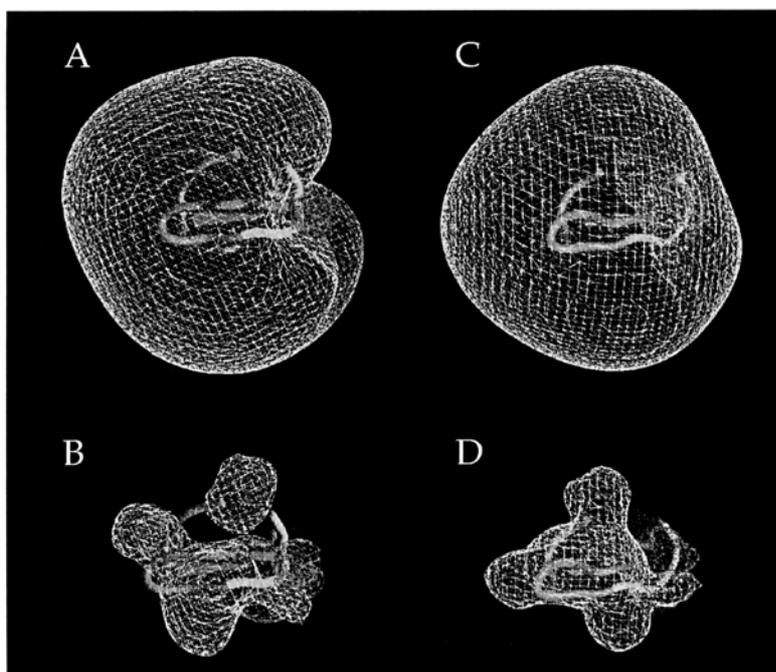


FIGURE 5: Isopotential energy surfaces for NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II. Parts A and C show the isopotential energy surfaces at +2 kT (turquoise) and –2 kT (magenta) calculated with 0 mM ionic strength for NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II, respectively. Parts B and D show the isopotential energy surfaces at +2 kT (turquoise) and –2 kT (magenta) calculated with 150 mM ionic strength for NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II, respectively. The orientation and relative magnitudes of the calculated dipole moments for NxTX–IbTX I (87 D) and NxTX–IbTX II (66 D) are shown in blue. Electrostatic calculations for the structures shown were done using GRASP (32) with a charge set that includes only the ionizable residues, see Materials and Methods. For both chimeras, the α -carbon backbone residues from NxTX are shown in magenta while those from IbTX are shown in green.

is characteristic of all α -KTx toxin subfamilies. The overall structures of NxTX–IbTX I and NxTX–IbTX II are very similar to those of NxTX (α -KTx 2.1) and IbTX (α -KTx 1.3) (Figure 4). However, there are important differences in the secondary and tertiary structures of these toxins that are likely to differently influence their binding interactions with maxi-K and Kv channels.

A substantial body of data supports the fact that the α -KTx β -sheet face forms its binding surface with the potassium channel external vestibule. For both NxTX–IbTX peptides, the reverse turns between the second and third antiparallel β -strands are similar to that of NxTX. As in NxTX, this turn is flexible compared to IbTX. This difference in flexibility may derive from the fact that in NxTX and the NxTX–IbTX peptides this turn includes an asparagine followed by a glycine. However, in IbTX and all α -KTx 1.x peptides, this turn consists of either a glycine or asparagine followed by a lysine. The presence of this lysine is likely to restrict the flexibility of this turn. Additionally, in AgTX2 (α -KTx 3.2) an arginine at this position was found to interact with a specific residue in the Shaker Kv channel (36). The residues in this turn are also critical for a high-affinity interaction with the maxi-K channel (16). Thus, the identities of residues in this reverse turn are important determinants of α -KTx binding to the maxi-K and Kv channels.

The length of the antiparallel β -strands may also be an important determinant of α -KTx binding specificity. NxTX (α -KTx 2.1) contains two extra amino acids compared to

IbTX (α -KTx 1.3), 39 vs 37, which increase the length of the first and third antiparallel strands of the β -sheet face in NxTX (4, 12). The NxTX–IbTX peptides are both reduced in length compared to NxTX because seven residues comprising the α/β turn in NxTX are replaced with six structurally equivalent residues in IbTX. Thus, NxTX–IbTX I, which contains only this mutation, is 38 residues in length. With additional amino acid deletions at both the N- and C-termini, NxTX–IbTX II is 36 residues in length. From the solution structures it is clear that the third antiparallel strand in NxTX–IbTX II is decreased in length compared to NxTX–IbTX I (Figure 3). Interestingly, NxTX–IbTX I shows an \sim 15-fold weaker interaction for the maxi-K channel compared to NxTX–IbTX II and NxTX–IbTX III mutants, which both contain this C-terminal deletion (9). Thus, this increased length of the third antiparallel β -strand in NxTX–IbTX I could contribute to its relatively weak interaction with the maxi-K channel.

Intriguingly, peptides from the α -KTx 3.x subfamily (4, 15) also display an increased length of the third antiparallel strand compared to the α -KTx 1.x subfamily of peptides. Peptides from this subfamily do not block the maxi-K channel with high affinity (37). Thus, the extra length of the β -sheet face may be a defining feature in maxi-K channel discrimination of the α -KTx 2.x and α -KTx 3.x subfamilies.

NxTX and IbTX also display differences in the packing of their helix and sheet, as can be seen from Figure 3b. For NxTx the plane of the β -sheet face and long axis of the helix

are roughly parallel. In contrast, for IbTx, the β -sheet face plane and helix axis are tilted by roughly 45°. Analysis of the solvent-accessible residues in charybdotoxin (ChTx or α -KTx 1.1) suggested that the packing of the helix and sheet should be critically dependent upon a highly conserved glycine that is not solvent accessible (38). In the α -KTx 1.x and α -KTx 3.x subfamilies, this "Gly26" is strictly conserved. However, in NxTX this position is occupied by an alanine. Both NxTX-IbTx peptides contain the critical Gly26. Thus, we expected both of these peptides to resemble IbTx in their packing of the helix and sheet. Surprisingly, these peptides differ in the packing of their helices and sheets (Figure 3b). For NxTX-IbTx I, the β -sheet plane and helix are roughly parallel, as seen for IbTx. Conversely, NxTX-IbTx II resembles NxTX in that the β -sheet plane and helix are tilted by roughly 45°. Our results suggest that, in addition to the culprit Gly26, other structural features help to define the packing of the helix and sheet in the α -KTx peptides.

These differences in the orientation of the β -sheet plane and helix correlated with differences in the α/β turn. The α/β turn in NxTX-IbTx I resembles that in IbTx while the α/β turn in NxTX-IbTx II resembles that in NxTX. These differences in the α/β turn and in packing of the helix and the sheet alter the geometry of the toxin binding surface. The importance of this altered toxin binding surface can be understood by examining the location of toxin residues critical to a high-affinity interaction with the maxi-K channel (Figure 4). Mutagenic work with charybdotoxin (ChTx or α -KTx 1.1) showed that eight residues, protruding from the β -sheet face, were critical for a high-affinity interaction with the maxi-K channel. Moreover, two of these residues, R25 and W14, are uniquely conserved in the α -KTx 1.x subfamily. NxTX-IbTx II contains six of the eight critical residues including R25 and W14 (16). However, the interaction of the maxi-K channel with NxTX-IbTx II is >1000-fold weaker than its interaction with either ChTx (α -KTx 1.1) (39) or IbTx (α -KTx 1.3) (1). Figure 4 shows that the relative positions of R25 and W14 in NxTX-IbTx II differ from those in IbTx (α -KTx 1.3). Thus, the optimal interaction of these toxin residues with channel residues may be disrupted. In addition, the altered location of these and other residues may introduce new unfavorable interactions with the maxi-K channel vestibule. These functional (9) and structural results suggest that the α -carbon backbone provides an extraordinarily sensitive way for altering α -KTx molecular recognition of K channels through subtle rearrangement of the functional surface involved in the interaction of toxins with the K channels (Figure 4B).

The NxTX-IbTx structures solved in this work in combination with functional studies (9) suggest that the α/β turn and the length of the β -sheet face may help to define the α -KTx discrimination of maxi-K and Kv channels. Therefore, it is natural to ask, what can these molecular differences tell us about the architecture of maxi-K and Kv channels? The minimal functional unit of a K channel is a homotetramer of subunits symmetrically arranged around a central aqueous pore (40). Thermodynamic mutant cycle analysis with AgTX2 (α -KTx 3.2) and the Shaker Kv channel showed that two different toxin residues at either end of the β -sheet face (i.e., the reverse turn and α/β turn) interact with identical channel residues on diametrically opposed subunits (36). As a rigid molecular caliper, the dimensions of the toxin

β -sheet face may provide insight into the molecular architecture of the K channel vestibules. In this regard, the exquisite sensitivity of the maxi-K channel to the length of the β -sheet face, compared to Kv channels (9), hints at fundamental differences in their external vestibules. Indeed, docking NxTX and IbTx into a three-dimensional model of the maxi-K channel vestibule revealed that the extra length of the β -sheet face in NxTX creates a sterically unfavorable interaction with residues in diametrically opposed subunits (Dr. Ying Duo-Gao, Merck Research Laboratories, personal communication). Thus, by exploring α -KTx peptides of extraordinarily different patterns of specificity, this work points to a new way for probing molecular differences in the architectures of K channel vestibules.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Dr. Ying-Duo Gao (Merck Research Laboratories) for sharing structural models of the maxi-K and Kv channel vestibules with us and for valuable discussions on them. We thank Dr. Maria Garcia (Merck Research Laboratories) for helpful comments on the manuscript and beneficial discussions on K channel vestibules.

REFERENCES

1. Giangiacomo, K. M., Garcia, M. L., and McManus, O. B. (1992) *Biochemistry* 31, 6719–6727.
2. Goldstein, S. A., Pheasant, D. J., and Miller, C. (1994) *Neuron* 12, 1377–1388.
3. MacKinnon, R., and Miller, C. (1988) *J. Gen. Physiol.* 91, 335–349.
4. Giangiacomo, K. M., Gabriel, J., Fremont, V., and Mullmann, T. J. (1999) *Perspect. Drug Discovery Des.* 15/16, 167–186.
5. Miller, C. (1995) *Neuron* 15, 5–10.
6. Galvez, A., Gimenez-Gallego, G., Reuben, J. P., Roy-Contancin, L., Feigenbaum, P., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1990) *J. Biol. Chem.* 265, 11083–11090.
7. Koschak, A., Koch, R. O., Liu, J., Kaczorowski, G. J., Reinhart, P. H., Garcia, M. L., and Knaus, H. G. (1997) *Biochemistry* 36, 1943–1952.
8. 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) *Mol. Pharmacol.* 45, 1227–1234.
9. Mullmann, T. J., Spence, K. T., Schroeder, N. E., Fremont, V., Christian, E. P., and Giangiacomo, K. M. (2001) *Biochemistry* 40, XXXX–XXXX.
10. Bontems, F., Roumestand, C., Boyot, P., Gilquin, B., Doljansky, Y., Menez, A., and Toma, F. (1991) *Eur. J. Biochem.* 196, 19–28.
11. Johnson, B. A., and Sugg, E. E. (1992) *Biochemistry* 31, 8151–8159.
12. Dauplais, M., Gilquin, B., Possani, L. D., Gurrola-Briones, G., Roumestand, C., and Menez, A. (1995) *Biochemistry* 34, 16563–16573.
13. Johnson, B. A., Stevens, S. P., and Williamson, J. M. (1994) *Biochemistry* 33, 15061–15070.
14. Gairi, M., Romi, R., Fernandez, I., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M. F., Van Rietschoten, J., Pons, M., and Giralt, E. (1997) *J. Pept. Sci.* 3, 314–319.
15. Krezel, A. M., Kasibhatla, C., Hidalgo, P., MacKinnon, R., and Wagner, G. (1995) *Protein Sci.* 4, 1478–1489.
16. Stampe, P., Kolmakova-Partensky, L., and Miller, C. (1994) *Biochemistry* 33, 443–450.
17. Marion, D., and Wuthrich, K. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 967–974.
18. Piantini, U., Sorensen, O. W., and Ernst, R. R. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* 104, 6800–6801.
19. Bax, A., and Davis, D. G. (1987) *J. Magn. Reson.* 65, 355–360.

20. Griesinger, C., Otting, G., Wuthrich, K., and Ernst, R. R. (1988) *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 7870–7872.
21. Jeener, J., Meier, B. H., Bachman, P., and Ernst, R. R. (1979) *J. Chem. Phys.* **71**, 4546–4553.
22. Kumar, A., Ernst, R. R., and Wuthrich, K. (1981) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**.
23. Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. (1992) *J. Biomol. NMR* **2**, 661–665.
24. Eccles, C., and Guntert, P. (1991) *J. Biomol. NMR* **1**, 111–130.
25. Wuthrich, K. (1986) *NMR of proteins and nucleic acids*, John Wiley, New York.
26. Guntert, P., Braun, W., and Wuthrich, K. (1991) *J. Mol. Biol.* **217**, 517–530.
27. Guntert, P., and Wuthrich, K. (1991) *J. Biomol. NMR* **1**, 447–456.
28. Brünger, A. T. (1992) *X-PLOR Version 3.1*, Yale University Press, New Haven, CT.
29. Roussel, A., and Cambillau, C. (1989) pp 77–78, Silicon Graphics. Mountain View, CA.
30. Koradi, R., and Billeter, M. (1996) *J. Mol. Graphics* **14**, 51–55.
31. Laskowski, R. A., and Rullmann, J. A. (1996) *J. Biomol. NMR* **8**, 477–486.
32. Nicholls, A., Sharp, K. A., and Honig, B. (1991) *Proteins* **11**, 281–296.
33. Mullmann, T. J., Munujos, P., Garcia, M. L., and Giangiaco, K. M. (1999) *Biochemistry* **38**, 2395–2402.
34. MacKinnon, R., LaTorre, R., and Miller, C. (1989) *Biochemistry* **28**, 8092–8099.
35. Park, C. S., and Miller, C. (1992) *Neuron* **9**, 307–313.
36. Hidalgo, P., and MacKinnon, R. (1995) *Science* **268**, 307–310.
37. Garcia, M. L., Garcia-Calvo, M., Hidalgo, P., Lee, A., and MacKinnon, R. (1994) *Biochemistry* **33**, 6834–6839.
38. Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Menez, A., and Toma, F. (1991) *Science* **254**, 1521–1523.
39. Giangiaco, K. M., Sugg, E. E., Garcia-Calvo, M., Leonard, R. J., McManus, O. B., Kaczorowski, G. J., and Garcia, M. L. (1993) *Biochemistry* **32**, 2363–2370.
40. Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998) *Science* **280**, 69–77.
41. Bontems, F., Gilquin, B., Roumestand, C., Menez, A., and Toma, F. (1992) *Biochemistry* **31**, 7756–7764.

BI010228E

Conclusion

Les structures des chimères résolues dans cet article associées aux études fonctionnelles (Mullman, et coll., 2001), suggèrent que le coude reliant l'hélice au feuillet et la longueur de ce dernier aident à la discrimination entre les canaux maxi K et les canaux Kv. Il a été montré précédemment que l'AgTX2 interagissait avec deux sous-unités du canal de type Shaker par deux de ses résidus situés de part et d'autres du feuillet β . Si on considère cette face de la toxine comme étant rigide, la longueur du feuillet β devient prépondérante pour la spécificité d'action des toxines. De ce point de vue, la différence de sensibilité des canaux de type BK à la longueur du feuillet par rapport aux canaux de type Kv fait entrevoir des différences fondamentales au niveau de leur embouchures externes. Le docking de NxTX et IbTX sur un modèle de l'embouchure externe du canal BK montre que la longueur plus importante du feuillet β de la NxTX crée un encombrement stérique défavorable (Dr. Ying Duo-Gao, Merck Research Laboratories, communication personnelle).

Article II

Recombinant production and solution structure of PcTx1, the specific peptide inhibitor of ASIC1a proton-gated cation channels

Cédric Bernard, Pierre Escoubas, Gérard Lambeau, Michel Lazdunski and Hervé Darbon

Soumis à Journal of Biological Chemistry

Sécrétée par la tarentule sud-américaine *Psalmopoeus cambridgei*, la psalmotoxine 1 (PcTx1) est composée de 40 résidus et a été caractérisée pour son aptitude à bloquer une sous-classe des canaux ASIC (pour « acid sensing ionic channel », appartenant à la classe des canaux pH-dépendants). PcTx1 est totalement spécifique du canal ASIC1a ($IC_{50} = 0,9nM$) tout en n'ayant aucune affinité pour le variant ASIC1b (Escoubas et coll., 2000). Cette capacité de discrimination entre ces deux variants ASIC1a et ASIC1b trouve sa source au niveau de la divergence de séquence entre ces deux canaux, divergence très bien localisée puisque ces deux canaux ne diffèrent que par une région de 113 aminoacides, située juste après le premier segment transmembranaire, région manquante pour le variant ASIC1b (Waldmann et coll., 1997; Chen et coll., 1998). De prime abord, Il est ainsi logique de prédire que PcTx1 interagit avec le canal ASIC1a au niveau de cette région de 113 résidus. Nous avons résolu la structure tridimensionnelle de la psalmotoxine 1 par RMN bi-dimensionnelle du proton. Cette structure s'organise autour du motif ICK, soit un nœud de cystéines intimement associé à un feuillet β à deux brins anti-parallèles. L'analyse de la surface moléculaire combinée au calcul du moment dipolaire nous a permis de dégager certains éléments structuraux qui pourraient être cruciaux pour la fixation de PcTx1 sur les canaux ASIC1a. Ces résultats sont présentés dans le manuscrit suivant, soumis pour publication.

Recombinant Production and Solution Structure of PcTx1, the Specific Peptide Inhibitor of ASIC1a Proton-Gated Cation Channels

Cédric Bernard^{2§}, Pierre Escoubas^{1,3§}, Gérard Lambeau¹, Michel Lazdunski^{1*} and Hervé Darbon^{2*}

1- Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 6097, 660 Route des Lucioles, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France.

2- AFMB, CNRS UMR 6098 and Universités d'Aix-Marseille I and II, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France.

3- Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Running Head: Solution structure of Psalmotoxin 1

Keywords: NMR, spider toxin, structure determination, ICK, ASIC

Abstract

ASIC channels are thought to be important ion channels particularly for the perception of pain. Some of them may also contribute to synaptic plasticity, learning and memory. Psalmotoxin 1 (PcTx1) the first potent and specific blocker of the ASIC1a proton-sensing channels, has been successfully expressed in the *Drosophila melanogaster* S2 cells recombinant expression system used for the first time for a spider toxin. The recombinant toxin was identical in all respects to the native peptide and its three-dimensional structure in solution was determined by means of ¹H 2D NMR spectroscopy. Surface characteristics of PcTx1 provide insights on key structural elements involved in the binding PcTx1 to ASIC1a channels. They appear to be localized in the two β -sheets and the β -turn linking them, as indicated by anisotropy calculations, surface charge distribution and the presence of residues known to be implicated in channel recognition of ICK toxins.

Introduction

Venoms of snakes, frogs, scorpions, spiders, cone snails, sea anemones and some insects contain highly complex mixtures of bioactive peptides, many of which act primarily against ion channels. Peptide toxins isolated from these venoms have been invaluable tools for structural and physiological investigations of voltage-dependent Na⁺, Ca²⁺ and K⁺ ion channels as well as for mechanosensitive channels [1-3].

Numerous three-dimensional structures of peptide toxins acting on ion channels have been solved [4]. These peptides comprise ca 15 to 70 amino acids and they are usually reticulated by disulfide bridges. A large number of the peptides studied to date conform to two major structural motifs. The first one is the cystine stabilized α/β scaffold (CS $\alpha\beta$) comprising a short α -helix and a double or triple stranded antiparallel β -sheet stabilized by three (rarely four) disulfide bridges. This structural organization is essentially found in scorpion venom toxins acting on voltage-sensitive K⁺ and Na⁺ channels [5]. The second type is the inhibitor cystin knot (ICK) motif which comprises several loops that emerge from a double- or triple-stranded antiparallel β -sheet structure reticulated by at least three disulfide bridges [6,7]. Two of the disulfide bridges form a ring including the amino acid backbone, and this ring is penetrated by a third disulfide bridge. The ICK motif is widespread in animals, plants and fungal proteins, and has been mainly associated with inhibitory activities [4]. Animal toxins structurally organized around this motif were characterized from cone snails and spider venoms [3,7-10]. In these peptides, the ICK fold is associated with a wide pharmacological profile as these toxins have

* Authors to whom correspondence should be addressed: H. Darbon, Tel: +33 (0)4-91-16-45-35, Fax: +33 (0)4-91-16-45-36, e-mail: herve@afmb.cnrs-mrs.fr and M. Lazdunski, Tel: +33 (0)4-93-95-77-02, Fax: +33 (0)4-93-95-77-04, e-mail: ipmc@ipmc.cnrs.fr

§ Both authors have made equal contributions to this work

The PDB coordinate files have been deposited in the Brookhaven Data Bank (PDB code 1LMM).

Abbreviations: PcTx1: psalmotoxin 1; NOESY: Nuclear Overhauser effect spectroscopy; TOCSY: Total correlation spectroscopy; COSY: Correlation spectroscopy; CNS: Crystallography and NMR System; ICK: Inhibitor cystin knot

been demonstrated to act against voltage-dependent Na⁺ [11,12], K⁺ [13-16] and Ca²⁺ [1,17] channels as well as against ryanodine-sensitive calcium channels [18]

Acid sensing ion channels (ASIC) activated by a drop in external pH, have been identified in the 80's and cloned recently [19]. The predicted membrane topology of ASICs indicates a large extracellular loop connecting two transmembrane domains with the amino and carboxyl termini inside the cell. This class of proton-gated cationic channels appears to be involved in brain function and nociception [20-23]. Several ASIC subunits and several splice variants have now been described : ASIC1a [19], ASIC1b [24], ASIC2a [19,25], ASIC2b [26], ASIC3 [27] and ASIC 4 [28]. The different subtypes produce channels with different kinetics, external pH sensitivities, and tissue distribution [23,29-30]. These different subunits can form homo and heteromultimers in both the central nervous system and in nociceptors [23].

Pharmacology will be essential to understand the exact role of these channels in brain function and in nociception. Amiloride blocks the inactivating phase of all these channels but it does so at relatively high concentrations at which the drug also blocks other transport systems.

The first potent and specific blocker of ASIC1 channels is psalmotoxin 1 (PcTx1). It has been characterized from the venom of the South American tarantula *Psalmopoeus cambridgei* [31] and it very specifically blocks homomultimers of ASIC1a. Its has been essential in characterizing the proportion and role of these homomeric assemblies of ASIC1a in different neuron types [31-]. The primary sequence of PcTx1 was found to be related to that of other ICK peptide toxins previously identified in spider venom as inhibitors of voltage-dependent calcium or potassium channels. This paper reports the recombinant production of PcTx1 in *Drosophila melanogaster* S2 cells, and its solution structure by means of ¹H 2D NMR spectroscopy.

Materials and methods

Preparation of Recombinant PcTx1

A synthetic gene coding for the mature PcTx1 protein was designed based on the protein sequence of purified PcTx1 [31]. Since the strategy was to produce PcTx1 in *Drosophila* S2 cells, the codon usage for *Drosophila*

highly expressed genes found in the GCG package database was used to design the PcTx1 gene. The synthetic gene was fused to the signal peptide (MKFLVNVALVFMVVYISYIYA) of mellitin, a highly expressed bee venom peptide to allow for the efficient secretion of PcTx1 into cell medium. To prepare the PcTx1 synthetic gene, two long partially overlapping oligonucleotides of 91 and 88 bases (2 µg each) were annealed and elongated using a high fidelity *Pwo* polymerase (Roche Molecular Biochemicals) in a reaction volume of 50 µL. Annealing, elongation, and denaturation steps were performed at 50°C, 72°C, and 95°C for 30 sec each for a total of 10 cycles. Forward and reverse PcTx1 primers were: 5'-tcgtgtacatttcttacatctatgcg-GAGGACTGCATCCCCAAGTGGAAAGGGCTGC GTGAACCGCCACGGCGACTGCTGCGAGGGC CTGGA-3', 5'-aaagtcgactattaGGTCTTGGGG-GTCTTGGGCACGCACACCTCGAAGGAGCGG CGGCGCTTCCAGCACTCCAGGCCCTCGCAG CAGT-3'. Bases in lowercase letters of the forward primer code for the 3'-end of the mellitin signal peptide and contain a BsrGI restriction site. Those in the reverse primer code for a stop codon followed by a Sall restriction site. Bases in uppercase letters in the two primers code for the entire PcTx1 protein sequence. After analysis on a 3% agarose gel and purification with the wizard PCR prep kit (Promega), the PcTx1 DNA fragment was ligated into a pGEM-T easy vector (Promega) in which the mellitin signal peptide containing the BsrGI and Sall restriction sites had been previously ligated. After sequencing, the DNA construct was subcloned into the *Drosophila* expression vector pMT/V5-His (InvitroGen) to allow for the recombinant expression of PcTx1 in S2 cells according to the InvitroGen *Drosophila* expression system. The sequence of the complete PcTx1 synthetic gene is available from the authors upon request. S2 cells were grown at 24-27°C in *Drosophila*-SFM medium (InvitroGen #10797-025) supplemented with 1% fetal bovine serum and antibiotics (InvitroGen #15240-021). After sequencing, the expression plasmid PcTx1-pMT/V5-His and a plasmid carrying a G418-resistance selection cassette were co-transfected into *Drosophila* S2 cells using Ca²⁺/PO₄. The Ca²⁺/PO₄-DNA precipitate was incubated with cells for 4 hours, after which the cells were washed by centrifugation and incubated into fresh medium. Two days after transfection, G418 sulfate (2mg/ml) was added to the cell culture medium to select

stably transfected cells. Fresh selection medium was added every 4-5 days. Five days after transfection and 4 weeks after selection, PcTx1 expression was examined by evaluating the presence of PcTx1 in the cell medium. For this test, cells were plated at 3×10^6 cells/ml in 24-well plates and induced one day later with 500 μ M CuSO₄ for 3 to 7 days. Fifty microliters of cell medium were loaded on a C18 ZipTip® (Millipore, USA) to remove salts, and the presence of PcTx1 was determined by MALDI-TOF mass spectrometry. For large scale production of PcTx1, stably transfected cells were seeded into 500 ml of complete medium at a density of $2-3 \times 10^6$ cells/ml in 1-liter spinner flasks (Integra Biosciences). Upon reaching a density of $5-6 \times 10^6$ cells/ml, cells were induced with 500 μ M CuSO₄. Three to four days after induction, the cells were spun down and the medium was collected for further purification of PcTx1.

Recombinant toxin purification and characterization

Drosophila S2 cell culture medium (12 liters total) was centrifuged at 5000 rpm / 30 min and the supernatant (1L) was then diluted two-fold with equilibration buffer (H₂O / 10% acetonitrile / 1% acetic acid) and treated overnight in batch mode with SP Sephadex C25 cation-exchange resin (Amersham Pharmacia Biotech, Sweden) prealably washed and equilibrated in 1M ammonium acetate (300 mL per liter). After a washing step with the equilibration buffer, two elution steps were performed with 0.4M ammonium acetate/10% acetonitrile and 1.5M ammonium acetate/10% acetonitrile. After a 2-fold dilution with water and acidification with TFA to pH 3.0, the last elution volume was treated in batch mode with C18 reversed-phase silica (20-43 μ m, 100 mL per liter) (Merck, Germany) prealably washed and equilibrated in 0.1% TFA. After a washing step (H₂O / 0.1% TFA), three consecutive elution steps (500 mL each) were done with 5%, 10% and 50 % aqueous acetonitrile in constant 0.1% TFA. The last elution volume was diluted three-fold with water and freeze-dried.

Throughout the batch purification scheme, the presence of recombinant PcTx1 was monitored in all fractions by analysis of a small aliquot by MALDI-TOF MS in linear mode. For diluted fractions, capture of sufficient material was achieved via the use of ZipTip® microconcentrating devices

(Millipore, USA) prior to mass spectrometry analysis.

Further purification was performed by cation-exchange HPLC on a semi-preparative SP5PW column (Tosoh, Japan) equilibrated with 10% aqueous acetonitrile / 1% acetic acid, using a linear gradient of 0 to 90% of 2M ammonium acetate / 10% acetonitrile (1%/min), at 6 mL/min. Purified fractions from several HPLC runs were pooled, freeze-dried and a final purification step was done by reversed-phase HPLC on a C18 semi-preparative column (Nacalai Tesque, Japan), using a linear gradient of acetonitrile / 0.1% TFA in water / 0.1%TFA (5 to 35% acetonitrile in 60 min., 2 mL/min.).

Full characterization of recombinant PcTx1 was achieved by automated N-terminal Edman sequencing on an Applied Biosystems Procise gas-phase sequencer, monoisotopic molecular weight analysis by MALDI-TOF MS and HPLC co-elution experiments with the native toxin. Coelution of recombinant and native PcTx1 was performed by cation-exchange on a SP5PW column (Tosoh, Japan) using a gradient of 20mM / 2M ammonium acetate (0 to 50% in 50 min, 0.5 mL/min) and by reversed-phase on a Merck Purospher STAR 55-4 column, using a linear gradient of acetonitrile in water (constant 0.1% TFA) at 1 mL/min and 0 to 35 % acetonitrile / min over 35 min.

MALDI-TOF mass spectrometry

Peptides or HPLC fractions mixed with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (α -CHCA, Aldrich, USA) matrix (10 mg/mL) were analyzed on an Applied Biosystems Voyager DE-Pro system in positive reflector (pure peptides) or linear (fractions) mode. Mass spectra (200-300 scans) were calibrated with external or internal standards and analyzed in the Data Explorer software.

Electrophysiological characterization

COS cells, at a density of 20.000 cells per 35 mm diameter petri dish, were transfected with a mix of CD8 and PCI-ASIC1a plasmids (1:5) using the DEAE-Dextran method. Cells were used for electrophysiological measurements one to three days after transfection. Successfully transfected cells were recognized by their ability to fix CD8-antibody-coated beads (Dynal, Norway). Ion currents were recorded on transfected COS cells using either the whole-cell or outside-out patch-clamp technique and results stored on hard disk. Data analysis was

carried out using the Serf freeware (<http://ipmc.cnrs.fr/~deweille/serf.html>). Statistical significance of differences between sets of data was estimated by the single-sided Student test. The pipette solution contained (in mM): KCl 140, MgCl₂ 2, EGTA 5, HEPES 10 (pH7.2). The bath solution contained (in mM): NaCl 140, KCl 5, MgCl₂ 2, CaCl₂ 2, HEPES 10 (pH7.3). Changes in extracellular pH were induced by shifting one out of six outlets of a microperfusion system in front of the cell or patch. Experiments were carried out at room temperature (20-24°C). Recombinant PcTx1 was applied at a single concentration of 10 nM.

Sample preparation for NMR

Recombinant PcTx1 (4 mg) was solubilized in 450 μ l of a H₂O / D₂O mixture (9:1 v/v), to give a protein concentration of 2.9 mM at a pH of 3.0. The amide proton exchange rate was determined after lyophilization of this sample and dissolution in 100% D₂O.

NMR experiments

All ¹H NMR spectra were recorded on a BRUKER DRX500 spectrometer equipped with a HCN probe and self shielded triple axis gradients were used. The experiments were performed at two different temperatures in order to solve assignment ambiguities (283 K and 300 K). Two-dimensional spectra were acquired using states-TPPI method to achieve F1 quadrature detection]. Water suppression was achieved using presaturation during the relaxation delay (1.5 s), and during the mixing time in the case of NOESY experiments [], or using a watergate 3-9-19 pulse train using a gradient at the magic angle obtained by applying simultaneous x-, y- and z- gradients prior to detection. NOESY spectra were acquired using mixing times of 100 ms and 120 ms. TOCSY was performed with a spin locking field strength of 8 kHz and spin lock time of 80 ms. The amide proton exchange experiments were recorded immediately after dissolution of the peptides in D₂O. A series of NOESY spectra with a mixing time of 80 ms were recorded at 283K, the first one for one hour, followed by spectra of 4 hours each.

The identification of amino acid spin systems and the sequential assignment were done using the standard strategy described by Wüthrich [32] and regularly used by our group [14,18,33], with the graphical software

XEASY [34]. The comparative analysis of TOCSY spectra recorded in water gave the spin system signatures of the protein. The spin systems were then sequentially connected using the NOESY spectra.

The integration of NOE data was done by measuring the peak volumes using a specific routine of the XEASY package. These volumes were then translated into upper limits distances by the CALIBA routine of the DIANA software [35]. The lower limit was systematically set at 0.18nm.

The ϕ torsion angles constraints resulted from the ³J_{HN-H α} coupling constant measurements. They were estimated with the INFIT program [36]. For a given residue, separated NOESY cross-peaks with the backbone amide proton in the ω 2 dimension were used. Several cross-sections through these cross-peaks were selected that exhibited a good signal-to-noise ratio. They were added up and only those data points of the peak region that were above the noise level were retained. The left and right ends of the peak region were then brought to zero intensity by linear baseline correction. After extending the baseline-corrected peak region with zeros on both sides, which is equivalent to oversampling in the time domain, an inverse Fourier transformation was performed. The value of the ³J_{HN-H α} coupling constant was obtained from the first local minimum. ³J_{HN-H α} coupling constants were translated into angle restraints using HABAS from the DIANA package.

Structure calculation

Distance geometry calculations were performed with the variable target function program DIANA 2.8. A preliminary set of 1,000 structures was initiated including only intra-residual and sequential upper limit distances. From these, the 500 best as shown by the value of the target function were kept for a second round including medium range distances. The resulting 250 best were kept for a third round, using the whole set of upper limits restraints and some additional distance restraints to define the disulfide bridges (i.e. dS γ ,S γ 0.21nm, dC β ,S γ and dS γ ,C β 0.31nm). Starting from the 100 best structures, one REDAC cycle [35] was used in a last step in order to include the dihedral constraints together with the additional distances restraints coming from hydrogen bonds.

To remove residual bad Van der Waals contacts, the 30 best structures were refined

by restrained molecular dynamics annealing, slow cooling and energy minimisation (parameter file: protein-allhdg in CNS). Visual analysis was done using the TURBO software [37] and the geometric quality of the obtained structures was assessed by PROCHECK 3.3 [38] and PROCHECK-NMR software [39].

Results and Discussion

Recombinant production

A pilot batch of PcTx1 production (2L S2 cell culture supernatant) demonstrated the presence of active recombinant PcTx1 (PcTx1r) and allowed the optimization of the purification procedure. Treatment of a larger batch (12L cell culture supernatant) permitted the production of 5.5 mg of final purified PcTx1r. Throughout the purification scheme, MALDI-TOF analysis of the chromatographic fraction allowed easy monitoring of the presence of PcTx1 as indicated by observation of a peptide ion at m/z 4690 in linear mode. The purified recombinant toxin coeluted with the native toxin in two separate, orthogonal chromatographic systems. Its full sequence and measured molecular mass (4686.19 Da, monoisotopic) corresponded to the sequence and calculated molecular mass (4686.18 Da, 2.83 ppm accuracy) of native PcTx1. Final quantification of the toxin was done by optical density measurement at 280 nm, using a calculated ϵ_{280} of 11740. Electrophysiological activity of recombinant PcTx1 against heterologously expressed ASIC1a was the same as that of native and synthetic toxins [3] with full ASIC1a current inhibition at 10 nM (pH5).

A correctly folded, active form of the PcTx1 toxin can thus be produced in the *Drosophila* S2 cell expression system, in amounts compatible with the quantity requirements of 2-D NMR analysis and of physiological experiments. Other recombinant production procedures have been used for small peptide toxins. As most toxins are reticulated by disulfide bridges, they have been produced either as linear peptides which have to be reoxidized *in vitro* or in their native, refolded form. Clearly the latter is most desirable as *in vitro* reoxidative formation of disulfide bridges can be challenging, in particular for peptide toxins conforming to the ICK fold.

RMSD (Å)			
Region 1-40			
Backbone	2.51 +/- 0.51		
All heavy atoms	3.58 +/- 0.48		
Region 6-35			
Backbone	1.68 +/- 0.36		
All heavy atoms	2.92 +/- 0.48		
Region 6-9,18-25,31-35			
Backbone	0.90 +/- 0.22		
All heavy atoms	1.95 +/- 0.36		
ENERGIES (kcal/mol)		(DG)	<DG>
Total		82.89	85.01
Bonds		6.9	7.11
Angles		30.96	31.46
Improper		3.61	3.53
van der Waals (repel)		16.72	17.87
nOe		24.64	24.98
cdih		0.04	0.06
RMSD			
Bonds		0.0033	0.0033
Angles		0.420	0.417
Improper		0.269	0.258
Dihedral		31.180	31.306
NOe		0.029	0.028
CdiH		0.141	0.137

Table 1. Structural Statistics of the 20 Best Structures (DG) are the final 20 PcTx1 structures obtained by distance geometry and minimization. <DG> is the minimized mean structure obtained by averaging the coordinates of the individual DG structures best fitted to each other.

This is probably related to the higher flexibility of the peptide chain when compared to the $\alpha\beta$ hairpin fold of scorpion toxins which readily refold *in vitro*. Examples of recombinant production of linear peptides followed by *in vitro* disulfide formation include potassium channel scorpion toxins produced in *E. coli* [Park, 1991 #84], huwentoxin I [40] and the J-atracotoxins [41] produced as glutathione-S-transferase fusion proteins. Although production yields can be up to 10-20 mg/L [40], the refolding step is usually the limiting factor in obtaining sufficient amounts of correctly refolded, active toxin, as the refolding yield can be less than 10% of the original product.

Other approaches have permitted the production of soluble, folded forms of the toxins in *E. coli* expression systems using a thioredoxin reductase deficient strain [42] or as a fusion protein with two protein A IgG binding domains (ZZ) which leads to periplasmic expression of refolded toxins [43,44]. A yeast expression system has also been used successfully with yields in the 8-10 mg/L range [45].

Methods leading to production of the reduced toxins, whether by chemical synthesis or recombinant means, often have the advantage of reduced costs and higher initial yields. However, our experience with refolding of synthetic PcTx1 and other ICK spider peptide toxins has shown that using standard refolding conditions in redox buffers, the correct disulfide bridge pairing may be very difficult (Escoubas et al., unpublished data), yielding amounts of toxin not compatible with structural and physiological studies. Recombinant production of correctly folded toxins thus offer significant advantages. Several drawbacks of the methodology include the use of fusion proteins which need to undergo proteolytic or chemical cleavage, resulting in lower final yields and sometimes leaving undesired residues in the toxin sequence [46], as well as the difficulty in obtaining correct post-translational modifications, often necessary for toxin activity. Although results are highly sequence dependent, the recombinant approach appears to offer advantages over chemical synthesis for ICK peptides, in particular for mutagenesis studies. In this respect, the *Drosophila* S2 system which has been used here for the first time for an ICK spider toxin has proved to be an appropriate expression system which holds promise for further production of short arthropod toxins.

Finally, MALDI-TOF monitoring of the purification process has proven to be a rapid, sensitive and reliable method for the assessment of toxin production and integrity.

NMR resonance assignment

Sequential assignment was obtained by the now standard method first described by Wüthrich [32] and successfully applied to various arthropod toxins such as HpTx2,



Figure 2: Sequence of PcTx1 and sequential assignment. Collected sequential nOe are classified into strong and weak nOe and are indicated by thick and thin bars respectively. The secondary elements (β -sheets) are indicated by arrows.

Ptu1 and Maurocalcine respectively from the spider *Heteropoda venatoria*, the assassin bug *Peirates turpis* and the scorpion *Scorpio maurus* [14,18,33]. The spin systems were identified on the basis of both COSY and TOCSY spectra recorded at 300 and 283K.

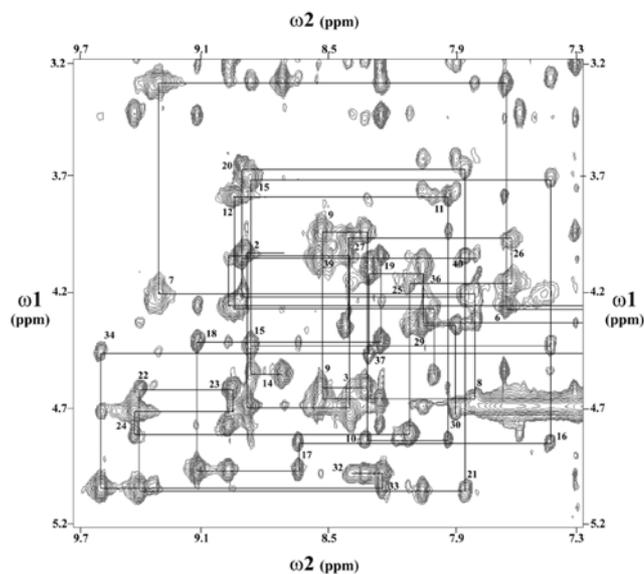


Figure 1: Contour plot of the fingerprint region of a NOESY spectrum recorded at 300 K. The sequential H_{α}/H_N connectivities are illustrated by lines.

The use of two temperatures for recording allowed us to resolve overlapping signals in the fingerprint region, and thus intraresidue H_N-H_{α} cross peaks were unambiguously assigned. At the end of the sequential assignment procedure, almost all protons were identified and their resonance frequency determined (BMRB ID 5495). Figure 1 presents the result of the sequential H_{α}/H_N correlations found on the NOESY spectrum. As shown by the repartition of the H_{α}/H_N and H_N/H_N correlations, the toxin is essentially organized in loops, besides three extended regions characterized by strong H_{α}/H_N correlations (Fig 2).

Structure calculation

The structure of PcTx1 was determined by using 374 nOe-based distance restraints, including 195 intra-residue restraints, 111 sequential restraints, 24 medium range restraints and 44 long range restraints. The repartition of these nOe along the sequence is shown in Figure 3. In addition, 12 hydrogen bond restraints and 21 dihedral angle constraints deriving respectively from proton exchange and coupling constants have been included, as well as 9 distance restraints derived from the three disulfide bridges which have been deduced by homologies with related spider toxins [3]. Altogether, the final experimental set corresponded to 10.4 constraints per residue on the average. The structures were calculated with DIANA using a distance geometry protocol, and energy minimized by CNS. The best-fit superimposition of backbone atoms for the 20 best structures gives RMSD values of 2.51 +/-0.51 Å for backbone atoms and 3.58 +/-0.40 Å if all non-hydrogen atoms are included. These rather high values are explained by the existence of structurally undefined N- and C-termini and two flexible regions encompassing residues 10 to 17 and 26 to 30. A summary of the structural statistics and the values of RMSD calculated on the well-defined regions are given in Table 1. All the solutions have good non-bonded contacts and good covalent geometry as shown by the low values of CNS energy terms and low RMSD values for bond lengths, valence angles and improper dihedral angles. Correlation with the experimental data shows no nOe-derived distance violation greater than 0.2 Å. The analysis of the Ramachandran plot for the ensemble of the 20 calculated models (in PROCHECK software nomenclature) shows 92,5% of the residues in the most favored and additional regions, 7.5% in the generously allowed regions, and none in the disallowed regions (data not shown).

Structure description

The three-dimensional structure (PDB accession code: 1LMM) of PcTx1 consists of a compact disulfide-bonded core from which three loops and the N- and C-termini emerge. Figure 4 shows a stereopair representation of the best-fit superimposition of the C α traces of the 20 best structures. The main element of secondary structure is a three-stranded antiparallel β -sheet comprising residues 21-24 and 31-34. Two of the three strands are

stabilized by NH/CO hydrogen bonds involving amide protons from residues 22, 24, 32 and 34 and are well detected by the PROCHECK-NMR software. The third peripherally extended strand composed of residues 7 to 9 is very poorly defined and is

not detected by the PROCHECK-NMR

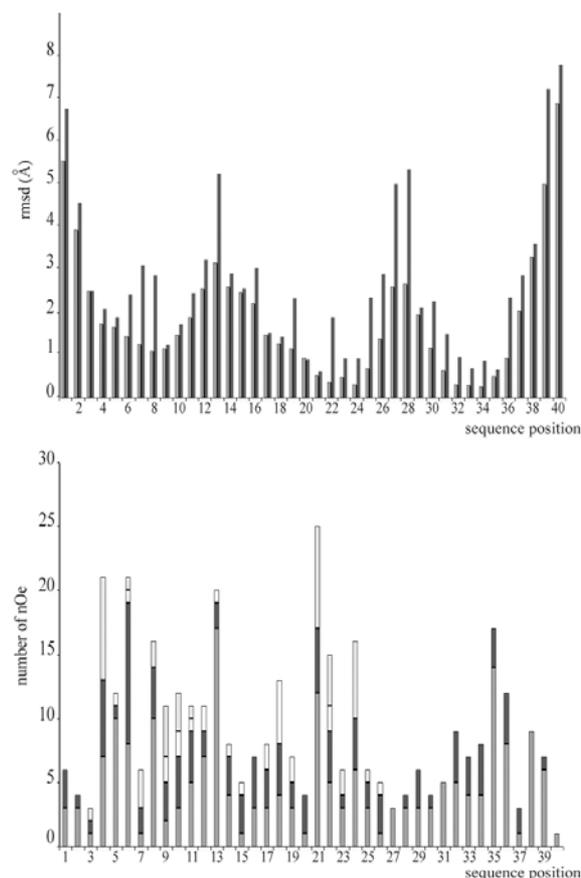


Figure 3: RMSD (top) and nOe (bottom) distribution vs sequence. RMSD values for backbone atoms and all heavy atoms are in grey and black respectively. Intraresidue nOe are in dark grey; sequential nOe are in black, medium nOe are in light grey and long range nOe are in white.

software. Nevertheless, the existence of HN₈-HN₃₃, H α ₉-H α ₃₂ correlations and the fact that the amide proton of residue 33 is in slow exchange (engaged in an hydrogen bond with the carbonyl group of residue 8) allowed us to describe this region as the third strand of the β -sheet. Overall, the structure shows a strong geometric anisotropy and can be related to a truncated cone.

Analysis of the overall charge distribution of PcTx1 reveals a marked electrostatic anisotropy. This can be represented by a dipole moment, which is collinear to the geometric main axis of the molecule. It emerges from the turn between the second

and the third β -sheet strands, essentially composed of basic residues (Lys²⁵, Arg²⁶, Arg²⁷ and Arg²⁸). This positive patch is surrounded on its top by three aromatic residues (Trp⁷, Trp²⁴ and Phe³⁰). Another ring of four basic residues lies on top of the aromatic residues (Fig 4).

Comparison with related toxins

The PcTx1 fold can be classified as a *inhibitor cystine knot* (ICK) fold already described for numerous toxic and inhibitory animal venom peptides [7]. It fits into the class of small disulfide-bridged peptides classified as knottins in the SCOP database (<http://scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/data/scop.b.h.d.html>).

Many ion channels effectors from marine snails, spider and scorpion venoms share the same ICK fold although they possess widely different pharmacological profiles [1,3,4,7,] (Fig. 5). PcTx1 is active on ASIC1a channels whereas the marine snail toxins μ -conotoxin GIII [48] and conotoxin GS [12] are active on muscle Na⁺ channel, similarly to the spider peptides μ -agatoxin I [49], the δ -palutoxins [50], and the δ -atracotoxins [51]. By contrast, κ -conotoxin PVIIA from cone snails [15,16], hanatoxins, HpTx2 and stromatoxins respectively from the spiders *Grammostola spatulata* [52], *Heteropoda venatoria* [14] and *Stromatopelma calceata* [54] act against voltage-dependent K⁺ channels. Other ICK toxins have been reported to act on Ca²⁺ channels, such as the ω -conotoxins MVIIA [55-56] and GVIA [57], ω -agatoxins IVA and IVB [58-59], huwentoxin [60-], SNX482 [61], ω -GsTx SIA [62] and the ω -atracotoxins [63] respectively from the venoms of the spiders *Agelenopsis aperta*, *Selenocosmia huwena*, *Hysteroocrates gigas*, *Grammostola spatulata* and *Hadronyche ssp*, Ptul1 from saliva of the assassin bug *Peirates turpis* [33] maurocalcine from the scorpion *Scorpio maurus* [18] or the PMP family of peptides from *Locusta migratoria* [64]. More recently, the ICK fold has also been associated to the ability of the spider peptide toxins GsMTx-4 and GsMTx-2 to block mechanosensitive cationic ion channels in heart cells [65].

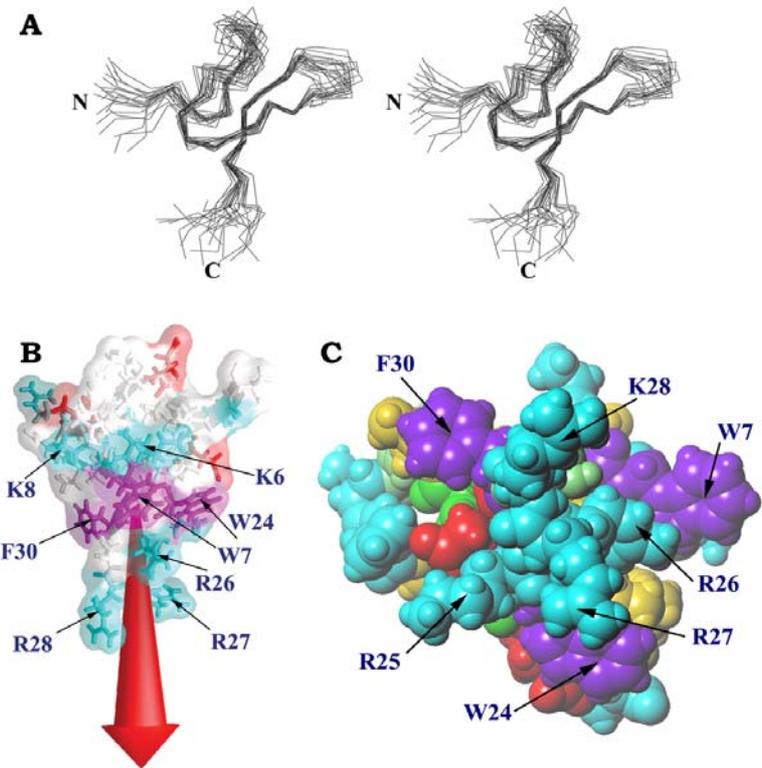


Figure 4: **A:** Stereo view of the best fit of 20 solution structures of PcTx1. C α are shown. The N and C termini are labeled (N and C) **B:** Molecular surface colored according to the electrostatic charge (red for acidic and blue for basic) and the resulting dipolar moment (red arrow). The aromatic residues are indicated and colored in purple. **C:** CPK representation of the proposed functional surface of PcTx1. The residues suspected to be important for the interaction of the toxin with the channel are labeled. Residues are colored as follow: green for polar uncharged residues, blue for basic residues, red for acidic residues, purple for aromatic residues and yellow for aliphatic residues.

In addition, the ICK fold has also been associated to other inhibitory functions such as phenoloxidase inhibition in houseflies [66-] and antimicrobial activity in horseshoe crab hemocytes [67] or spider venom [68].

PcTx1 has a unique pharmacology, which distinguishes it from all other ICK toxins. Although its overall structure fits into the canonical ICK fold and the disulfide bridge pairing is identical to that of related Ca²⁺, Na⁺ and K⁺ channel toxins, its selectivity and mode of action are totally different and place it in a pharmacological class of its own. Previous results [3] demonstrated that PcTx1 has a total selectivity for the homomultimeric ASIC1a channel subtype and does not affect other ion channels, including other subtypes or heteromultimeric assemblies of ASIC subunits. PcTx1 perfectly illustrates the often mentioned capability of the ICK fold reticulated by a 3-disulfide or 4-disulfide

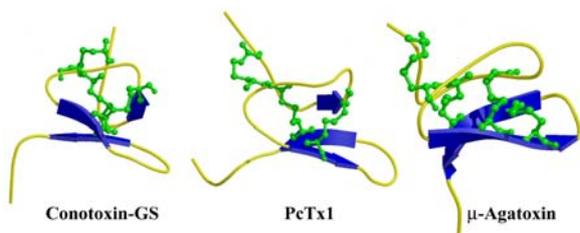


Figure 5: Comparison of three-dimensional structures of structurally related toxins blocking Na⁺ channels with PcTx1 in Molscript representation (Kraulis, 1991).

scaffold to bear a variety of pharmacological activities through selective mutagenesis of the solvent-exposed loops. This evolutionary mechanisms leading to the extraordinary pharmacological diversity of venom peptides has been extensively studied in cone snails [69], and a similar model appears to fit the molecular diversity of spider venoms peptides.

Functional surface of PcTx1

To analyze the putative functional surface of peptide toxins, we used a prediction method based on the orientation of the dipole moment resulting from the electrostatic anisotropy of the toxin. The dipole is used as a guideline to predict a putative functional surface. The highly undefined N- and C-termini (residues 1, 2 and 38 to 40) were not included in the calculation of the dipole of PcTx1, but it was clearly the same as the dipole calculated for the averaged complete molecule. Assuming that the dipole may work as an orientation force in the electric field of the receptor [14,18,70], a proposed functional surface for PcTx1 is represented in Figure 4. Two possible sites of action for peptide toxins blockade of ion channels have been proposed. Current inhibition may result from pore occlusion as observed for the scorpion and cone snail toxins blocking voltage-dependent potassium channels, or via steric hindrance of ion conduction by binding at the mouth of the pore. The latter has been proposed as the binding mechanism of voltage gating modifiers such as the hanatoxins, which might also impede the movement of ion channel transmembrane segments in response to a depolarizing voltage and therefore affect ion conduction. Recent work supports the “hot spot” model of protein-protein interaction [41] for toxin binding to ion channels. The hot spot on the toxin surface has been proposed to involve a functional diad comprising a critical Lysine residue involved in pore blocking and a

neighboring aromatic residue such as Tryptophan or Phenylalanine [71].

This toxin-channel interaction model has been validated by mutagenesis studies on scorpion [18,71], cone snails [15,16], sea anemone [72] toxins and more recently the J-atracotoxins insecticidal spider peptides [41]. As novel peptides are described and characterized, evidence is mounting to support the crucial role of the functional diad, as this structural motif appears to be found in various channel inhibitors such as snake dendrotoxin, charybdotoxin, agitoxin, noxiustoxin and related scorpion peptides [71], the newly discovered κ-hefutoxins [73], κ-conotoxin [15-], BgK from sea anemones [72]. All these toxins block ion channels through pore occlusion.

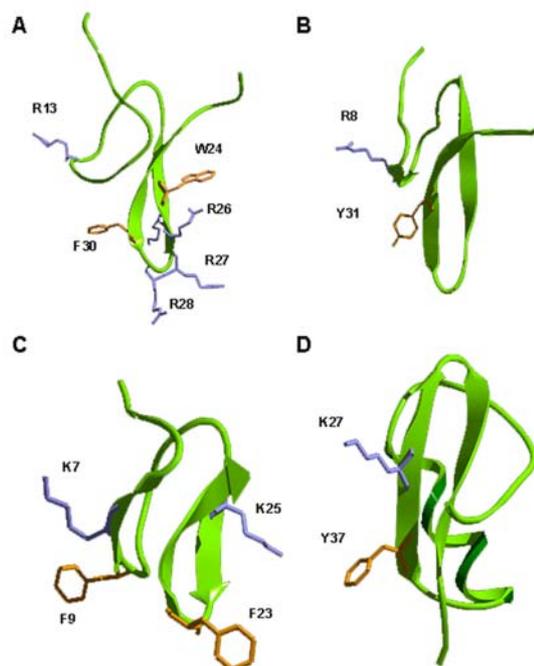


Figure 6: Comparison of putative functional diads of PcTx1 and related ICK toxins : (A) PcTx1, (B) J-Atracotoxin (C) κ-CTX PVIIA (D) Agitoxin 2.

Another toxin-channel interaction model has been proposed for gating-modifier toxins such as the hanatoxins [52]. In this case, the interaction hot spot would be represented by a patch of hydrophobic residues forming a contact surface surrounded by charged residues anchoring the toxin to its target surface by engaging in salt bridges. In the hot spot model, residues surrounding the toxin hot spot are proposed to serve as “gaskets”, preventing interaction of water molecules with the target residues on the channel surface. Although the hydrophobic patch model appears to be relevant in other potassium channel blockers such as the stromatoxins [54], in those toxins a diad Lys-

Phe can also be found although no mutagenesis data is available to validate its relevance.

Examination of the structure of PcTx1 reveals that it does not conform to the hydrophobic patch model but that it bears a considerable number of positively charged residues in the β -turn linking the two β -sheets (loop 4). The stretch K₂₅R₂₆R₂₇R₂₈ actually forms a contiguous positive surface protruding from the rest of the molecule (Fig. 4). Additionally, three aromatic residues (Trp₇, Trp₂₄ and Phe₃₀) can be found in the vicinity of the basic residues and could possibly be involved in the formation of functional diads equivalent to that of other ion channel toxins. Judging from interatomic distances, actually only the diad Arg₂₆/Trp₂₄ (6.8 Å) would fit the proposed pattern in which distances between the basic and aromatic residues vary between 5.8 and 7.6 [73]. Arg₂₈ and Phe₃₀ are actually further apart (14 Å) in the PcTx1 structure. Figure 6 shows the structural similarity of basic and aromatic residues side chains in several of these toxins. Loop 4 in PcTx1 thus appears as a potentially important structural feature, in accordance with the anisotropy data presented above. We propose that the positively charged patch formed mostly by residues K₂₅-R₂₈, accompanied by aromatic side chains and other surrounding hydrophobic or negatively charged residues could form the channel recognition surface of PcTx1. It should be noted that negatively charged residues are located primarily in the N-terminal part of the peptides, and on the opposite side of the K₂₅-R₂₈ loop, forming a sort of "negative crown" above the positively charged patch.

In conclusion, we have successfully expressed the ASIC channel blocker PcTx1 in a recombinant expression system used for the first time for a spider toxin, and determined its structure in solution. Although a putative mode of action cannot be inferred solely from examination of the surface characteristics of PcTx1, key structural elements for PcTx1 binding to its receptor appear to be localized in the two β -sheets and the β -turn linking them, as indicated by anisotropy calculations, surface charge distribution and the presence of residues known to be implicated in channel recognition of ICK toxins. These results will allow the development of further research on the molecular determinants involved in

recognition of the ASIC channel binding site, and will orient selective mutagenesis studies. Since the toxin is the only known high affinity ligand for the ASIC class of channels that probably play an important role in nociception [20-23, 75-76], PcTx1 can be an important tool for devising new classes of drugs acting directly against pain at the nociceptor level. Because the ASIC1a channel is also widely expressed in brain, it is thought to be involved in numerous functions such as processes involving synaptic plasticity, learning and memory [75].

References

- 1-Olivera, B. M., Rivier, J., Scott, J. K., Hillyard, D. R., and Cruz, L. J. (1991) *J Biol Chem* **266**(33), 22067-70
- 2-Lewis, R. J. (2000) *Ther Drug Monit* **22**(1), 61-4
- 3-Escoubas, P., Diochot, S., and Corzo, G. (2000) *Biochimie* **82**(9-10), 893-90
- 4-Craik, D. J., Daly, N. L., and Waine, C. (2001) *Toxicon* **39**(1), 43-60.
- 5-Possani, L. D., Merino, E., Corona, M., Bolivar, F., and Becerril, B. (2000) *Biochimie* **82**(9-10), 861-8.
- 6-Pallaghy, P. K., Nielsen, K. J., Craik, D. J., and Norton, R. S. (1994) *Protein Sci* **3**(10), 1833-9.
- 7-Norton, R. S., and Pallaghy, P. K. (1998) *Toxicon* **36**(11), 1573-1583
- 8-Narasimhan, L., Singh, J., Humblet, C., Guruprasad, K., and Blundell, T. (1994) *Nat. Struct. Biol.* **1**(12), 850-2
- 9-McIntosh, J. M., and Jones, R. M. (2001) *Toxicon* **39**(10), 1447-51.
- 10-Rash, L. D., and Hodgson, W. C. (2002) *Toxicon* **40**(3), 225-54.
- 11-Adams, M. E., Herold, E. E., and Venema, V. J. (1989) *J Comp Physiol [A]* **164**(3), 333-42
- 12-Hill, J. M., Alewood, P. F., and Craik, D. J. (1997) *Structure* **5**(4), 571-83.
- 13-Swartz, K. J., and MacKinnon, R. (1995) *Neuron* **15**(4), 941-949
- 14-Bernard, C., Legros, C., Ferrat, G., Bischoff, U., Marquardt, A., Pongs, O., and Darbon, H. (2000) *Protein Sci* **9**(11), 2059-67.
- 15-Savarin, P., Guenneugues, M., Gilquin, B., Lamthanh, H., Gasparini, S., Zinn-Justin, S., and Menez, A. (1998) *Biochemistry* **37**(16), 5407-16.
- 16-Scanlon, M. J., Naranjo, D., Thomas, L., Alewood, P. F., Lewis, R. J., and Craik, D. J. (1997) *Structure* **5**(12), 1585-97.
- 17-Adams, M. E., Bindokas, V. P., Hasegawa, L., and Venema, V. J. (1990) *J Biol Chem* **265**(2), 861-7
- 18-Mosbah, A., Kharrat, R., Fajloun, Z., Renisio, J. G., Blanc, E., Sabatier, J. M., El Ayebe, M., and Darbon, H. (2000) *Proteins* **40**(3), 436-42.
- 19-Waldmann, R., Bassilana, F., de Weille, J., Champigny, G., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**(34), 20975-8
- 20-Kress, M., and Zeilhofer, H. U. (1999) *Trends Pharmacol. Sci.* **20**(3), 112-8
- 21-McCleskey, E. W., and Gold, M. S. (1999) *Annu. Rev. Physiol.* **61**, 835-56
- 22-Reeh, P. W., and Steen, K. H. (1996) *Prog Brain Res* **113**, 143-51
- 23-Waldmann, R., and Lazdunski, M. (1998) *Curr. Opin. Neurobiol.* **8**(3), 418-24
- 24-Chen, C. C., England, S., Akopian, A. N., and Wood, J. N. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**(17), 10240-5

- 25**-Champigny, G., Voilley, N., Waldmann, R., and Lazdunski, M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**(25), 15418-22
- 26**-Lingueglia, E., de Weille, J. R., Bassilana, F., Heurteaux, C., Sakai, H., Waldmann, R., and Lazdunski, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**(47), 29778-83
- 27**-Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C., and Lazdunski, M. (1997) *Nature* **386**(6621), 173-7
- 28**-Grunder, S., Geissler, H. S., Bassler, E. L., and Ruppertsberg, J. P. (2000) *Neuroreport* **11**(8), 1607-11.
- 29**-Garcia-Anoveros, J., Derfler, B., Neville-Golden, J., Hyman, B. T., and Corey, D. P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**(4), 1459-64
- 30**-Voilley, N., de Weille, J., Mamet, J., and Lazdunski, M. (2001) *J Neurosci* **21**(20), 8026-33.
- 31**-Escoubas, P., De Weille, J. R., Lecoq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Menez, A., and Lazdunski, M. (2000) *J Biol Chem* **275**(33), 25116-21.
- 32**-Wüthrich, K. (1986) in *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and sons, NY
- 33**-Bernard, C., Corzo, G., Mosbah, A., Nakajima, T., and Darbon, H. (2001) *Biochemistry* **40**(43), 12795-800.
- 34**-Bartels, C., Xia, T.-H., Billeter, M., Güntert, P., and Wüthrich, K. (1995) *J Biomolecular NMR* **5**, 1-10
- 35**-Güntert, P., and Wüthrich, K. (1991) *J Biomol NMR* **1**(4), 447-56.
- 36**-Szyperski, T., Güntert, P., Otting, G., and Wüthrich, K. (1992) *J Magn Reson* **99**, 552-560
- 37**-Roussel, A., and Cambillau, C. (1989) *Mountain View, CA : Silicon graphics* , 77-78
- 38**-Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. M., and Thornton, J. M. (1993) *J. Appl. Cryst* **26**, 283-291
- 39**-Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996) *J Biomol NMR* **8**(4), 477-86.
- 40**-Li, M., Li, L. Y., Wu, X., and Liang, S. P. (2000) *Toxicol* **38**(2), 153-62.
- 41**-Maggio, F., and King, G. F. (2002) *J Biol Chem* **5**, 5
- 42**-Johnson, T. M., Quick, M. W., Sakai, T. T., and Krishna, N. R. (2000) *Peptides* **21**(6), 767-72.
- 43**-Bouhaouala-Zahar, B., Ducancel, F., Zenouaki, I., Ben Khalifa, R., Borchani, L., Pelhate, M., Boulain, J. C., El Ayeb, M., Menez, A., and Karoui, H. (1996) *Eur J Biochem* **238**(3), 653-60.
- 44**-Korolkova, Y. V., Kozlov, S. A., Lipkin, A. V., Pluzhnikov, K. A., Hadley, J. K., Filippov, A. K., Brown, D. A., Angelo, K., Stroback, D., Jespersen, T., Olesen, S. P., Jensen, B. S., and Grishin, E. V. (2001) *J Biol Chem* **276**(13), 9868-76
- 45**-Wu, J. J., He, L. L., Zhou, Z., and Chi, C. W. (2002) *Biochemistry* **41**(8), 2844-9.
- 46**-Gendeh, G. S., Young, L. C., de Medeiros, C. L., Jeyaseelan, K., Harvey, A. L., and Chung, M. C. (1997) *Biochemistry* **36**(38), 11461-71.
- 48**-Wakamatsu, K., Kohda, D., Hatanaka, H., Lancelin, J. M., Ishida, Y., Oya, M., Nakamura, H., Inagaki, F., and Sato, K. (1992) *Biochemistry* **31**(50), 12577-84.
- 49**-Omeccinsky, D. O., Holub, K. E., Adams, M. E., and Reily, M. D. (1996) *Biochemistry* **35**(9), 2836-44.
- 50**-Corzo, G., Escoubas, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Kristensen, C. P., and Nakajima, T. (2000) *Eur J Biochem* **267**(18), 5783-95.
- 51**-Fletcher, J. I., Chapman, B. E., Mackay, J. P., Howden, M. E., and King, G. F. (1997) *Structure* **5**(11), 1525-35.
- 52**-Takahashi, H., Kim, J. I., Min, H. J., Sato, K., Swartz, K. J., and Shimada, I. (2000) *J Mol Biol* **297**(3), 771-780
- 54**-Escoubas, P., Diochot, S., Célérier, M.-L., Nakajima, T., and Lazdunski, M. (2002) *Mol. Pharmacol.* **62**(1), in press
- 55**-Basus, V. J., Nadasdi, L., Ramachandran, J., and Miljanich, G. P. (1995) *FEBS Lett* **370**(3), 163-9.
- 56**-Kohno, T., Kim, J. I., Kobayashi, K., Kodera, Y., Maeda, T., and Sato, K. (1995) *Biochemistry* **34**(32), 10256-65.
- 57**-Lew, M. J., Flinn, J. P., Pallaghy, P. K., Murphy, R., Whorlow, S. L., Wright, C. E., Norton, R. S., and Angus, J. A. (1997) *J Biol Chem* **272**(18), 12014-23.
- 58**-Adams, M. E., Mintz, I. M., Reily, M. D., Thanabal, V., and Bean, B. P. (1993) *Mol Pharmacol* **44**(4), 681-8.
- 59**-Mintz, I. M., and Bean, B. P. (1993) *Neuropharmacology* **32**(11), 1161-9.
- 60**-Peng, K., Chen, X. D., and Liang, S. P. (2001) *Toxicol* **39**(4), 491-8.
- 61**-Newcomb, R., Szoke, B., Palma, A., Wang, G., Chen, X., Hopkins, W., Cong, R., Miller, J., Urge, L., Tarczy-Hornoch, K., Loo, J. A., Dooley, D. J., Nadasdi, L., Tsien, R. W., Lemos, J., and Miljanich, G. (1998) *Biochemistry* **37**(44), 15353-62.
- 62**-Lampe, R. A., Defeo, P. A., Davison, M. D., Young, J., Herman, J. L., Spreen, R. C., Horn, M. B., Mangano, T. J., and Keith, R. A. (1993) *Mol Pharmacol* **44**(2), 451-60.
- 63**-Wang, X., Smith, R., Fletcher, J. I., Wilson, H., Wood, C. J., Howden, M. E., and King, G. F. (1999) *Eur J Biochem* **264**(2), 488-94.
- 64**-Mer, G., Kellenberger, C., Koehl, P., Stote, R., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., Luu, B., Hietter, H., and Lefevre, J. F. (1994) *Biochemistry* **33**(51), 15397-407.
- 65**-Oswald, R. E., Suchyna, T. M., McFeeters, R., Gottlieb, P., and Sachs, F. (2002) *J Biol Chem* **24**, 24
- 66**-Daquinag, A. C., Sato, T., Koda, H., Takao, T., Fukuda, M., Shimonishi, Y., and Tsukamoto, T. (1999) *Biochemistry* **38**(7), 2179-88.
- 67**-Osaki, T., Omotezako, M., Nagayama, R., Hirata, M., Iwanaga, S., Kasahara, J., Hattori, J., Ito, I., Sugiyama, H., and Kawabata, S. (1999) *J Biol Chem* **274**(37), 26172-8.
- 68**-Yan, L., and Adams, M. E. (1998) *J Biol Chem* **273**(4), 2059-66.
- 69**-Espiritu, D. J., Watkins, M., Dia-Monje, V., Cartier, G. E., Cruz, L. J., and Olivera, B. M. (2001) *Toxicol* **39**(12), 1899-916.
- 70**-Fremont, V., Blanc, E., Crest, M., Eauclaire, M. F., Gola, M., Darbon, H., and Van Rietscoten, J. (1997) *Lett. Peptide Sci* **4**, 305-312
- 71**-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 Menez, A. (1997) *J Biol Chem* **272**(7), 4302-9.
- 72**-Alessandri-Haber, N., Lecoq, A., Gasparini, S., Grangier-Macmath, G., Jacquet, G., Harvey, A. L., de Medeiros, C., Rowan, E. G., Gola, M., Menez, A., and Crest, M. (1999) *J Biol Chem* **274**(50), 35653-61.
- 73**-Srinivasan, K. N., Sivaraja, V., Huys, I., Sasaki, T., Cheng, B., Kumar, T. K., Sato, K., Tytgat, J., Yu, C., Brian Chia, C. S., Ranganathan, S., Bowie, J. H., Kini, R. M., and Gopalakrishnakone, P. (2002) *J Biol Chem* **28**, 28
- 74**-Craik, D. J., Daly, N. L., and Waive, C. (2001) *Toxicol* **39**(1), 43-60.
- 75**-Price, M. P., McIlwrath, S. L., Xie, J., Cheng, C., Qiao, J., Tarr, D. E., Sluka, K. A., Brennan, T. J., Lewin, G. R., and Welsh, M. J. (2001) *Neuron* **32**(6), 1071-83.
- 76**-Chen, C. C., Zimmer, A., Sun, W. H., Hall, J., and Brownstein, M. J. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(13), 8992-7.

Conclusion

Le mode d'action putatif de PcTx1 ne peut être dégagé de la seule expertise des propriétés de la surface moléculaire de PcTx1. Il semble que les éléments clés pour la fixation de PcTx1 sur son récepteur soient localisés sur le feuillet β et sur le coude reliant les 2 brins, comme l'indique le calcul du moment dipolaire représentant l'anisotropie des charges électrostatiques. Ces résultats vont orienter la conception de mutants de PcTx1 afin d'identifier clairement et de façon irrévocable les éléments impliqués dans la reconnaissance par PcTx1 de son récepteur.

Article III

Solution Structure of Ptu1, a Toxin from the Assassin Bug *Peirates turpis* That
Blocks the Voltage-Sensitive Calcium Channel N-Type

Cédric Bernard, Gerardo Corzo, Amor Mosbah, Terumi Nakajima, and Hervé Darbon,

Biochemistry , 40 : 12795 - 12800

Des toxines actives sur les canaux ioniques ont été identifiées et caractérisées dans le venin d'araignées, d'abeilles, de scorpions ou encore de cônes de mer. Plus récemment, de telles toxines ont été isolées dans la salive d'hémiptères appelés « insectes assassins ». L'une d'entre elles, Ptul, a été purifiée à partir de la salive de l'insecte assassin *Peirates turpis* et caractérisée pour sa capacité à se fixer aux canaux Ca²⁺ de type-N, et ce tout en étant moins active que l'oméga-conotoxine MVIIA (Corzo et coll., 2001). Nous avons déterminé la structure tridimensionnelle de Ptul par RMN bi-dimensionnelle du proton. La structure de Ptul s'architecture autour du motif ICK. La comparaison des structures de Ptul et de quelques ω-conotoxines actives sur le même type de canaux calcium, montre que la boucle 2, décrite comme cruciale pour l'interaction des toxines sur ces canaux, est similaire à celle observée dans MVIIA. Dans cette boucle le résidu critique, Y13, dans MVIIA est retrouvé en F13 dans Ptul. Toutefois la présence d'un résidu acide dans cette boucle, absent dans MVIIA, pourrait expliquer l'affinité moindre de Ptul comparée à celle de MVIIA.

Ces résultats sont présentés dans l'article qui suit.

Solution Structure of Ptu1, a Toxin from the Assassin Bug *Peirates turpis* That Blocks the Voltage-Sensitive Calcium Channel N-Type[†]

Cédric Bernard,[§] Gerardo Corzo,^{||} Amor Mosbah,[§] Terumi Nakajima,^{||} and Hervé Darbon*[§]

Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR 6098, CNRS and Universités d'Aix-Marseille I and II, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France, and Suntory Institute for Bioorganic Research, Mishima-Gun, Shimamoto-Cho, Wakayamadai 1-1-1, Osaka 618-8503, Japan

Received April 26, 2001; Revised Manuscript Received August 17, 2001

ABSTRACT: Ptu1 is a toxin from the assassin bug *Peirates turpis* which has been demonstrated to bind reversibly the N-type calcium channels and to have lower affinity than the ω -conotoxin MVIIA. We have determined the solution structure of Ptu1 by use of conventional two-dimensional NMR techniques followed by distance-geometry and molecular dynamics. The calculated structure of Ptu1 belongs to the inhibitory cystin knot structural family (ICK) that consists of a compact disulfide-bonded core from which four loops emerge. Analysis of the 25 converged solutions indicates that the molecular structure of Ptu1 contains a 2-stranded antiparallel β -sheet (residues 24–27 and 31–34) as the only secondary structure. The loop 2 that has been described to be critical for the binding of the toxin on the channel is similar in Ptu1 and MVIIA. In this loop, the critical residue, Tyr13, in MVIIA is retrieved in Ptu1 as Phe13, but the presence of an acidic residue (Asp16) in Ptu1 could disturb the binding of Ptu1 on the channel and could explain the lower affinity of Ptu1 toward the N-type calcium channel compared to the one of MVIIA. Analysis of the electrostatic charge's repartition gives some insights about the importance of the basic residues, which could interact with acidic residues of the channel and then provide a stabilization of the toxin on the channel.

Numerous small proteins that are natural ligands for ion channels have been described so far. Most of them have been purified from the venom of venomous animals including snakes, scorpions, spiders, bees, and marine cone snails, and their targets are channels specific for sodium, potassium, calcium, or chloride ions. Besides these venomous animals, assassin bugs (Arthropoda: Insecta: Hemiptera: Reduviidae) have been described which are devoid of venom but which produce a toxic saliva. The saliva contains a complex mixture of proteins that are used by the bug either to immobilize the prey or to digest it. One of these small proteins, namely, Ptu1, has been recently purified from the saliva of *Peirates turpis* and chemically and pharmacologically characterized (1). Ptu1 has been demonstrated to block reversibly the N-type calcium channels expressed in BHK¹ cells and to be less specific for the L- or P/Q-type calcium channels expressed in similar cell lines. This small protein is 34 amino

acid residues long, is cross-linked by 3 disulfide bridges, and has a light sequence homology with conotoxins GVIA and MVIIA (respectively 17% and 23% homologies if Cys residues are omitted because they are not functional residues). The similarity in pharmacological activity of Ptu1 and conotoxins GVIA and MVIIA together with their light sequence homologies encouraged us to determine the solution structure of Ptu1 in order to get insight in the structure–activity relationships of these calcium channel blockers.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation. Purified Ptu1 (6 mg) has been solubilized in 450 μ L of a mixture of H₂O and D₂O in a 9:1 ratio (v/v), leading to a protein concentration of 3.7 mM. The final pH of the Ptu1 solution was 3.0. The amide proton exchange rate was determined after lyophilization of this sample and dissolution in 100% D₂O.

NMR Experiments. All ¹H NMR spectra were recorded on a BRUKER DRX500 spectrometer equipped with an HCN probe, and self-shielded triple axis gradients were used. The experiments were performed at two different temperatures in order to solve assignment ambiguities (283 and 300 K). Two-dimensional spectra were acquired using the states-TPPI method (2) to achieve F1 quadrature detection (3). Water suppression was achieved using presaturation during the relaxation delay (1.5 s), and during the mixing time in the case of NOESY (4) experiments, or using a Watergate 3-9-19 pulse train (5, 6) using a gradient at the magic angle obtained by applying simultaneous *x*-, *y*-, and *z*-gradients prior to detection. NOESY spectra were acquired using

[†] C.B. is supported by the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des Techniques. A.M. is supported by a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique.

[‡] The pdb coordinate files are available on the Brookhaven Data Bank (PDB identification code 1I26).

* To whom correspondence should be addressed at AFMB-UMR 6098, CNRS and Universités d'Aix-Marseille I and II, IFR1, 31, Chemin Joseph-Aiguier, 13402 Marseille CEDEX 20, France. Tel: (33) 91-16-45-35, Fax: (33) 91-16-45-36. E-Mail: herve@afmb.cnrs-mrs.fr.

[§] CNRS and Universités d'Aix-Marseille I and II.

^{||} Suntory Institute for Bioorganic Research.

¹ Abbreviations: BHK, baby hamster kidney; NOESY, nuclear Overhauser effect spectroscopy; TOCSY, total correlation spectroscopy; COSY, correlation spectroscopy; CNS, crystallography and NMR system; ICK, inhibitor cystin knot; CD, circular dichroism.

Table 1: Chemical Shifts of Ptul at 300 K^a

residue	HN	H ^α	H ^β	other
A1		4.06	1.49	
E2	8.75	4.36	2.06,1.95	C ^γ H ₂ 2.44
K3	8.62	4.33	1.83,1.75	C ^γ H ₂ 1.38; C ^δ H ₂ 1.66; C ^ε H ₂ 2.94; N ^ε H ₂ 7.56
D4	8.64	4.66	2.85,2.79	
C5	7.80	5.02	2.88,2.75	
I6	9.18	4.10	2.03	C ^γ H ₁ 0.84,*; C ^δ H ₂ 1.21,1.08; C ^δ H ₃ 0.70
A7	8.85	4.19	1.37	
P8		4.39	2.31,2.10	C ^γ H ₂ 1.82,*; C ^δ H ₂ 3.70,3.58
G9	9.48	3.99,3.41		
A10	7.356	4.72	1.40	
P11		4.67		C ^γ H ₂ 2.04,1.92; C ^δ H ₂ 3.79,3.60
C12	7.34	5.01	3.45,2.81	
F13	9.83	4.23	2.99,2.90	C ^ε H 7.12; C ^ε H 7.41
G14	8.56	3.76,3.36		
T15	7.25	4.05	4.09	C ^γ H ₂ 1.03
D16	8.93	4.36	3.06,2.80	
K17	7.38	4.66	1.51,*	C ^γ H ₂ 1.24,*; C ^δ H ₂ 1.37,*; C ^ε H ₂ 2.89,*; N ^ε H ₂ 7.52 C ^γ H ₂ 1.94,1.76; C ^δ H ₂ 3.77,3.63
P18		4.52		
C19	8.86	4.57	3.22,2.77	
C20	9.38	4.21	3.12,2.49	
N21	8.40	4.81	2.78,2.67	N ^δ H ₂ 7.71,7.08
P22		4.48	2.30,*	C ^γ H ₂ 1.89,*; C ^δ H ₂ 4.07,3.83 C ^γ H ₂ 2.04,*; C ^δ H ₂ 3.21,*; N ^δ H ₂ 7.28
R23	7.90	4.28	1.63,*	C ^γ H ₂ 2.04,*; C ^δ H ₂ 3.21,*; N ^δ H ₂ 7.28
A24	7.65	4.68	1.17	
W25	8.50	4.85	3.22,3.11	C ^δ H ₁ 7.16; C ^ε H ₃ 7.58; C ^γ H ₂ 7.47; C ^ε H ₂ 7.25; C ^ε H ₃ 7.17; N ^ε H ₁ 10.12
C26	9.27	4.54	3.05,2.86	
S27	8.43	4.78	4.00,3.97	
S28	9.30	3.97	3.72,3.56	
Y29	7.79	4.29	3.02,2.84	C ^δ H 7.06; C ^ε H 6.80
A30	7.73	4.17	1.32	
N31	8.29	4.47	3.29,2.34	N ^δ H ₂ 7.51,7.22
K32	7.11	4.46	1.85,1.33	C ^γ H 1.18,1.07; C ^δ H 1.57,1.50; C ^ε H ₂ 2.89,*
C33	9.67	4.65	3.09,2.62	
L34	8.64	4.51	1.52,1.73	C ^γ H 1.36; C ^δ H ₂ 0.83; C ^δ H ₂ 0.79

^a (*): resonances that cannot be observed.

mixing times of 100 and 120 ms. TOCSY (7, 8) was performed with a spin locking field strength of 8 kHz and mixing time of 80 ms. The amide proton exchange experiments were recorded immediately after dissolution of the peptides in D₂O. A series of TOCSY spectra with a mixing time of 80 ms were recorded at 283 K, the first one for 1 h, followed by spectra of 4 h each.

Analysis of Spectra. The identification of amino acid spin systems and the sequential assignment were done using the standard strategy described by Wüthrich (9), applied with a graphical software, XEASY (10). The comparative analysis of TOCSY spectra recorded in water gave the spin system signatures of the protein. The spin systems were then sequentially connected using the NOESY spectra.

Experimental Restraints. The integration of NOE data was done by measuring the peak volumes. These volumes were then translated into upper limit distances by the CALIBA routine of DIANA software (11). The lower limit was systematically set at 0.18 nm.



FIGURE 1: Sequence of Ptul and sequential assignment. Collected sequential NOEs are classified into strong and weak NOEs and are indicated by thick and thin bars, respectively. The secondary elements (β -sheets) are indicated by arrows.

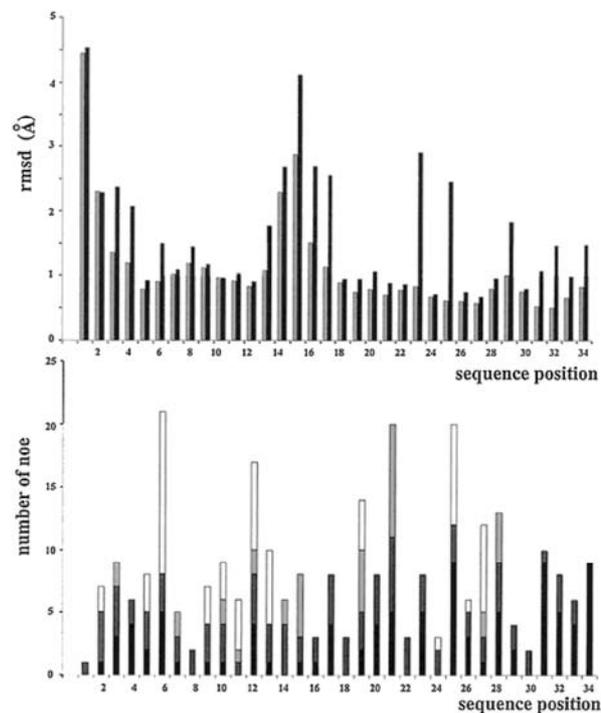


FIGURE 2: RMSD (top) and NOE (bottom) distribution vs sequence. RMSD values for backbone atoms and for all heavy atoms are in gray and black, respectively. Intraresidue NOEs are in black, sequential NOEs are in dark gray, medium-range NOEs are in light gray, and long-range NOEs are in white.

The ϕ torsion angle constraints resulted from the $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constant measurements. They were estimated by the INFIT program (12). For a given residue, separated NOESY cross-peaks with the backbone amide proton in the ω_2 dimension were used. Several cross sections through these cross-peaks were selected that exhibit a good signal-to-noise ratio. They were added up, and only those data points of the peak region that were above the noise level were retained. The left and right ends of the peak region were then brought to zero intensity by a linear baseline correction. After extending the baseline-corrected peak region with zeros on both sides, which is equivalent to oversampling in the time domain, an inverse Fourier transformation was performed. The value of the $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constant was obtained from the first local minimum. $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constants were translated into angle restraints using HABAS from the DIANA package.

Structure Calculation. Distance geometry calculations were performed with the variable target function program DIANA 2.8. A preliminary set of 1000 structures was

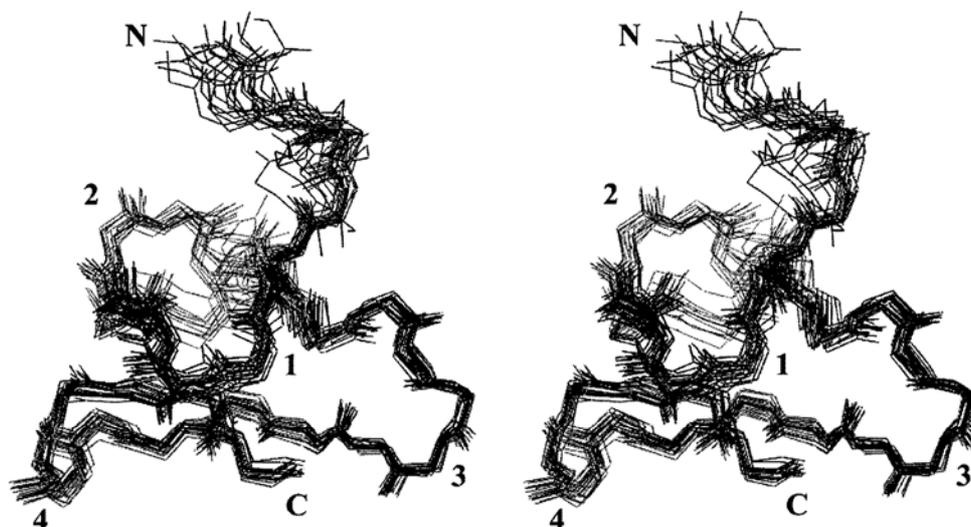


FIGURE 3: Stereoview of the best fit of 25 solution structures of Ptu1. Backbone atoms are shown. The N- and C-termini are labeled (N and C), and the four loops are indicated by the corresponding number (1, 2, 3, and 4).

Table 2: Global (All Structures) and Partial (Conformations A and B) Root Mean Square Deviations (in Å)

rmsd (Å)		whole sequence	sequence 5–34	sequences 5–13, 18–34
all structures	backbone atoms	1.48 ± 0.51	0.94 ± 0.33	0.62 ± 0.14
	all heavy atoms	2.03 ± 0.40	1.71 ± 0.39	1.35 ± 0.27
conformation A	backbone atoms		0.59 ± 0.17	
	all heavy atoms		1.57 ± 0.21	
conformation B	backbone atoms		0.67 ± 0.19	
	all heavy atoms		1.45 ± 0.26	

Table 3: Structural Statistics of the 25 Best Structures Obtained by Distance Geometry and Minimization

energies (kcal/mol)	total	65.19 ± 8.10
	bonds	3.13 ± 0.45
	angles	26.21 ± 2.00
	impropers	1.57 ± 0.34
	van der Waals (repel)	17.16 ± 4.39
	NOE	16.96 ± 2.68
	cdih	0.17 ± 0.15
rmsd	bonds	$(2.5 \times 10^{-3}) \pm (1.8 \times 10^{-4})$
	angles	$(0.43 \pm 1.67) \times 10^{-2}$
	impropers	$(0.199 \pm 2.11) \times 10^{-2}$
	dihedral	30.58 ± 1.691
	NOE	$(2.82 \times 10^{-2}) \pm (2.2 \times 10^{-3})$
	cdih	$(0.24 \pm 9.9) \times 10^{-2}$

initiated including only intraresidual and sequential upper limit distances. From these, the 500 best structures were kept for a second round, including medium-range distances, and the resulting 250 best structures for a third round, with the whole set of upper limit restraints, and some additional distance restraints, used to define the disulfide bridges (i.e., $d_{S\gamma,S\gamma}$, 0.21 nm; $d_{C\beta,S\gamma}$ and $d_{S\gamma,C\beta}$, 0.31 nm). Starting from the 50 best structures, a REDAC strategy (11) was used in a last step, to include the dihedral constraints together with the additional distance restraints coming from hydrogen bonds.

To remove residual bad van der Waals contacts, these 50 structures were refined by restrained molecular dynamics annealing, slow cooling, and energy minimization (parameter file: protein-allhdg in CNS).

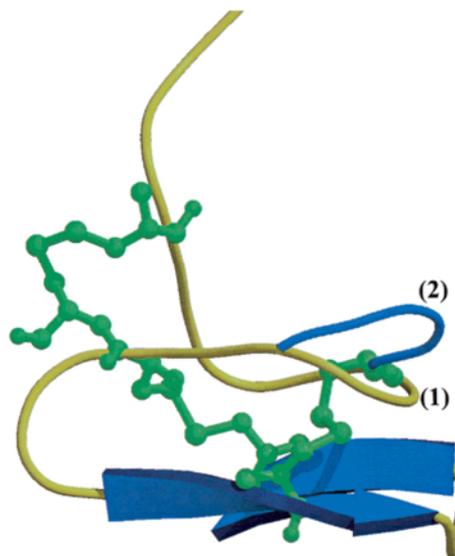


FIGURE 4: Molscript representation (26). The two conformations of the 13–18 loop are shown in yellow (1) and blue (2).

The visual analysis was done using the TURBO software, and the geometric quality of the obtained structures was assessed by PROCHECK 3.3 and PROCHECK–NMR software (13).

RESULTS AND DISCUSSION

NMR Resonance Assignment. Sequential assignment was obtained by the now standard method first described by Wüthrich (9) and successfully applied to various animal toxins (14, 15). The spin systems were identified on the basis of both COSY and TOCSY spectra, recorded at 300 and 283 K. The use of two temperatures for recording allowed us to resolve overlapping signals in the fingerprint region, and, thus, intraresidue HN–H α cross-peaks were unambiguously assigned. At the end of the sequential assignment procedure, almost all protons were identified, and their resonance frequency was determined (Table 1).

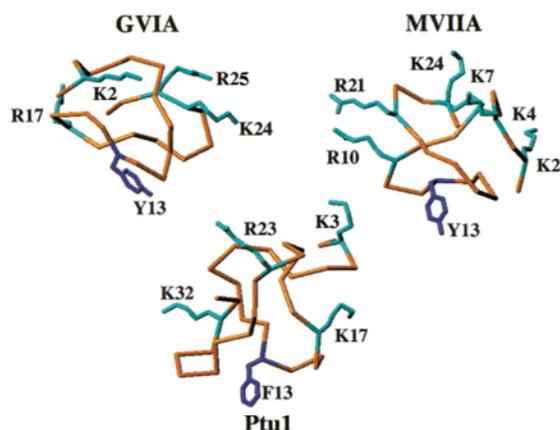


FIGURE 7: Repartition of basic residues (in blue) on the structure of Ptu1 (bottom) and the related toxins GVIA (left) and MVIIA (right). For each structure, the critical aromatic residue is shown in purple.

β -sheet, whereas GVIA and MVIIA possess a triple-stranded β -sheet (Figure 6). The lack of the third strand (encompassing residues 6, 7, and 8 in MVIIA) can easily be explained by the presence of residues that do not allow the stabilization of a β -strand: two prolines (Pro8 and -11) and one glycine (Gly9).

The structure–function relationships of ω -conotoxins GVIA and MVIIA have been previously analyzed (20–22).

Nadasdi et al. (22) found that the phenolic group of Tyr13 strongly contributes to the binding affinity of MVIIA, as does the Leu11 side-chain (although a Thr at this position is also tolerated). In addition, substitution of Tyr13 with Phe showed reduction of the affinity of GVIA, indicating that the hydroxyl group of Tyr13 is critical for binding (23). Also, the relative contribution of the individual positive charges to N-type voltage-sensitive calcium channel inhibition in MVIIA has been investigated using alanine scanning or, in the case of the N-terminus, N-acetylation (22). The results show that the order of importance is Lys2 > Arg10 > N-terminus > Arg21 > Lys7 > Lys4 > Lys24. These residues are shown in Figure 7 in which basic residues are located laterally to the critical tyrosine. Feng et al. (24) have demonstrated that mutating Glu1332 belonging to the large extracellular loop between III_{S5} and III_{H5} segments of the N-type calcium channel induced a dramatic slowing of the time course of development of GVIA and MVIIA blocks. Furthermore, Ellinor et al. (25) proposed that MVIIA and GVIA block the N-type calcium channel by physically occluding the pore of the channel. Therefore, the complex between MVIIA or GVIA toxins and N-type calcium channel involves a central aromatic residue and lateral basic residues that make salt bridges with Glu1332 but also Glu1334 and Glu1337 (Figure 7).

Ptu1 shares the same pharmacological specificity with MVIIA and GVIA and should therefore present the same

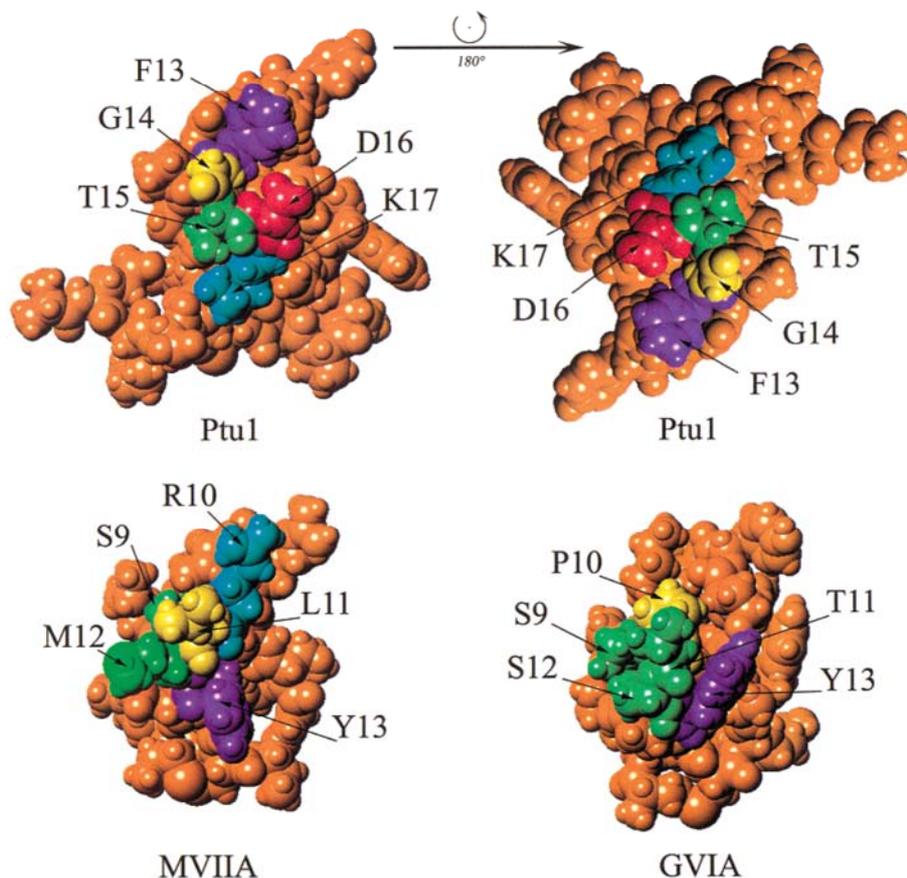


FIGURE 8: CPK representation of Ptu1, MVIIA, and GVIA. The residues of loop 2 are colored according to their side chain type (basic in blue, acidic in red, aliphatic in yellow, aromatic in purple, Met, Thr, and Ser in green) and labeled. The right view of Ptu1 is obtained by a 180° rotation in the plane of the sheet.

type of interacting surface, i.e., encompassing an aromatic residue surrounded by basic residues (primarily Lys2 and Arg10 but also Arg21 and Lys4). Such an organization is found in Ptu1, in which the aromatic residue is Phe13, and the basic residues are Lys17 and Lys32. Therefore, one can conclude that MVIIA, GVIA, and Ptu1 share the same surface of interaction with their common receptor. However, these residues are not in homologous positions when aligning the amino acid sequences (Figure 5): Tyr13 of MVIIA is at the end of loop 2 while Phe13 of Ptu1 is at the beginning of the same loop 2. Thus, to compare the structural features that describe the interacting surface of Ptu1, i.e., loop 2, one has to rotate the structure as shown in Figure 8.

The major difference between Ptu1 and MVIIA loops 2 is the presence of an acidic residue (Asp16) in Ptu1 whose presence could be unfavorable for the binding of Ptu1 on the channel and therefore explain the lower affinity of Ptu1 toward the N-type calcium channel compared to the one of MVIIA.

CONCLUSION

Comparison of the structure of Ptu1 with related N-type calcium channel blockers (MVIIA and GVIA) indicates that a common functional motif can be supported by a common three-dimensional structure but without sequence homology. Mutants of Ptu1 are being developed that will help us to check for the importance of Phe13 and the basic residues for the activity of the toxin.

ACKNOWLEDGMENT

We thank Olivier Bornet for NMR spectral acquisitions and Christian Cambillau for constant help and support.

REFERENCES

- Corzo, G., Adachi-Akahane, S., Nagao, T., Kusui, Y., and Nakajima, T. (2001) Novel peptides from assassin bugs (Hemiptera:Reduviidae): isolation, chemical and biological characterizations. *FEBS Lett.* 497, 1–6.
- Marion, D., Ikuto Tschudin, M., and Bax, A. (1989) Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in protein. *J. Magn. Reson.* 85, 393–399.
- Marion, D., and Wüthrich, K. (1983) Application of phase sensitive two-dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of H–H spin–spin coupling constants in proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 967–974.
- Kumar, A., Ernst, R. R., and Wüthrich, K. (1981) A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D nOe) experiment for the elucidation of complete proton–proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1–6.
- Piotto, M., Saudek, V., and Sklenar, V. (1992) Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J. Biomol. NMR* 2, 661–665
- Sklenar, V., Piotto, M., Leppik, R., and Saudek, V. (1992) Gradient-tailored water suppression for ^1H - ^{15}N HSQC experiments optimised to retain full sensitivity. *J. Magn. Reson.* 102, 241–245.
- Bax, A., and Davis, D. G. (1995) MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J. Magn. Reson.* 65, 355–360.
- Griesinger, C., Otting, G., Wüthrich, K., and Ernst, R. R. (1988) Clean-TOCSY for ^1H spin system identification in macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 110, 7870–7872.
- Wüthrich, K. (1986) in *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, John Wiley and sons, New York.
- Bartels, Ch., Xia, T.-H., Billeter, M., Güntert, P., and Wüthrich, K. (1995) The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J. Biomol. NMR* 5, 1–10.
- Güntert, P., and Wüthrich, K. (1991) Improved efficiency of protein structure calculations from NMR data using the program DIANA with redundant dihedral angle constraints. *J. Biomol. NMR* 1, 447–456.
- Szyperski, T., Güntert, P., Otting, G., and Wüthrich, K. (1992) Determination of scalar coupling constants by inverse Fourier transformation of in-phase multiplets. *J. Magn. Reson.* 99, 552–560.
- Laskowski et al. (1993)
- Bernard, C., Legros, C., Ferrat, G., Bischoff, U., Marquardt, A., Pongs, O., and Darbon, H. (2000) Solution structure of hpTX2, a toxin from *Heteropoda venatoria* spider that blocks Kv4.2 potassium channel. *Protein Sci.* 11, 2059–2067.
- Mosbah, A., Kharrat, R., Fajloun, Z., Renisio, J. G., Blanc, E., Sabatier, J. M., El Ayeb, M., and Darbon, H. (2000) A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* 40, 436–442.
- Basus, V. J., Nadasdi, L., Ramachandran, J., and Miljanich, G. P. (1995) Solution structure of omega-conotoxin MVIIA using 2D NMR spectroscopy. *FEBS Lett.* 370 (3), 163–169
- Kohno, T., Kim, J. I., Kobayashi, K., Koder, Y., Maeda, T., and Sato, K. (1995) Three-dimensional structure in solution of the calcium channel blocker omega-conotoxin MVIIA. *Biochemistry* 34 (32), 10256–10265.
- Nielsen, K. J., Thomas, L., Lewis, R. J., Alewood, P. F., and Craik, D. J. (1996) A consensus structure for omega-conotoxins with different selectivities for voltage-sensitive calcium channel subtypes: comparison of MVIIA, SVIB and SNX-202. *J. Mol. Biol.* 263 (2), 297–310.
- Atkinson, R. A., Kieffer, B., Dejaegere, A., Sirockin, F., and Lefevre, J. F. (2000) Structural and dynamic characterization of omega-conotoxin MVIIA: the binding loop exhibits slow conformational exchange. *Biochemistry* 39 (14), 3908–3919.
- Lew, M. J., Flinn, J. P., Pallaghy, P. K., Murphy, R., Whorlow, S. L., Wright, C. E., Norton, R. S., and Angus, J. A. (1997) Structure–function relationships of omega-conotoxin GVIA. *J. Biol. Chem.* 272 (18), 12014–12023.
- Flinn, J. P., Pallaghy, P. K., Lew, M. J., Murphy, R., Angus, J. A., and Norton, R. S. (1999) Roles of key functional groups in ω -conotoxin GVIA. *Eur. J. Biochem.* 262, 447–455.
- Nadasdi, L., Yamashiro, D., Chung, D., Tarczy-Hornoch, K., Adriaenssens, P., and Ramachandran, J. (1995) Structure–Activity analysis of a conus peptide blocker of N-type neuronal calcium channel. *Biochemistry* 34 (25), 8076–8081.
- Kim, J. I., Takahashi, M., Ogura, A., Kohno, T., Kudo, Y., and Sato, K. (1994) Hydroxyl group of tyr 13 is essential for the activity of omega-conotoxin GVIA, a peptide toxin for N-type calcium channel. *J. Biol. Chem.* 269 (39), 23876–23878.
- Feng, Z. P., Hamid, J., Doering, C., Bosey, G. M., Snutch, T. P., and Zamponi, G. W. (2001) Residue G1326 of the N-type calcium channel α_{1B} subunit controls reversibility of ω -conotoxin GVIA and MVIIA block. *J. Biol. Chem.*, Feb 2 (epub ahead of print).
- Ellinor, P. T., Zhang, J. F., Horne, W. A., and Tsien, R. W. (1994) Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature* 372, 272–275.
- Kraulis, P. J. (1991) MOLSCRIPT: A Program to Produce Both Detailed and Schematic Plots of Protein Structures. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 946–950.

BI015537J

Conclusion

La structure de Ptul, première structure d'une toxine extraite de la salive d'un insecte, s'architecture autour du motif ICK. La comparaison des structures de Ptul et de quelques ω -conotoxines actives sur le même type de canaux calcium, montre que la boucle 2, décrite comme cruciale pour l'interaction des toxines sur ces canaux, est similaire à celle observée dans MVIIA, et ce même si les résidus de la boucle 2 ne sont pas conservés en séquence. Toutefois, la présence d'un résidu acide dans cette boucle, absent dans MVIIA, pourrait expliquer la moindre affinité de Ptul par rapport à MVIIA. Ces hypothèse, l'importance cruciale du résidu F13 et l'influence du résidu D16, doivent être confirmées par la conception des mutants adéquats.

Article IV

**Solution Structure of ADO1, a Toxin Extracted from the Assassin Bug
Agriosphodrus dohrni Saliva.**

Cédric Bernard, Gerardo Corzo, Guillaume Foures, Kazunori Kanemaru, Yasuo
Furukawa, Terumi Nakajima and Hervé Darbon

En préparation

Des toxines actives sur les canaux ioniques ont été identifiées et caractérisées dans le venin d'araignées, d'abeilles, de scorpions ou encore de cônes de mer. Plus récemment, de telles toxines ont été isolées dans la salive d'hémiptères appelés « insectes assassins ». L'une d'entre elles, ADO1, a été purifiée à partir de la salive de l'insecte assassin *Agriosphodrus dohrni* (Corzo et coll., 2001). Toutefois, la spécificité d'ADO1 envers les canaux calcium n'est pas encore clairement établie. Nous avons déterminé la structure tridimensionnelle de ADO1 par RMN bi-dimensionnelle du proton. La structure de ADO1 s'architecture autour du motif ICK. La comparaison des structures combinée à l'analyse des surfaces fonctionnelles décrites pour des ω -conotoxines aux spécificités différentes nous indique qu'ADO1 semble être active sur les canaux calcium de type P/Q.

Ces résultats sont présentés dans le manuscrit suivant, rédigé en anglais.

**Solution Structure of ADO1, a Toxin Extracted from the Assassin Bugs
Agriosphodrus dohrni Saliva.**

Cédric BERNARD¹, Gerardo CORZO², Guillaume FOURES¹, Kazunori KANEMARU³, Yasuo FURUKAWA³, Terumi NAKAJIMA² and Hervé DARBON^{1*}

1-Architecture et Fonction des Macromolécules Biologiques, UMR 6098, CNRS and Universités d'Aix-Marseille I and II, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France.

2-Suntory Institute for Bioorganic Research, Mishima-Gun, Shimamoto-Cho, Wakayamadai 1-1-1, Osaka 618-8503, Japan

3-Graduate School of Science, Hiroshima University 739-8526, Japan

Running Head: Solution structure of ADO1

Keywords: NMR, structure determination, calcium channel, assassin bugs toxin.

*author to whom correspondence should be addressed: H. Darbon, AFMB-UMR 6098. CNRS and Universités d'Aix-Marseille I and II, IFR1, 31, Chemin Joseph-Aiguier, 13402 Marseille CEDEX 20, Tel: (33) 91-16-45-35, Fax: (33) 91-16-45-36. E-Mail : herve@afmb .cnrs-mrs.fr
The pdb coordinate files are available on the Brookhaven Data Bank (PDB code 1LMR).

Acknowledgments: The authors would like to thank Olivier Bornet for NMR spectra acquisitions and Christian Cambillau for constant help and support. Cedric Bernard is granted by le ministère de l'éducation nationale, de la recherche et des techniques.

Introduction

Numerous small proteins that are natural ligands for ion channels have been described so far. Most of them have been purified from the venom of venomous animals including snakes, scorpions, spiders, bees, and marine cone snails, and their targets are channels specific for sodium, potassium, calcium, or chloride ions. Besides these venomous animals, assassin bugs (Arthropoda: Insecta: Hemiptera: Reduviidae) have been described which are devoid of venom but which produce a toxic saliva. The saliva contains a complex mixture of proteins that are used by the bug either to immobilize the prey or to digest it. One of these small proteins, namely, ADO1, has been recently purified from the saliva of *Agriosphodrus dohrni*. This small protein is 35 amino acid residues long, is cross-linked by 3 disulfide bridges, and shares 42% homologies with Ptu1, another assassin bug toxin characterized for its ability to block the N-type calcium channels, (if Cys residues are omitted because they are not functional residues). The pharmacological properties and the selectivity of ADO1 are not yet known. We present here the ^1H NMR solution structure of ADO1 and the putative selectivity of this toxin is discussed.

Materials and methods

Sample preparation

Purified ADO1 (6mgs) has been solubilized in 450 μl of a mixture of H_2O and D_2O in a 9:1 ratio (v/v), leading to a protein concentration of 3.7 mM. The final pH of the ADO1 solution was 3.0. Amide proton exchange rate was determined after lyophilization of this sample and dissolution in 100% D_2O .

NMR experiments

All ^1H NMR spectra were recorded on BRUKER DRX500 spectrometer equipped with a HCN probe and self shielded triple axis gradients were used. The experiments were performed at two different temperatures in order to solve assignment ambiguities (283 K and 300 K). Two-dimensional spectra were acquired using states-TPPI method (Marion et al. 1989) to achieve F1 quadrature detection (Marion and Wuthrich, 1983). Water suppression was achieved using presaturation during the relaxation delay (1.5 s), and during the mixing time in the case of NOESY (Kumar et al. 1981) experiments, or using a watergate 3-9-19 pulse train (Piotto et al. 1992; Sklenar et al. 1992) using a gradient at the magic angle obtained by applying simultaneous x-, y- and z- gradients prior to detection. NOESY spectra were acquired using mixing times of 100 ms and 120 ms. TOCSY (Bax and Davis, 1995; Griesinger et al. 1988) was performed with a spin locking

field strength of 8 kHz and mixing time of 80 ms. The amide proton exchange experiments were recorded immediately after dissolution of the peptides in D₂O. A series of TOCSY spectra with a mixing time of 80 ms were recorded at 283K, the first one for one hour, followed by spectra of 4 hours each.

Analysis of spectra

The identification of amino acid spin systems and the sequential assignment were done using the standard strategy described by Wüthrich (1986), applied with a graphical software, XEASY. The comparative analysis of TOCSY spectra recorded in water gave the spin system signatures of the protein. The spin systems were then sequentially connected using the NOESY spectra.

Experimental restraints

The integration of NOE data was done by measuring the peaks volumes. These volumes were then translated into upper limits distances by the CALIBA routine of DIANA software (Gunthert and Wüthrich 1991). The lower limit was systematically set at 0.18nm. The ϕ torsion angles constraints resulted from the $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constant measurements. They were estimated by the INFIT program. For a given residue, separated NOESY cross peaks with the backbone amide proton in the ω_2 dimension were used. Several cross sections through these cross peaks were selected that exhibit a good signal-to-noise ratio. They were added up and only those data points of the peak region that were above the noise level were retained. The left and the right ends of the peak region were then brought to zero intensity by a linear baseline correction. After extending the baseline-corrected peak region with zeros on both sides, which is equivalent to over sampling in the time domain, an inverse Fourier transformation was performed. The value of the $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constant was obtained from the first local minimum. $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constants were translated into angle restraints using HABAS from the DIANA package.

Structure calculation

Distance geometry calculations were performed with the variable target function program DIANA 2.8. A preliminary set of 1,000 structures was initiated including only intra-residual and sequential upper limit distances. From these, the 500 best were kept for a second round, including medium range distances, and the resulting 250 best for a third one, with the whole set of upper limits restraints, and some additional distance

restraints, used to define the disulfide bridges (i.e. $d_{S\gamma,S\gamma}$ 0.21nm, $d_{C\beta,S\gamma}$ and $d_{S\gamma,C\beta}$ 0.31nm). Starting from the 50 best structures, a REDAC strategy was used in a last step, in order to include the dihedral constraints together with the additional distances restraints coming from hydrogen bonds. To remove residual bad Van der Waals contacts, these 50 structures were refined by restrained molecular dynamics annealing, slow cooling, and energy minimisation (parameter file: protein-allhdg in CNS). The visual analysis was done using the TURBO software and the geometric quality of the obtained structures was assessed by PROCHECK 3.3 and PROCHECK-NMR softwares



Figure 1: Sequence of ADO1 and sequential assignment. Collected sequential nOe are classified according to their strongness, indicated by the thickness of the bars.

Results and discussion

NMR resonance assignment

Sequential assignment was obtained by the now standard method first described by Wüthrich (1986) and successfully applied to various animal toxins (Bernard *et al* , 2000, Mosbah *et al*, 2000). The spin systems were identified on the basis of both COSY and TOCSY spectra, recorded at 300 and 290K. The use of two temperatures for recording allowed us to resolve overlapping signals in the fingerprint region, and thus, intraresidue HN-H α cross peaks were unambiguously assigned. At the end of the sequential assignment procedure, almost all protons were identified and their resonance frequency determined (Table 1).

The figure 1 represents the result of the sequential correlations found on the NOESY

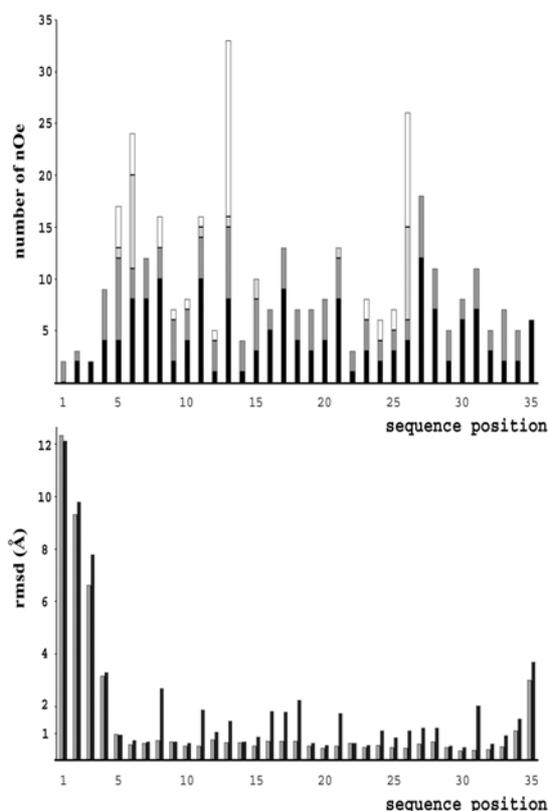


Figure 2 : RMSD (top) and nOe (bottom) distribution vs sequence. RMSD values for backbone atoms and all heavy atoms are in grey and black respectively. Intraresidue nOe are in dark grey; sequential nOe are in black, medium nOe are in light grey and long range nOe are in white.

spectrum. As shown by the repartition of the α/H_N and H_N/H_N correlations, the toxin is essentially organized in random coil. However, strong α/H_N correlations indicates that some extended regions are present.

residue	HN	H ^a	H ^b	other
A1		(4.078)	(1.521)	
D2	(8.861)	(4.732)	(2.937, 2.805)	
D3	(8.621)	(4.878)	(2.942, 2.840)	
D4	(8.510)	(4.732)	(2.924, 2.801)	
C5	(7.866)	(4.982)	(3.162, 3.073)	
L6	(9.055)	(4.632)	(*)	H ^γ , * (1.328); H ^{δ1} , * (1.241); H ^{δ2} , * (0.783)
P7		(4.323)	(2.282, 1.981)	H ^δ , * (4.005, 3.648)
R8	(8.539)	(3.630)	(*)	N ^ε , 7.264(*)
G9	(9.360)	(3.553, *)		
S10	(7.859)	(4.373)	(3.818, 3.645)	
K11	(8.485)	(4.527)	(*)	N ^ζ , 7.571(*)
C12	(7.732)	(4.717)	(3.039, 2.928)	
L13	(9.257)	(4.285)	(1.514, 1.363)	H ^{δ1} , * (0.816); H ^{δ2} , * (0.713)
G14	(9.160)	(3.769, *)		
E15	(7.158)	(4.462)		H ^γ , * (2.266, 2.081)
N16	(8.674)	(4.547)		HN ^{δ2} , * (7.610, 6.900)
K17	(7.355)	(4.423)		HN ^ζ , 7.511(*)
Q18	(8.564)	(4.530)	(2.194, 1.891)	H ^γ , * (2.408, *)
C19	(9.100)	(4.857)	(3.989, 2.251)	
C20	(9.087)	(4.390)	(3.315, 2.621)	
K21	(8.644)	(4.138)	(1.884, 1.740)	HN ^ζ , 7.559(*)
G22	(9.108)	(3.644, *)		
T23	(8.363)	(5.256)	(3.643)	H ^{γ2} , * (0.829)
T24	(8.862)	(4.571)	(3.878)	H ^{γ2} , * (1.083)
C25	(8.879)	(4.822)	(3.263, 2.916)	
M26	(8.563)	(4.728)	(2.200, 2.093)	
F27	(8.804)	(4.070)	(3.243, 2.974)	H ^ζ , 7.289(*);
Y28	(8.392)	(4.110)		H ^ζ , 6.908
A29	(6.859)	(4.198)	(1.173)	
N30	(8.082)	(4.071)	(3.377, 2.368)	HN ^{δ2} , * (7.514, 7.646)
R31	(6.908)	(5.072)		H ^δ , * (3.166, 2.914); HN ^ε , 7.080(*)
C32	(8.299)	(5.192)	(2.939, 2.787)	
V33	(9.373)	(4.502)	(2.056)	H ^{γ1} , * (1.031); H ^{γ2} , * (0.954)
G34	(8.835)	(3.927, *)		
V35	(7.925)	(4.234)	(2.143)	H ^{γ1} , * (0.831); H ^{γ2} , * (0.831)

Table 1 : resonance assignments; (proton chemical shifts are given in parentheses).

(*): resonance that cannot be observed

Structure calculation

The structure of ADO1 was determined by using 349 nOe-based distance restraints, including 160 intra-residue restraints, 116 sequential restraints, 24 medium range restraints and 49 long range restraints. The repartition of these nOe along the sequence is shown on figure 2. In addition, 20 hydrogen bond restraints and 14 dihedral angle constraints deriving respectively from proton exchange and coupling constants have been included, as well as 9 distance restraints derived from the three disulfide bridges which have been experimentally characterized (Corzo et al., 2001). Altogether, the final experimental set corresponded to 11.2 constraints per residue on the average (Fig. 2). The structures were calculated by using distance geometry protocol using DIANA and energy minimized by CNS. The best-fit superimposition of backbone atoms for 20 best

RMSD (Å)		
Region 1-35		
Backbone		2.58 +/- 0.79
All heavy atoms		3.01 +/- 0.64
Region 5-34		
Backbone		0.66 +/- 0.16
All heavy atoms		1.49 +/- 0.17
ENERGIES (kcal/mol)		
	(DG)	<DG>
Total	33.43	48.47
Bonds	2.37	3.74
Angles	18.91	22.25
Impropers	1.03	1.39
van der Waals (repel)	5.37	13.86
nOe	5.41	6.85
cdih	0.32	0.39
RMSD		
Bonds	0.002	0.002
Angles	0.368	0.387
Impropers	0.162	0.177
Dihedral	30.103	30.006
NOe	0.008	0.009
Cdih	0.496	0.528

Table 2. Structural Statistics of the 20 Best Structures (DG) are the final 20 ADO1 structures obtained by distance geometry and minimization. <DG> is the minimized mean structure obtained by averaging the coordinates of the individual DG structures best fitted to each other.

greater than 0.2 Å. The analysis of the Ramachandran plot shows for the ensemble of the 20 calculated models (in PROCHECK software nomenclature) 96.9% of the residues in the most favored and in the additional regions, 3.1% in the generously allowed regions, and none in the disallowed regions (data not shown).

Structure description

The three-dimensional structure of ADO1 (PDB id: 1LMR) consists in a compact disulfide-bonded core, from which four loops emerge (i.e., loop1 from Leu 6 to Lys 11, loop2 from Leu 13 to Gln 18, loop3 from Lys 21 to Thr 25 and loop4 from Met 27 to Arg 32) as well as N- and C-terminii .

The figure 3 shows a stereopair representation of the best-fit superposition of the C_α atoms for 20 converged structures. Analysis of the 20 converged structures indicates that the molecular structure of ADO1 contains a β-sheet region made of two antiparallel β-strands, i.e., β-strand 1 (Ala 24 to Ser 27) and β-strand 2 (Lys 31 to Leu 34). No other regular secondary structure can be described. Over the 35 residues of ADO1, only the

structures gives RMSD values (region 5 to 34) of 0.66 +/-0.16 Å for backbone atoms and 1.47 +/-0.18 Å if all non-hydrogen atoms are included. A summary of the structural statistics and the values of RMSD calculated on the well defined regions are given in Table 2. All the solutions have good non-bonded contacts and good covalent geometry has evidenced by low values of CNS energy terms and low RMSD values for bond lengths, valence angles and improper dihedral angles (Table 2). The correlation with the experimental data shows no nOe-derived distance violation

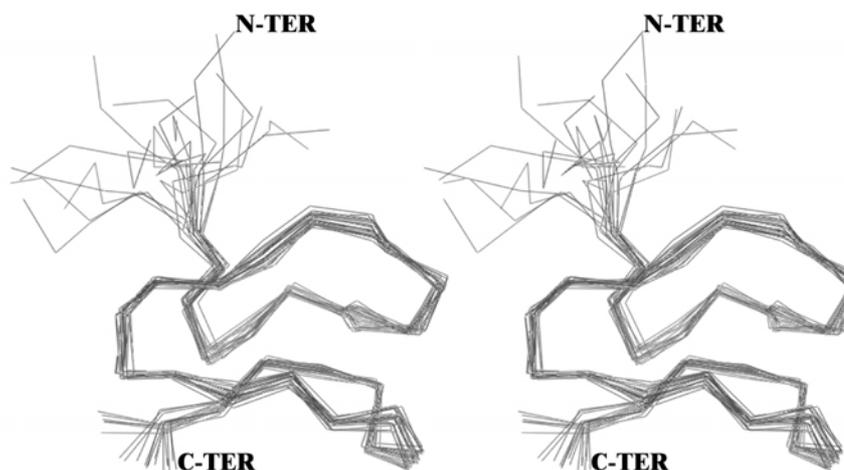


Figure 3 : Stereoview of the best fit of 20 solution structures of ADO1. C_α are shown. The N and C termini are labeled (N-TER and C-TER)

side chains of Cys residues are buried. All side chain conformations are well determined with the exception of the region of the N-terminus (from residues 1 to 4) and of the last residue.

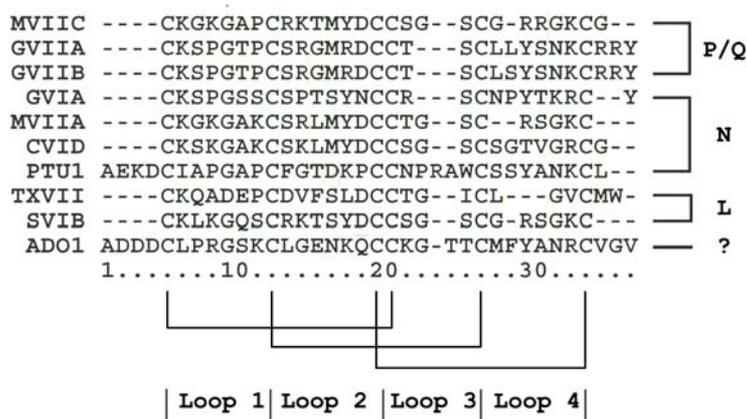


Figure 4 : Comparison of the sequence of ADO1 with those of related toxins. The four loops and the targeted channels are indicated.

Comparison with related toxins

The ADO1 fold can be classified as a *inhibitor cystine knot* (ICK) fold already described for numerous toxic and inhibitory animal venom peptides. Many ion channels effectors from marine snails, spider and scorpion venoms share the same ICK fold although they possess widely different pharmacological profiles. ADO1 is suspected to be active on calcium channels while the subtype has not been yet identified whereas the spider peptides μ -agatoxin I is active on muscle Na^+ channel, similarly to the δ -palutoxins, and the δ -atracotoxins. By contrast, κ -conotoxin PVIIA from cone snails, hanatoxins, HpTx2 and stromatoxins respectively from the spiders *Grammostola spatulata*, *Heteropoda venatoria* and *Stromatopelma calceata* act against voltage-dependent K^+ channels. Other ICK toxins have been reported to act on

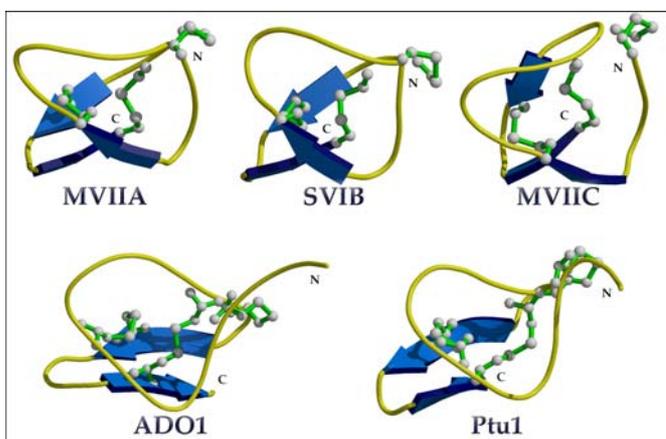


Figure 5 : Comparison of three-dimensional structures of structurally related toxins blocking different types of calcium channels with ADO1 in Molscript representation (Kraulis, 1991). The N and C termini are labeled (N and C).

Ca^{2+} channels, such as the ω -conotoxins MVIIA and GVIA , ω -agatoxins IVA and IVB, huwentoxin , SNX482, ω -GsTx SIA and the ω -atracotoxins respectively from the venoms of the spiders *Agelenopsis aperta*, *Selenocosmia huwena*, *Hysteroocrates gigas*, *Grammostola spatulata* and *Hadronyche ssp*, Ptul from saliva of the assassin bug *Peirates turpis* maurocalcine from the scorpion *Scorpio maurus*. ADO1 shares the same

disulfide linkage with other calcium channels blockers (Fig. 4) and the same structural organization as shown by the figure 5.

What is the target of ADO1?

The three-dimensional fold of cystine knot toxins generally provides little insight into their mode of action; the cystine knot simply provides the structural framework onto which diverse functional motifs can be grafted. However, for cystine knot and other disulfide-rich ion channel toxins, the topological disposition of key functional residues, regardless of three-dimensional scaffold, is often informative of function. The classical example is the diad of Lys and Tyr/Phe residues that is topologically conserved across a wide range of otherwise structurally dissimilar potassium channel blockers. In the case of voltage-dependent Ca²⁺ channels blockers, there are some residues that have been characterized to be involved in the specificity of recognition with the different calcium channels sub-types. The figure 6

shows the comparison of functional surfaces of ω-conotoxins acting against N- and P/Q-types calcium channels. The critical aromatic residue (Y13) located in the loop 2 of the N- and P/Q- type Ca²⁺ channels blockers is lacking in ADO1 (Fig. 4) but could be compensated by one of the aromatic residues present inside the loop 4 of ADO1 (F27 or Y28) as it has been supposed for GVIIA and GVIIIB that are active against the same Ca²⁺ channel subtype. The comparison of the other peripheral residues of these ω-conotoxins shows that the residues Y13, R22, K10, R23 of MVIIC are retrieved respectively as Y28/F27, R8, R31, K11 and K17 in ADO1. The polar uncharged residue T11 in MVIIC could correspond to N30, another polar uncharged residue, in ADO1 (Fig. 6). All these common features between ADO1 and MVIIC allow us to purpose that ADO1 is a toxin acting against the P/Q type calcium channel.

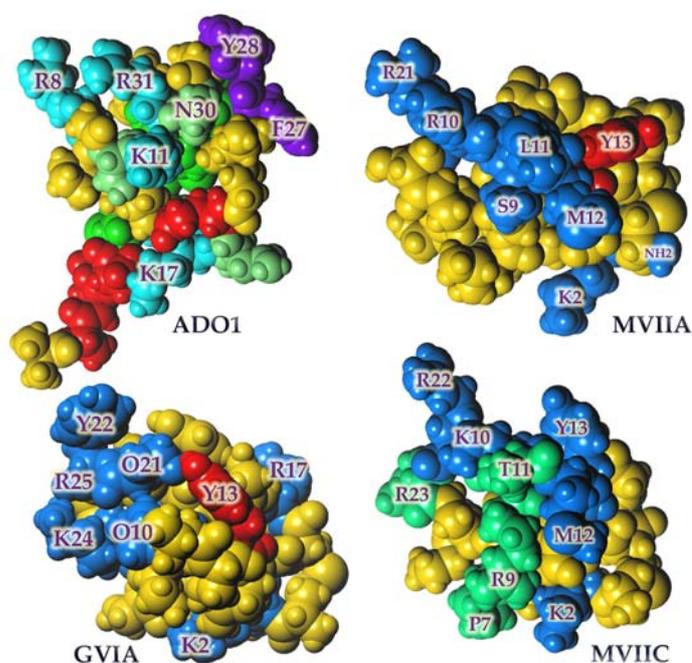


Figure 6 : representation of the residues involved in the recognition of N-type Ca²⁺ channels by GVIA and MVIIC (critical residue Y13 is highlighted in red, the peripheral residues characterized are colored in blue). For The P/Q-type Ca²⁺ channel blocker MVIIC, the common residues shared with MVIIC are colored in blue and the residues that differ between these two toxins are colored in green. For ADO1, the residues are colored as follow : green for polar uncharged residues, blue for basic residues, red for acidic residues, purple for aromatic residues and yellow for aliphatic residues.

Conclusion

La répartition des résidus observée sur ADO1 apparaît beaucoup plus proche de la surface fonctionnelle de l' ω -conotoxine MVIIC, active sur les canaux calcium de type P/Q, que les ω -conotoxines GVIA et MVIIA, actives sur els canaux de type N. Enfin, la comparaison avec des toxines spécifiques des canaux de type-L n'est malheureusement pas possible puisque les résidus cruciaux mis en jeux par la toxine ne sont pas encore connus, conséquence directe des maigres études réalisées pour obtenir ces informations. Nous sommes toujours en attente des résultats issus des tests électrophysiologiques qui rendront compte de la réelle spécificité d'ADO1. Une fois cette spécificité caractérisée, nous pourrons approfondir la discussion des résultats et la comparaison avec les différentes ω -conotoxines actives sur les canaux calcium pour finalement soumettre ce manuscrit pour publication.

**Solution structure of HpTX2, a toxin from *Heteropoda venatoria* spider
that blocks Kv4.2 potassium channel**

Cédric Bernard, Christian Legros, Gilles Ferrat, Ulrike Bishoff, Annette Marquardt,
Olaf Pongs, and Hervé Darbon

Protein Science, 2000, 9 : 2059-2067

HpTX2 est une toxine du venin de l'araignée *Heteropoda venatoria* qui se fixe sur les canaux potassiques de type Kv 4.2. La structure tridimensionnelle de cette toxine a été obtenue par RMN bidimensionnelle du proton. La structure ainsi obtenue appartient à la famille structurale Inhibitory Cystin Knot qui consiste en un corps compact maintenu par des ponts disulfures duquel émerge quatre boucles. Un feuillet β à deux brins antiparallèle assez mal défini a été détecté (résidus 20 à 23 et 25 à 28). Une analyse de l'anisotropie de la répartition de charges de la molécule nous permet de proposer une carte fonctionnelle pour HpTX2 différente de celle décrite pour la κ -conotoxine PVIIA, mais très proche de celle de la charybdotoxine. Le vecteur représentant le moment dipolaire de HpTX2 est colinéaire à la chaîne latérale de la lysine 27, qui pourrait être le résidu critique pour l'activité de la toxine. A côté de cette lysine, se trouvent un autre résidu basique, l'arginine 23, un cluster aromatique composé de la phénylalanine 7, du tryptophane 25 et du tryptophane 30, et enfin la chaîne hydrophobe de la leucine 24. Cette forte densité en résidus aromatiques de la surface d'interaction putative de la toxine avec le canal Kv 4.2, ainsi que l'absence d'asparagine, sont proposés pour être responsables de la spécificité de la toxine vis à vis de ce sous-type de canal.

Solution structure of HpTX2, a toxin from *Heteropoda venatoria* spider that blocks Kv4.2 potassium channel

CÉDRIC BERNARD,¹ CHRISTIAN LEGROS,² GILLES FERRAT,¹ ULRIKE BISCHOFF,³
ANNETTE MARQUARDT,² OLAF PONGS,² AND HERVÉ DARBON¹

¹AFMB, CNRS UMR 6098, IFR1, 31, Chemin Joseph-Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France

²Institut für Neurale Signalverarbeitung, ZMNH, Universität Hamburg, Martinistr. 52, D-20246 Hamburg, Germany

³GENIONmbH, Absteistr. 57, D-20149 Hamburg, Germany

(RECEIVED April 12, 2000; FINAL REVISION June 19, 2000; ACCEPTED June 30, 2000)

Abstract

HpTX2 is a toxin from the venom of *Heteropoda venatoria* spider that has been demonstrated to bind on Kv4.2 potassium channel. We have determined the solution structure of recombinant HpTX2 by use of conventional two-dimensional NMR techniques followed by distance-geometry and molecular dynamics. The calculated structure belongs to the Inhibitory Cystin Knot structural family that consists in a compact disulfide-bonded core, from which four loops emerge. A poorly defined two-stranded antiparallel β -sheet (residues 20–23 and 25–28) is detected. Analysis of the electrostatic charge anisotropy allows us to propose a functional map of HpTX2 different from the one described for κ -conotoxin PVIIA, but strongly related to the one of charybdotoxin. The orientation of the dipole moment of HpTX2 emerges through K27 which could therefore be the critical lysine residue. Close to this lysine are a second basic residue, R23, an aromatic cluster (F7, W25, W30) and an hydrophobic side chain (L24). The high density in aromatic side chains of the putative functional surface as well as the lack of an asparagine is proposed to be the structural basis of the specificity of HpTX2 toward Kv4.2 channel.

Keywords: heteropodotoxin; NMR; spider toxin; structure determination; voltage-dependent potassium channel

Numerous peptidic toxins acting as potassium channel blockers have been identified in scorpion toxins. They all are small (29 to 39 amino acid residues), highly structured thanks to three (rarely four) disulfide bridges (Possani, 1984; Miller, 1995). They are structurally organized around a common structural motif named C α β (cystine stabilized alpha/beta motif) and their three-dimensional (3D) structure comprises a short alpha-helix and a double- or a triple-stranded antiparallel β -sheet (for a review, see Darbon et al., 2000). They interact with their receptor via the solvent-exposed surface of the α -helix if the target is a small conductance calcium-activated potassium channel or via the solvent-exposed surface of the β -sheet if their target is a large conductance calcium-activated potassium channel or a voltage-dependent potassium channel (Darbon et al., 2000). Whatever their specificities are, their functional sites are made of a solvent exposed surface, rich in basic residues. We have previously proposed that the electrostatic anisotropy present in all these proteins was responsible for the correct orientation of the peptidic inhibitor with respect to its target (Blanc et al., 1997;

Fremont et al., 1997; Renisio et al., 1999, 2000). The functional surface of Kv channel inhibitors comprises a triplet of residues (lysine, methionine/isoleucine, asparagine) (Goldstein et al., 1994; Aiyar et al., 1996; Naranjo & Miller, 1996; Ranganathan et al., 1996) associated with a doublet of basic residues and an aromatic residue (Goldstein et al., 1994; Ranganathan et al., 1996).

Another peptidic inhibitor of potassium channels, apamin, has been purified from the bee venom. Despite a strong difference in its 3D organization (a short α -helix but no β -sheet in this 18 residues peptide) (Bystrov et al., 1980; Pease & Wemmer, 1988), it also presents the same kind of anisotropy, therefore interacting with small conductance calcium-activated potassium channel via its solvent-exposed, highly basic α -helix surface (Vincent et al., 1975; Habermann & Fischer, 1979).

Another type of structural organization, namely Inhibitor Cystine Knot (ICK), motif, which consists in a compact disulfide-bonded core from which several short loops emerge (Wakamatsu et al., 1992), has been described for ion channel peptidic inhibitors, blockers of sodium channels (Hill et al., 1997), or calcium channels (Flinn et al., 1999), but only once for blockers of potassium channels (Scanlon et al., 1997). In this paper, we describe the solution structure, obtained by two-dimensional-¹H-NMR techniques, of HpTX2 toxin from *Heteropoda venatoria* spider venom,

Reprint requests to: Herve Darbon, AFMB-UPR 9030, CNRS IFR1, 31 Chemin Joseph-Aiguier, Marseille Cedex, 13402 France; e-mail: herve@afmb.cnrs-mrs.fr.

which blocks the voltage-gated potassium channel Kv4.2 in a voltage-dependent manner. We demonstrate that this peptide is organized around the ICK structural motif and that it presents a strong electrostatic anisotropy, allowing us to propose a solvent-exposed surface, rich in basic residues and aromatic side chains as being the functional surface of HpTX2.

Results

Preparation and pharmacological characterization of HpTX2

The yield of fusion protein was ~ 60 mg/L of culture and the final yield of recombinant HpTX2 was ~ 1.2 mg/L of culture. The amino acid composition and sequence of the recombinant HpTX2

are identical to the native (data not shown). The molecular mass determined by mass spectrometry was 3,412.7 Da for the recombinant and the native toxin (data not shown). Both peptides presented identical behavior on C18 column and were eluted with a retention time of 34 min (Fig. 1A,B). In conclusion, the recombinant and the native toxin are chemically undistinguishable.

Electrophysiology

The activity of recombinant HpTX2 was examined by the block of Kv4.2 (Sanguinetti et al., 1997). Recombinant HpTX2 at a concentration of 30 nM efficiently blocked the transient outward current elicited in CHO cell, which stably expressed Kv4.2 ($75 \pm 19\%$ inhibition at -10 mV and $\sim 54 \pm 10\%$ inhibition at $+40$ mV, $n = 3$ cells) (Fig. 1C). Inhibition of Kv4.2 channels by the toxin was

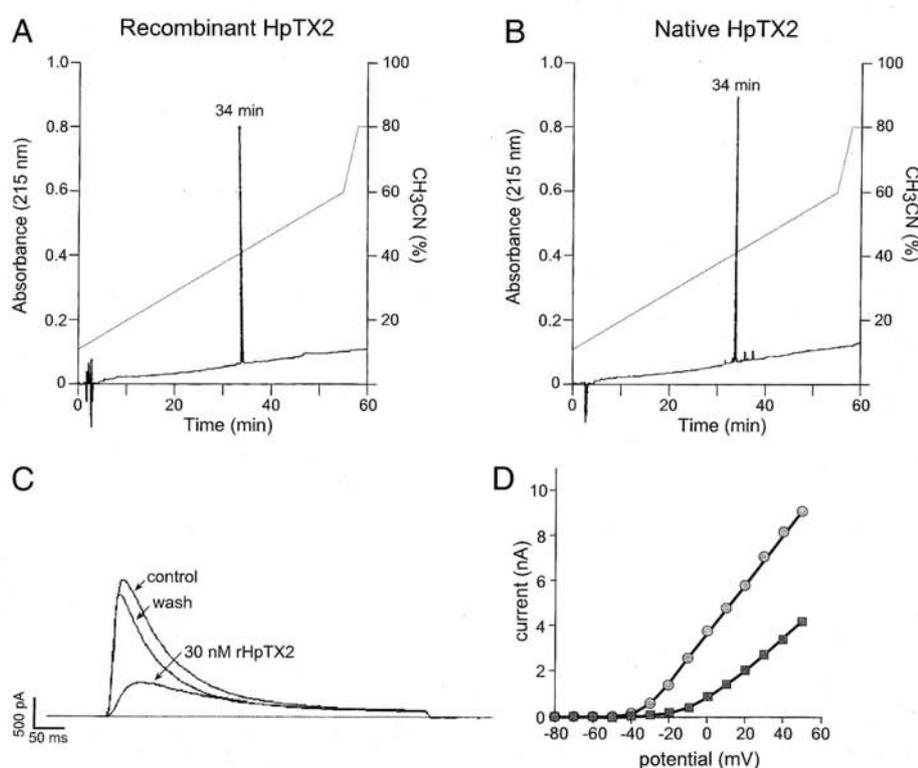


Fig. 1. Preparation and pharmacological characterization of HpTX2. **A, B:** Chromatographic profiles of recombinant HpTX2 compared to the native HpTX2. Reverse phase chromatography of purified rHpTX2 (**A**) by exclusion chromatography (see Materials and methods), and (**B**) native HpTX2. One nmole of peptide was loaded on C18 column equilibrated with 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), 5% acetonitrile, and eluted with a linear gradient of 5 to 60% in 55 min (vol/vol) with acetonitrile with 0.1% TFA with a second gradient 60–80% with acetonitrile with 0.1% TFA in 3 min. The percentage of acetonitrile (CH₃CN) is indicated on the right axis. The flow rate was 1 mL/min, and the absorbance was monitored at 215 nm (left axis). Recombinant and native HpTX2 presented the same high-performance liquid chromatography mobility with a retention time of 34 min in the conditions described above. **C, D:** Effect of recombinant HpTX2 on Kv4.2. Kv4.2 currents were recorded in the whole-cell configuration in CHO cell stably transfected. Holding potential: -80 mV. **C:** Effect of 30 nM recombinant HpTX2 on Kv4.2, recorded at -10 mV with a depolarizing pulse of 500 ms duration. Current traces are shown in the absence (control), in the presence of 30 nM of recombinant HpTX2 and after wash (wash). **D:** The current-voltage relationship for Kv4.2 is shown in the absence (circles) or in the presence of the toxin (squares). The cells were depolarized from a holding potential of -80 mV in increments of 10 mV for 500 ms to potentials between -70 and $+60$ mV. To investigate the effects of HpTX2, the cells were depolarized from a holding potential of -80 mV to -10 mV for 500 ms. The peaks of the outward currents were analyzed. The stimulation frequency was 0.1 Hz, sample interval was 1 kHz, and the current traces were filter with a frequency of 200 Hz.

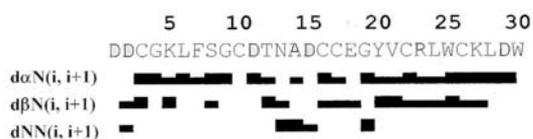


Fig. 2. Sequence of HpTX2 and sequential assignment. Collected sequential NOEs are classified into strong and weak NOE, and are indicated by thick and thin bars, respectively.

almost totally reversed after wash out ($\sim 90\%$ recovery). Current-voltage relations showed that the higher the voltage is, the lower the intensity of blockage (Fig. 1D). This voltage dependence has been described previously (Sanguinetti et al., 1997). These data showed that the recombinant HpTX2 is a powerful inhibitor of the fast inactivating outward K^+ current through Kv4.2 channel. In conclusion, the similarities in chemical and blocking properties of recombinant and native HpTX2 indicate the structural identity of both peptides.

NMR resonance assignment

Sequential assignment was obtained by the now standard method first described by Wüthrich (1986) and successfully applied to various animal toxins. At the end of the sequential assignment procedure (Fig. 2), almost all protons were identified and their resonance frequency determined.

Structure calculation

The structure of HpTX2 was determined by using 218 nuclear Overhauser effect (NOE)-based distance restraints, including 109 intrasidue restraints, 68 sequential restraints, 13 medium-range

Table 1. Structural statistics of the 25 best structures

	(DG) ^a	(DG) ^b
RMSD (Å)		
Backbone	0.63	
All heavy atoms	1.18	
Energies (kcal/mol)		
Total	102.65	110.85
Bonds	4.96	5.00
Angles	34.96	34.59
Impropers	4.89	4.82
van der Waals (repel)	33.16	33.16
NOE	31.95	31.99
cdih	1.22	1.30
RMSD		
Bonds	0.0033	0.0033
Angles	0.5354	0.5332
Dihedral	32.381	32.587
NOE	0.042	0.042

^a(DG) are the final 25 HpTx2 structures obtained by distance geometry and minimization.

^b(DG) is the minimized mean structure obtained by averaging the coordinates of the individual DG structures best fitted to each other.

restraints, and 28 long-range restraints. The repartition of these NOE along the sequence is shown on Figure 3. In addition, 10 hydrogen bond restraints and 19 dihedral angle constraints derived from coupling constants have been included, as well as nine distance restraints derived from the three disulfide bridges. Altogether, the final experimental set corresponded to 8.6 constraints per residue on the average. The structures were calculated by using distance geometry protocol using DIANA and energy minimized by CNS. The best-fit superimposition of backbone atoms for 25 models gives root-mean-square deviation (RMSD) values of 0.63 Å for backbone atoms and 1.12 Å if all nonhydrogen atoms are included (Table 1). Analysis of local RMSD values is summarized on Figure 3 and shows that the precision of the calculation is fairly constant along the sequence. A summary of the structural statistics is given in Table 1. All the solutions have good nonbonded contacts, and good covalent geometry as evidenced by low values of CNS energy terms and low RMSD values for bond lengths, valence angles, and improper dihedral angles. The correlation with the experimental data shows no NOE-derived distance violation >0.2 Å. The analysis of the Ramachandran plot shows (in PROCHECK software nomenclature) 90.7% of the residues in the most favored and in the additional regions, 6.6% in the generously

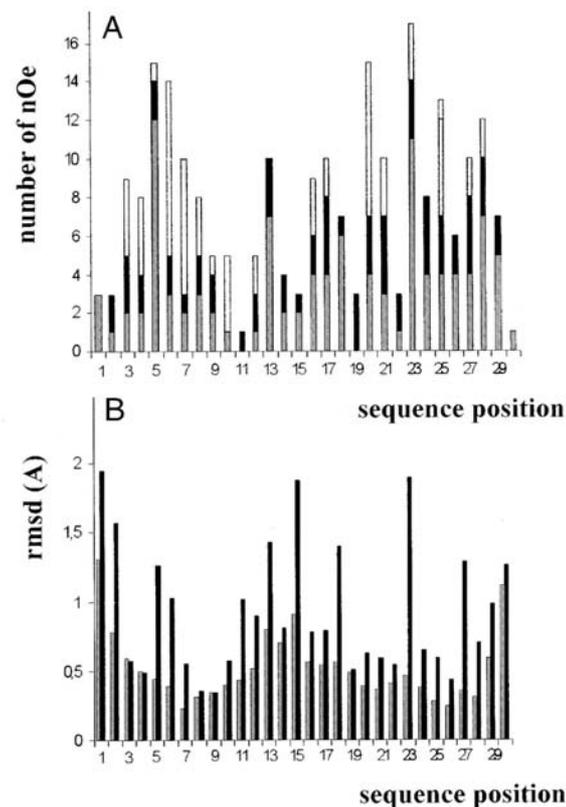


Fig. 3. (A) NOE and (B) RMSD distribution vs. sequence. Intrasidue NOEs are in dark grey; sequential NOEs are in black; medium NOEs are in light grey and long-range NOEs are in white. RMSD value for backbone atoms and all heavy atoms are in grey and black, respectively.

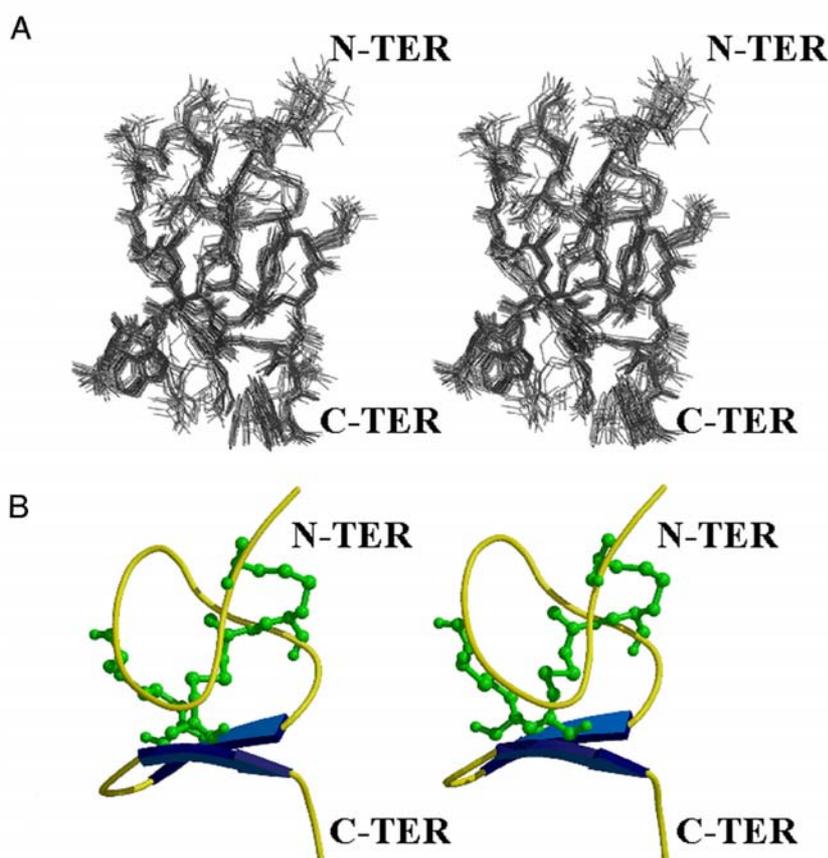


Fig. 4. A: Stereoview of the best fit of 25 solution structures of HpTX2. All nonhydrogen atoms are shown. B: MOLSCRIPT stereo representation.

allowed regions, and only 2.6% in the disallowed regions (data not shown).

Structure description

The 3D structure of HpTX2 (Protein Data Bank id: 1EMX) consists in a compact disulfide-bonded core, from which four loops (4–7, 11–15, 18–21, and 23–25) emerge as well as N- and C-termini (Fig. 4). The existence of $H\alpha_{20}$ – $H\alpha_{28}$ and HN_{21} – HN_{27} NOE together with an upfield shift of α -protons associated with mainly large $H\alpha$ – HN coupling constants and slowly exchanged HN proton for residues 21 and 23 is indicative of a short antiparallel β -sheet encompassing residues 20–23 and 25–28. No other regular secondary structure can be described.

Over the 30 residues of HpTX2, only the side chains of Cys residues are buried. All side-chain conformations are well determined with the exception of Asp1 and Asp2. Analysis of the overall distribution of electrostatic charges reveals a marked anisotropy along the longitudinal axis of the molecule (Fig. 5). The resulting dipole moment of HpTX2 emerges through K27 and is elongated

along the main axis. Surrounding K27 are four aromatic residues (W20, W25, W30, and F7), two basic residues (R23 and K25), and three aliphatic residues (L28, L6, and V21). The opposite surface is mainly acidic (D1, D2, D11, E18).

Discussion

Comparison with other ion channel inhibitors

Spider venoms contain a variety of toxic components. The polypeptide toxins are divided into low and high molecular mass types. Low molecular mass polypeptides interact with Ca^{++} , Na^+ , or K^+ channels (for a review, see Grishin, 1999). Hitherto known low molecular mass spider toxins, but also conotoxins from *Conus geographicus* and maurocalcin from the scorpion *Scorpio maurus* share the same ICK structural motif despite their difference in specificity (Fig. 6). As a matter of fact, maurocalcin has been shown to interact with the ryanodin receptor, whereas μ -conotoxin GIIIA is active on muscle sodium channel (Wakamatsu et al., 1992) as well as conotoxin GS (Hill et al.,

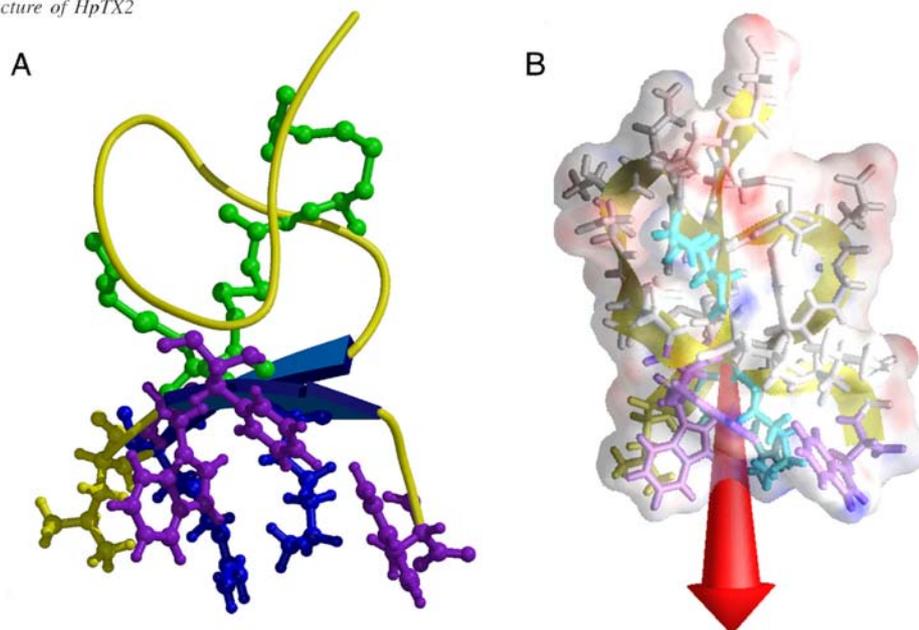


Fig. 5. **A:** MOLSCRIPT representation of the molecule; the side chains of the cystine residues (green) and the ones (purple for aromatic side chains, blue for basic ones and yellow for the aliphatic one) of the putative functional surface are displayed. **B:** Molecular surface colored according to the electrostatic charge (red for acidic and blue for basic) and the resulting dipolar moment (arrow).

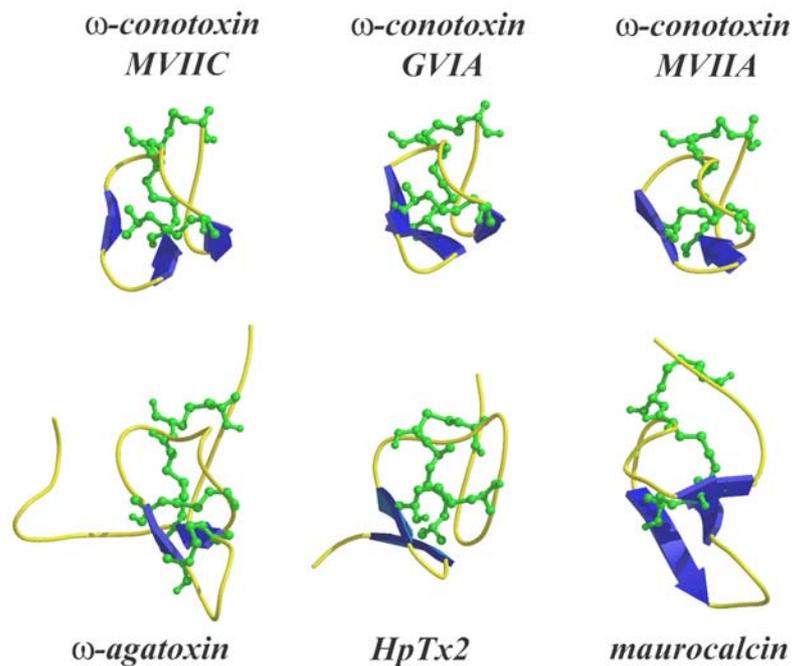


Fig. 6. Comparison of 3D structures of structurally related toxins with HpTX2 in MOLSCRIPT representation.

1997) and μ -agatoxin I. By contrast, κ -conotoxin PVIIA is specific for a voltage-gated potassium channel (Scanlon et al., 1997). Other ICK-toxins have been reported to act on calcium channels: ω -conotoxins MVIIA, MVIIIC, GVIA, and GXIA from *C. geographus* (Civera et al., 1999 and references herein) and ω -agatoxin IVA (Kim et al., 1995) from funnel web spider. It seems therefore impossible to guess the specificity of a given toxin by only referring to its 3D structure.

Functional surface of HpTX2 and comparison with κ -conotoxin PVIIA

More informative is the analysis of its putative functional surface. In that aim, we have developed a prediction method using the orientation of the dipole moment resulting from the electrostatic anisotropy of the studied toxin as a guideline to predict the functional surface.

Two protruding basic residues (a lysine that is supposed to behave like a tethered K^+ ion and to dock into the pore region, an arginine on the edge of the functional surface), an asparagine, a methionine/isoleucine, and an aromatic residue are found in all the potassium channel inhibitor functional sites (Renisio et al., 1999, 2000) and can be considered as the signature motif for their inhibitors. Figure 7 describes the putative functional surface as proposed by the dipole moment orientation. Interestingly, the orientation of the dipole moment of HpTX2 emerges through K27 that could therefore be the critical lysine residue. Close to this lysine are a

second basic residue, R23, an aromatic cluster (F7, W25, W30), and a hydrophobic side chain (L24). An additional basic residue K5 is located on the edge of the putative functional surface. The overall physicochemical characteristics of the proposed functional surface of HpTX2 are therefore in good accordance with those of Kv channels inhibitors. They block potassium conductance by physically occluding the extracellular entryway of the pore. Only the asparagine is lacking. Contrarily, κ -conotoxin PVIIA has been proposed to bind in a voltage-sensitive manner to the external vestibule and to prevent the K^+ efflux by steric hindrance (Scanlon et al., 1997; Savarin et al., 1998). In addition, despite poor identity in amino acid sequence, κ -conotoxin PVIIA and HpTX2 share structural homologies as organized around the same ICK structural motif. Two different proposals have been made concerning the key basic residue that should plug into the pore of the Kv channel: K19 (Scanlon et al., 1997) or K7 (Savarin et al., 1998). When calculating the dipole moment of κ -conotoxin PVIIA, we found it emerging through K25, which is therefore a third proposal for the crucial basic residue. The corresponding functional surface is shown on Figure 7 in which the central residue is K25 surrounded by K7 on one edge and R18 on the other edge, and by N5, V27, and F23. In such an orientation, we thus get the triplet (K25, N5, and V27 taking place of the isoleucine) and the doublet (F23 and R18 or F23 and K7). Therefore, κ -conotoxin PVIIA and HpTX2 display the same needed residues in the needed orientation as charybdotoxin (Stampe et al., 1994) to bind to the voltage-activated potassium channels. This may suggest that HpTX2 similarly docks to

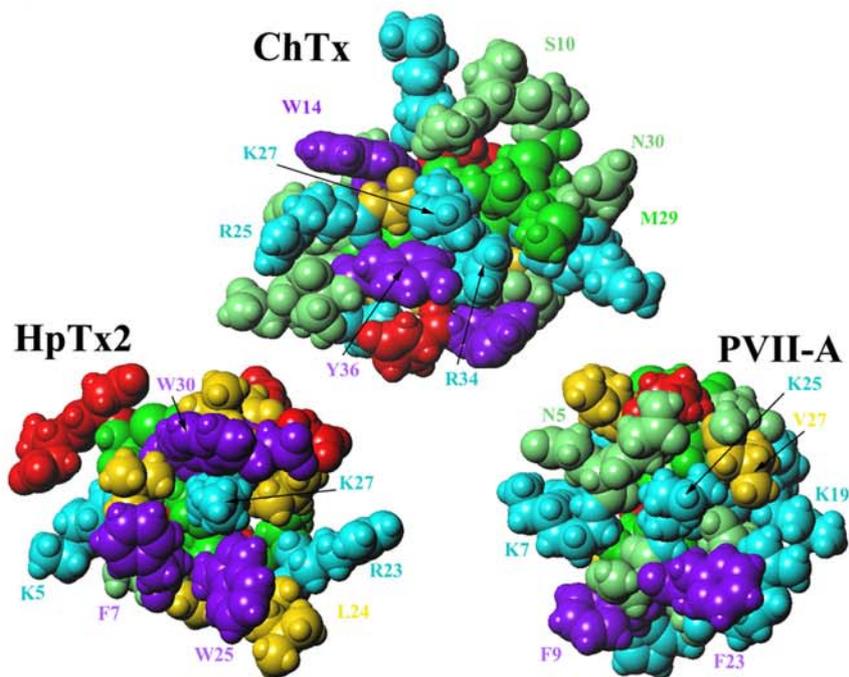


Fig. 7. Comparison of the functional surface of charybdotoxin (top) with the ones proposed for κ -conotoxin PVIIA (bottom right) and HpTX2 (bottom left). The residues involved (ChTX) or suspected to be involved (PVII-A and HpTX2) are labeled. Residues are colored as follow: green for polar uncharged residues, blue for basic residues, red for acidic residues, purple for aromatic residues, and yellow for aliphatic residues.

the pore region of Kv4.2 channels. The fact that the block of Kv4.2 channels by HpTX2 is voltage-dependent does not contradict this observation. Unlike *Shaker*-related Kv channels, Kv4.2 channels inactivate mainly from a closed state. This gating behavior would be well correlated with the voltage dependence of channel block by HpTX2. Alternatively, HpTX2 may bind to Kv4.2 channels at other surface sites away from the pore entrance. It has been reported that hanatoxin interacts with surface sites of Kv2.1 channels that are 10–15 Å away from the pore axis (Swartz & MacKinnon, 1997). The binding region has been mapped on a region spanning from S3 through S4 segments of the K⁺ channel, although other regions besides this linker could contribute to the toxin binding site. However, HpTX2 and hanatoxin share only 20% homology excluding the disulfide bridges. Blocking of Kv4.2 induced by HpTX2 by physically occluding the entryway of the pore channel could therefore not be excluded. Unfortunately, the 3D structure of hanatoxin remains so far unknown, and we therefore cannot check for its dipole orientation.

To ensure the reality of the proposed functional surface and to determine the reason of the specificity of HpTX2 toward Kv4.2 channel (a highly speculative explanation could be the high density in aromatic side chains of the putative functional surface as well as the lack of an asparagine), mutants of HpTX2 are on the way to be produced in which the nature of suspected amino acids to be crucial for binding will be changed.

Materials and methods

Sample preparation

Escherichia coli XI-1 blue (Stratagene, La Jolla, California) was used for plasmid propagation and for the expression of the MPB2-HpTX2 gene. The pMAL-p2 vector (Biolabs, Frankfurt, Germany) was used for expression of fusion proteins exported in the periplasm (Riggs, 1990).

Synthesis and construction of a HpTX2 gene

A DNA sequence encoding HpTX2 was constructed by polymerase chain reaction (PCR) using four 36 mers overlapping oligonucleotides. The 107 bp resulting fragment, flanked by a *Hind*III site at its 3' extremity, was inserted into pMAL-p2 between *Xmn*I and *Hind*III. After subcloning, the sequence of the construct pMAL-p2HpTX2 was verified by DNA sequencing on both strands.

Expression and purification of the recombinant HpTX2

Escherichia coli XI-1 blue containing pMAL-p2HpTX2 construct were grown at 37 °C in 8 L of SB medium in the presence of 100 µg/mL of ampicillin in a fermentor (Biostat B). The expression was induced by adding 0.4 mM IPTG in the mid-logarithmic phase during 3 h. The periplasmic fraction, prepared as described previously (Riggs, 1990), was concentrated and desalted using a 30 K Centricon Plus-80 centrifugal filter (Millipore, Bedford, Massachusetts). Fusion protein was purified by exclusion chromatography on a HighLoad 16/60 Superdex 200 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden) using a running buffer containing 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8. After concentration (final concentration of ~4 mg/mL), using a centricon 30 K unit (Pallfiltron, Rosdorf, Germany) and addition of 2 mM CaCl₂, the cleavage of the MBP2-HpTX2 by factor Xa (1:40, W:W) (Biolabs) was achieved at room temperature for 90 h. The recombinant was purified on a 16/40 Super-

dex 75 column (Pharmacia) and on a sephasil peptide C18 (Pharmacia, 4.6 × 250 mm, 5 µm). Native HpTX2 (NPS Pharmaceuticals, Salt Lake City, Utah) was used to compare chromatographic profiles of recombinant and native toxins.

Electrophysiology

Electrophysiological measurements were carried out on CHO cell line which stably expressed (h)Kv4.2 (Zhu et al., 1999) using the whole-cell configuration (Hamill et al., 1981). The cells were perfused with a solution containing 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, and 10 mM HEPES, 5 mM glucose, pH 7.3. The micropipettes were filled with 130 mM KCl, 5 mM BAPTA-K4, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, and 3 mM ATP-Na₂, 5 mM glucose, pH 7.2. Bovine serum albumin at 0.05% was added to all HpTX2 containing solutions to prevent nonspecific binding of the toxin. Whole-cell experiments were carried out by means of the patch-clamp technique and performed in the voltage-clamp mode. Experiments were performed at room temperature (23 ± 1 °C). Toxin solution was applied directly to the cells using a fast application system (DAD-12, Adams and List).

NMR experiments

A 1.5 mM sample of HpTx2 in 0.5 mL of H₂O/D₂O (90/10 by vol) at pH 3.0 uncorrected for isotope effects was used for NMR spectra recordings. Amide proton exchange rate was determined after lyophilization of this sample and dissolution in 100% D₂O. All ¹H NMR spectra were recorded on BRUKER DRX500 spectrometer equipped with a HCN probe and self-shielded triple axis gradients were used. The experiments were performed at 300 K. Two-dimensional spectra were acquired using states-TPII method (Marion et al., 1989) to achieve F1 quadrature detection (Marion & Wüthrich, 1983). Water suppression was achieved using presaturation during the relaxation delay (1.5 s), and during the mixing time in the case of NOE spectroscopy (NOESY) (Kumar et al., 1981) experiments, or using a watergate 3-9-19 pulse train (Piotto et al., 1992; Sklenar et al., 1992) using a gradient at the magic angle obtained by applying simultaneous *x*-, *y*-, and *z*-gradients prior to detection. NOESY spectra were acquired using mixing times of 80 and 120 ms. Total correlation spectroscopy (TOCSY) (Bax & Davis, 1995; Griesinger et al., 1988) was performed with a spin locking field strength of 8 kHz and mixing time of 80 ms. The amide proton exchange experiments were recorded immediately after dissolution of the peptides in D₂O. A series of NOESY spectra with a mixing time of 80 ms were recorded at 300 K, the first one for 1 h, followed by spectra of 10 h each.

Analysis of spectra

The identification of amino acid spin systems and the sequential assignment were done using the standard strategy described by Wüthrich (1986), applied with a graphical software, XEASY (Bartels et al., 1995). The comparative analysis of correlation spectroscopy and TOCSY spectra recorded in water gave the spin system signatures of the protein. The spin systems were then sequentially connected using the NOESY spectra.

Experimental restraints

The integration of NOE data was done by measuring the peaks volumes. These volumes were then translated into upper limits

distances by the CALIBA routine of DIANA software (Güntert & Wüthrich, 1991). The lower limit was systematically set at 0.18 nm.

The ϕ torsion angles constraints resulted from the $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constant measurements. They were estimated by the INFFT program (Szyperski et al., 1992). For a given residue, separated NOESY cross peaks with the backbone amide proton in the ω_2 dimension were used. Several cross sections through these cross peaks were selected that exhibit a good signal-to-noise ratio. They were added up and only those data points of the peak region that were above the noise level were retained. The left and the right ends of the peak region were then brought to zero intensity by a linear baseline correction. After extending the baseline-corrected peak region with zeros on both sides, which is equivalent to over sampling in the time domain, an inverse Fourier transformation was performed. The value of the $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constant was obtained from the first local minimum. $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constants were translated into angle restraints using HABAS from the DIANA package.

Structure calculation

Distance geometry calculations were performed with the variable target function program DIANA 2.8. A preliminary set of 1,000 structures was initiated including only intraresidual and sequential upper limit distances. From these, the 500 best were kept for a second round, including medium-range distances, and the resulting 250 best for a third one, with the whole set of upper limits restraints, and some additional distance restraints, used to define the disulfide bridges (i.e., $d_{\text{S}\gamma\text{S}\gamma}$ 0.21 nm, $d_{\text{C}\beta\text{S}\gamma}$, and $d_{\text{S}\gamma\text{C}\beta}$ 0.31 nm). Starting from the 50 best structures, a REDAC strategy (Güntert & Wüthrich, 1991) was used in a last step to include the dihedral constraints together with the additional distances restraints coming from hydrogen bonds.

To remove residual bad Van der Waals contacts, these 50 structures were refined by restrained molecular dynamics annealing, slow cooling, and energy minimization (parameter file: protein-allhdg in CNS).

The visual analysis were done using the TURBO software and the geometric quality of the obtained structures was assessed by PROCHECK 3.3 and PROCHECK-NMR softwares (Laskowski et al., 1993).

Acknowledgments

The authors would like to thank Stephane Canarelli for amino acid analysis and sequence determination, Christian Schulze for technical assistance, Olivier Bornet for NMR spectra acquisitions, and Christian Cambillau for constant help and support. We also thank NPS Pharmaceuticals for the generous gift of natural HpTX2 molecule.

References

Aiyar J, Rizzi JP, Gutman GA, Chandry KG. 1996. The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *J Biol Chem* 271:31013–31016.

Bartels Ch, Xia T-H, Billeter M, Güntert P, Wüthrich K. 1995. The program XEASY for computer-supported NMR spectral analysis of biological macromolecules. *J Biomol NMR* 5:1–10.

Bax A, Davis DG. 1995. MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy. *J Magn Reson* 65:355–360.

Blanc E, Lecomte C, Van Rietschoten J, Sabatier JM, Darbon H. 1997. Solution structure of TskapA, a charybdotoxin-like scorpion toxin from *Tityus serrulatus* with high affinity for apamin-sensitive Ca^{2+} -activated K^{+} channel. *Proteins* 29:359–369.

Bystrov VF, Okhanov VV, Miroshnikov AI, Ovchinnikov YA. 1980. Solution spatial structure of apamin as derived from NMR study. *FEBS Lett* 119: 113–117.

Civera C, Vazquez A, Sevilla JM, Bruix M, Gago F, Garcia AG, Sevilla P. 1999. Solution structure determination by 2D ^1H NMR of ω -conotoxin TIVVID, a calcium channel blocker peptide. *Biochem Biophys Res Com* 254:32–35.

Darbon H, Blanc E, Sabatier J-M. 2000. 3D structure of scorpion toxin: Towards a new model of interaction with potassium channel. In: Darbon H, Sabatier J-M, eds. *Perspective in drug discovery and design*, vols. 15/16. Dordrecht: Kluwer, pp 41–60.

Flinn JP, Pallaghy PK, Lew MJ, Murphy R, Angus JA, Norton RS. 1999. Roles of key functional groups in ω -conotoxin GVIA. *Eur J Biochem* 262:447–455.

Fremont V, Blanc E, Crest M, Eauclaire MF, Gola M, Darbon H, Van Rietschoten J. 1997. Dipole moments of scorpion toxins direct the interaction towards small- or large-conductance Ca^{++} -activated K^{+} channels. *Lett Peptide Sci* 4:305–312.

Goldstein SAN, Pheasant DJ, Miller C. 1994. The charybdotoxin receptor of a shaker K^{+} channel: Peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 12:1377–1388.

Griesinger C, Otting G, Wüthrich K, Ernst RR. 1988. Clean-TOCSY for ^1H spin system identification in macromolecules. *J Am Chem Soc* 110:7870–7872.

Grishin E. 1999. Polypeptide neurotoxins from spider venoms. 1999. *Eur J Biochem* 264:276–280.

Güntert P, Wüthrich K. 1991. Improved efficiency of protein structure calculations from NMR data using the program DIANA with redundant dihedral angle constraints. *J Biomol NMR* 1:447–456.

Habermann E, Fischer K. 1979. Apamin, a centrally acting neurotoxic peptide: Binding and actions. *Adv Cytopharmacol* 3:387–394.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85–100.

Hill JM, Alewood PF, Craik DJ. 1997. Solution structure of the sodium channel antagonist conotoxin GS: A new molecular caliper for probing sodium channel geometry. *Structure* 5:571–583.

Kim JI, Konishi S, Iwai H, Kohno T, Gouda H, Shimada H, Sato K, Arata Y. 1995. 3D solution structure of the calcium channel antagonist co-agatoxin IVA: Consensus molecular folding of calcium channel blockers. *J Mol Biol* 250:659–671.

Kumar A, Ernst RR, Wüthrich K. 1981. A two-dimensional nuclear Overhauser enhancement (2D NOE) experiment for the elucidation of complete proton-proton cross-relaxation networks in biological macromolecules. *Biochem Biophys Res Commun* 95:1–6.

Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DM, Thornton JM. 1993. A program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 26:283–291.

Marion D, Ikuto Tschudin M, Bax A. 1989. Rapid recording of 2D NMR spectra without phase cycling. Application to the study of hydrogen exchange in protein. *J Mag Reson* 85:393–399.

Marion D, Wüthrich K. 1983. Application of phase sensitive two dimensional correlated spectroscopy (COSY) for measurements of H-H spin-spin coupling constants in proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 113:967–974.

Miller C. 1995. The charybdotoxin family of K^{+} channel-blocking peptides. *Neuron* 15:5–10.

Naranjo D, Miller C. 1996. A strongly interacting pair of residues on the contact surface charybdotoxin and a shaker channel. *Neuron* 16:123–130.

Pease JH, Wemmer DE. 1988. Solution structure of apamin determined by nuclear magnetic resonance and distance geometry. *Biochemistry* 27:8491–8498.

Piotto M, Saudek V, Sklenar V. 1992. Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *J Biomol NMR* 2:661–665.

Possani LD. 1984. Insect poisons, allergens, and other invertebrate venoms. In: Tu E, ed. *Handbook of natural toxins*, vol. 2. New York: Marcel Dekker, pp 607–636.

Ranganathan R, Lewis JH, MacKinnon R. 1996. Spatial localization of the K^{+} channel selectivity filter by mutant cycle-based structure analysis. *Neuron* 16:131–139.

Renisio JG, Lu Z, Blanc E, Jin W, Lewis JH, Bornet O, Darbon H. 1999. Solution structure of potassium channel-inhibiting scorpion toxin Lq2. *Proteins* 34:417–426.

Renisio JG, Romi-Lebrun R, Blanc E, Bornet O, Nakajima T, Darbon H. 2000. Solution structure of BmKTX, a K^{+} blocker toxin from the Chinese scorpion *Buthus martensi*. *Proteins* 38:70–78.

Riggs P. 1990. Purification of fusion proteins from the periplasm. In: Ausebel FM, eds. *Current protocols in molecular biology*. New York: Greene Associates/Wiley Interscience.

Sanguinetti MC, Johnson JH, Hammerland LG, Kelbaugh PR, Volkman RA, Saccomano NA, Mueller AL. 1997. Heteropodatoxins: Peptides isolated

- from spider venom that block Kv4.2 potassium channels. *Mol Pharmacol* 51:491–498.
- Savarin P, Guenneugues M, Gilquin B, Lamthanh H, Gasparini S, Zinn-Justin S, Menez A. 1998. Three-dimensional structure of kappa-conotoxin PVIIA, a novel potassium channel-blocking toxin from cone snails. *Biochemistry* 37:5407–5416.
- Scanlon MJ, Naranjo D, Thomas LA, Alewood PF, Lewis RJ, Craik DJ. 1997. Solution structure and proposed binding mechanism of a novel potassium channel toxin k-conotoxin PVIIA. *Structure* 5:1585–1597.
- Sklenar V, Piotto M, Leppik R, Saudek V. 1992. Gradient-tailored water suppression for 1H-15N HSQC experiments optimised to retain full sensitivity. *J Mag Reson* 102:241–245.
- Stampe P, Kolmakova-Partenski L, Miller C. 1994. Intimation of K⁺ channel from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry* 33:443–450.
- Swartz KJ, MacKinnon R. 1997. Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron* 18(4):665–673.
- Szyperski T, Güntert P, Otting G, Wüthrich K. 1992. Determination of scalar coupling constants by inverse Fourier transformation of in-phase multiplets. *J Magn Reson* 99:552–560.
- Vincent JP, Schweitz H, Lazdunski M. 1975. Structure-function relationships and site of action of apamin, a neurotoxic polypeptide of bee venom with an action on the central nervous system. *Biochemistry* 14:2521–2525.
- Wakamatsu K, Kohda D, Hatanaka H, Lancelin JM, Ishida Y, Oya M, Nakamaru H, Inagaki F, Sato K. 1992. Structure-activity relationships of μ -conotoxin GIIIA: Structure determination of active and inactive sodium channel blocker peptides by NMR and simulated annealing calculations. *Biochemistry* 31:12577–12584.
- Wüthrich K. 1986. Resonance assignment and structure determination in proteins. In: *NMR of proteins and nucleic acids*. New York: John Wiley and Sons.
- Zhu XR, Wulf A, Schwarz M, Isbrandt D, Pongs O. 1999. Characterization of human Kv4.2 mediating a rapidly-inactivating transient voltage sensitive K⁺ current. *Receptors Channels* 6:387–400.

Conclusion

La résolution de la structure d' HpTx2, l'analyse de l'anisotropie des charges électrostatiques et la comparaison avec la charybdotoxine (ChTx) et la κ -PVIIA nous a permis de proposer une carte fonctionnelle putative de la toxine envers le canal $K_{V4.2}$. La ChTx et κ -PVIIA inhibent les canaux K_V par occlusion du pore. Le site et le mode d'interaction d'HpTx2 ne sont pas encore déterminés.

La résolution de la structure de l'hanatoxine 1 (HaTx1, interagissant non pas au niveau du pore de conduction mais au niveau du domaine de sensibilité au potentiel du canal potassium K_V) impose, pour compléter l'analyse des déterminants potentiels d'HpTx2, de comparer les surfaces prédites par le moment dipolaire de ces dernières. Le dipôle de l'hanatoxine émerge à travers le résidu F6 et la surface ainsi indiquée est représentée et comparée à celle décrite pour HpTx2 dans la **figure 66**.

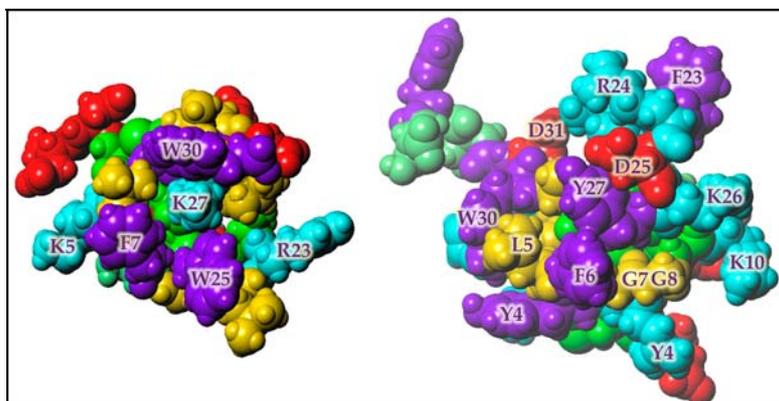


Figure 66 : Comparaison des surfaces d'interaction putatives prédites par le calcul du moment dipolaire. Les résidus sont colorés en fonction de la nature de leur chaîne latérale : bleu clair pour les résidus basiques, violet pour les aromatiques, vert pour les polaires, rouge pour les acides et jaune pour les aliphatiques.

Les surfaces de ces deux toxines présentent une certaine similitude dans la répartition de certains de leur résidus aromatiques, aliphatiques, et des différences dont une majeure : le résidu K27 d'HpTx2 au centre du cluster aromatique est remplacé par L5 dans HaTx1 ; Ces deux résidus de natures très différentes, basique et aliphatique respectivement, rendent l'interprétation très difficile, en absence de toute information concernant des mutants de ces toxines.

**^1H NMR Solution Structure of the $\text{K}_{\text{V}4.2}$ Gating Modifier Phrixotoxin 1,
a Toxin Extracted from the *Phrixotrichus auratus* Tarentula Venom.**

Cédric Bernard, Benjamin Chagot, Pierre Escoubas, Michel Lazdunski, and Hervé
Darbon

En préparation

Isolée à partir du venin de la tarentule *Phrixotrichus auratus*, la phrixotoxine 1 (PaTx1) est composée 29 résidus. Cette toxine est totalement spécifique et très affine des canaux K^+ voltage-dépendants de type $K_{V4.2}$ et $K_{V4.3}$ (aucune activité sur les K_{V1} , K_{V2} ou K_{V3}). Cette toxine altère les propriétés d'ouverture de ces canaux et pourrait ainsi interagir avec le canal de façon analogue au modèle décrit pour l'hanatoxine 1, soit la combinaison d'une région hydrophobe et de résidus basiques (Li-Smerin et Swartz, 2000; Takahashi et coll., 2000; Li-Smerin et Swartz, 2001). Sa structure s'architecture autour du motif ICK. L'analyse de l'anisotropie des charges électrostatiques et la comparaison de la surface d'interaction potentielle de PaTx1 avec celle de l'HpTx2 (hétéropodatoxine 2, spécifique des canaux $K_{V4.2}$) et de l'HaTx1 (hanatoxine 1) montrent de fortes similitudes entre les surfaces de PaTx1 et HpTx2, et moins d'analogies entre HaTx1 et PaTx1. Ces différences dans les surfaces fonctionnelles putatives de ces toxines sont discutées dans le manuscrit ci-après, en préparation.

¹H NMR Solution Structure of the K_{V4.2} Gating Modifier Phrixotoxin 1, a Toxin Extracted from the *Phrixotrichus auratus* Tarentula Venom

Cédric Bernard^{2§}, Benjamin Chagot^{2§}, Pierre Escoubas^{1,3}, Gérard Lambeau¹, Michel Lazdunski^{1*} and Hervé Darbon^{2*}

1- Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR 6097, 660 Route des Lucioles, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France.

2- AFMB, CNRS UMR 6098 and Universités d'Aix-Marseille I and II, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13402 Marseille Cedex 20, France.

3- Université Pierre et Marie Curie, Paris, France.

Running Head: Solution structure of Phrixotoxin 1

Keywords: NMR, spider toxin, structure determination, ICK, gating modifier, K_{V4.2}

*Authors to whom correspondence should be addressed: H. Darbon, Tel: +33 (0)4-91-16-45-35, Fax: +33 (0)4-91-16-45-36, e-mail: herve@afmb.cnrs-mrs.fr and M. Lazdunski, Tel: +33 (0)4-93-95-77-02, Fax: +33 (0)4-93-95-77-04, e-mail: ipmc@ipmc.cnrs.fr

§ Both authors have made equal contributions to this work

Introduction

Spider venoms are complex mixtures of neurotoxic peptides, proteins and low molecular mass organic molecules. Their neurotoxic activity is due to the interaction of the venom components with cellular receptors, in particular ion channels. Spider venoms have proven to be a rich source of highly specific peptide ligands for selected subtypes of potassium, sodium and calcium channels. The discovery of hanatoxins in the venom of the tarantula *Grammostola spatulata*, the first spider toxins acting on voltage-dependent potassium channels ($K_{V2.1}$), is recent (1) and confirms the pharmacological diversity of spider venoms. They are peptides of 35 amino acids cross-linked by three disulfide bridges, that act in a voltage-dependent manner by modifying the gating properties of the channels and appear to bind to four equivalent external sites close to the voltage sensor (S4 segment). Contrary to scorpion toxins which act by pore occlusion, spider toxins appear to bind to sites outside the pore and modify gating properties of the channels (2,3). The first toxins blocking K_{V4} channels were the heteropodatoxins from *Heteropoda venatoria* ((4)), followed by the phrixotoxins from *Phrixotrichus auratus* (5). Physiological studies show that the phrixotoxins block the K_{V4} channel via a mechanism similar to that of hanatoxins on K_{V2} channels. The toxins affect preferentially the closed channel, in a voltage-dependent manner (5).). In this paper, we describe the solution structure, obtained by two dimensional- ^1H -NMR techniques, of *Phrixotrichus auratus* toxin 1 (PaTx1).

Materials and methods

Sample preparation for NMR

Recombinant PaTx1 (2.6 mg) was solubilized in 450 μl of a H_2O / D_2O mixture (9:1 v/v), to give a protein concentration of 1.5 mM at a pH of 3.0. The amide proton exchange rate was determined after lyophilization of this sample and dissolution in 100% D_2O .

NMR experiments

All ^1H NMR spectra were recorded on a BRUKER DRX500 spectrometer equipped with a HCN probe and self shielded triple axis gradients were used. The experiments were performed at two different temperatures in order to solve assignment ambiguities (283 K and 300 K). Two-dimensional spectra were acquired using states-TPPI method to achieve F1 quadrature detection]. Water suppression was achieved using presaturation during

the relaxation delay (1.5 s), and during the mixing time in the case of NOESY experiments, or using a watergate 3-9-19 pulse train using a gradient at the magic angle obtained by applying simultaneous x-, y- and z- gradients prior to detection. NOESY spectra were acquired using mixing times of 100 ms and 120 ms. TOCSY was performed with a spin locking field strength of 8 kHz and spin lock time of 80 ms. The amide proton exchange experiments were recorded immediately after dissolution of the peptides in D₂O. A series of NOESY spectra with a mixing time of 80 ms were recorded at 283K, the first one for one hour, followed by spectra of 4 hours each.

The identification of amino acid spin systems and the sequential assignment were done using the standard strategy described by Wüthrich and regularly used by our group (6-8), with the graphical software XEASY. The comparative analysis of TOCSY spectra recorded in water gave the spin system signatures of the protein. The spin systems were then sequentially connected using the NOESY spectra.

The integration of NOE data was done by measuring the peak volumes using a specific routine of the XEASY package. These volumes were then translated into upper limits distances by the CALIBA routine of the DIANA software. The lower limit was systematically set at 0.18nm.

The ϕ torsion angles constraints resulted from the $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constant measurements. They were estimated with the INFIT program. For a given residue, separated NOESY cross-peaks with the backbone amide proton in the ω_2 dimension were used. Several cross-sections through these cross-peaks were selected that exhibited a good signal-to-noise ratio. They were added up and only those data points of the peak region that were above the noise level were retained. The left and right ends of the peak region were then brought to zero intensity by linear baseline correction. After extending the baseline-corrected peak region with zeros on both sides, which is equivalent to oversampling in the time domain, an inverse Fourier transformation was performed. The value of the $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constant was obtained from the first local minimum. $^3J_{\text{HN-H}\alpha}$ coupling constants were translated into angle restraints using HABAS from the DIANA package.

Structure calculation

Distance geometry calculations were performed with the variable target function program DIANA 2.8. A preliminary set of 1,000 structures was initiated including only intra-residual and sequential upper limit distances. From these, the 500 best as shown by the value of the target function were kept for a second round including medium range

distances. The resulting 250 best were kept for a third round, using the whole set of upper limits restraints and some additional distance restraints to define the disulfide bridges (i.e. $d_{S\gamma,S\gamma}$ 0.21nm, $d_{C\beta,S\gamma}$ and $d_{S\gamma,C\beta}$ 0.31nm). Starting from the 100 best structures, one REDAC cycle was used in a last step in order to include the dihedral constraints together with the additional distances restraints coming from hydrogen bonds.

To remove residual bad Van der Waals contacts, the 20 best structures were refined by restrained molecular dynamics annealing, slow cooling and energy minimisation (parameter file: protein-allhdg in CNS). Visual analysis was done using the TURBO software and the geometric quality of the obtained structures was assessed by PROCHECK 3.3 and PROCHECK-NMR software.

Résidue	HN	H ^α	H ^β	other
Y1		(4.211)	(3.086)	C ^ε , 6.835
C2	(8.00)	(4.924)	(3.064, 3.011)	
Q3	(9.02)	(4.350)	(2.017, 2.171)	C ^γ (1.908, 2.596);
K4	(5.00)	(3.486)	(-0.606, 1.256)	C ^γ (0.215, 0.526); N ^ε (7.348)
W5	(7.85)	(3.978)	(2.878, 2.991)	C ^{δ1} (7.423); N ^{ε1} (10.665)
M6	(9.21)	(3.797)	(1.596, 1.917)	C ^γ (0.426, 1.251)
W7	(8.61)	(4.885)	(3.298, 3.458)	C ^{δ1} (6.922); C ^{ε3} (7.587); C ^{ε2} (7.936); C ^{ε3} (7.182); N ^{ε1}
T8	(8.46)	(4.358)	(4.151)	C ^{γ2} (1.137)
C9	(7.69)	(5.008)	(3.219)	
D10	(8.53)	(4.261)	(3.026)	
S11	(8.33)	(3.916)	(3.760)	
A12	(8.01)	(4.337)	(1.313)	
R13	(7.90)	(4.381)	(1.233, 1.656)	C ^δ (2.878, 3.053); N ^ε (6.864)
K14	(7.84)	(4.201)	(1.304)	C ^γ (1.749); C ^δ (1.589); N ^ε (7.409)
C15	(9.01)	(4.842)	(2.355, 3.026)	
C16	(8.98)	(4.362)	(2.322, 3.223)	
E17	(8.16)	(3.934)	(1.869, 1.808)	C ^γ (2.242)
G18	(8.79)	(3.466)	(3.466)	
L19	(7.34)	(5.091)	(1.218, 1.970)	C ^γ (1.184); C ^{δ1} (0.572); C ^{δ2} (0.658)
V20	(9.30)	(4.362)	(1.702)	C ^γ (0.665); C ^{γ2} (0.703)
C21	(8.87)	(4.551)	(2.658, 3.194)	
R22	(8.18)	(4.362)	(1.516, 1.726)	C ^γ (1.294); C ^δ (2.914, 3.100); N ^ε (7.075)
L23	(7.91)	(3.608)	(1.009, 2.114)	C ^γ (1.366); C ^{δ1} (0.659); C ^{δ2} (0.659)
W24	(7.95)	(5.116)	(2.561, 2.857)	C ^{δ1} (6.904); C ^{ε3} (7.362); C ^{ε2} (7.415); C ^{ε3} (7.016); N ^{ε1}
C25	(8.68)	(4.741)	(2.678, 3.326)	
K26	(9.40)	(4.810)	(1.571)	C ^γ (1.263, 1.395); C ^δ (1.832); N ^ε (7.447)
K27	(8.24)	(4.190)	(1.320, 1.544)	C ^γ (0.822, 1.099); C ^δ (0.968); C ^ε (2.028, 2.229); N ^ε
I28	(7.83)	(3.801)	(1.685)	C ^{γ1} (0.994, 1.390); C ^{γ2} (0.806); C ^{δ1} (0.576)
I29	(8.04)	(3.976)	(1.641)	C ^{γ1} (1.241, 1.491); C ^{γ2} (1.002); C ^{δ1} (0.706)

Table 1 : resonance assignments; (proton chemical shifts are given in parentheses).
 (*): resonance that cannot be observed

Results and discussion

NMR resonance assignments

The spin systems were identified on the basis of both COSY and TOCSY spectra recorded at 300, 290 and 283K. The use of three temperatures for recording allowed us to resolve overlapping signals in the fingerprint region, and thus intraresidue HN-H_α cross peaks were unambiguously assigned. At the end of the sequential assignment procedure, almost all protons were identified and their resonance frequency determined (Table 1). As shown by the repartition of the H_α/H_N and H_N/H_N correlations, the toxin is essentially

organized in loops, besides two extended regions characterized by strong H_{α}/H_N correlations (Fig 1).

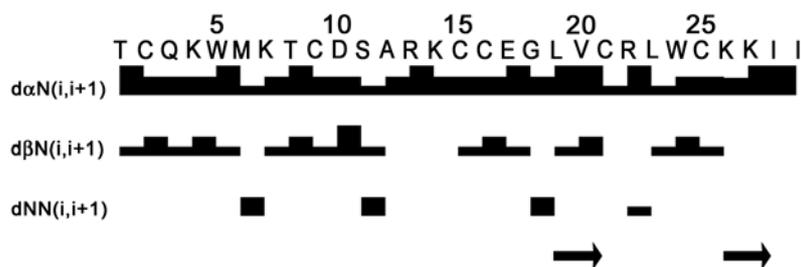


Figure 1: Sequence of PaTx1 and sequential assignment. Collected sequential nOe are classified into strong and weak nOe and are indicated by thick and thin bars respectively. The secondary elements (β -sheets) are indicated by arrows.

Structure calculation

The structure of PaTx1 was determined by using 200 nOe-based distance restraints, including 97 intra-residue restraints, 57 sequential restraints, 20 medium range restraints and 26 long range restraints. The repartition of these nOe along the sequence is shown in Figure 2. In addition, 20 hydrogen bond restraints 9 distance restraints derived from the three disulfide bridges which have been deduced from homologies with related spider toxins [3]. Altogether, the final experimental set corresponded to 7,9 constraints per residue on the average. The structures were calculated with DIANA using a distance geometry protocol, and energy minimized by CNS. The best-fit superimposition of backbone atoms for the 20 best structures gives RMSD values of $0.87 \pm 0.23 \text{ \AA}$ for backbone atoms and $1.87 \pm 0.37 \text{ \AA}$ if all non-hydrogen atoms are included. A summary of the structural statistics are given in Table 2. All the solutions have good non-bonded contacts and good covalent geometry as shown by the low values of CNS energy terms and low RMSD values for bond lengths, valence angles and improper dihedral angles. Correlation with the experimental data shows no nOe-derived distance violation greater than 0.2 \AA . The analysis of the Ramachandran plot for the ensemble of the 20 calculated models (in PROCHECK software nomenclature) shows 85.9% of the residues in the most favored and additional

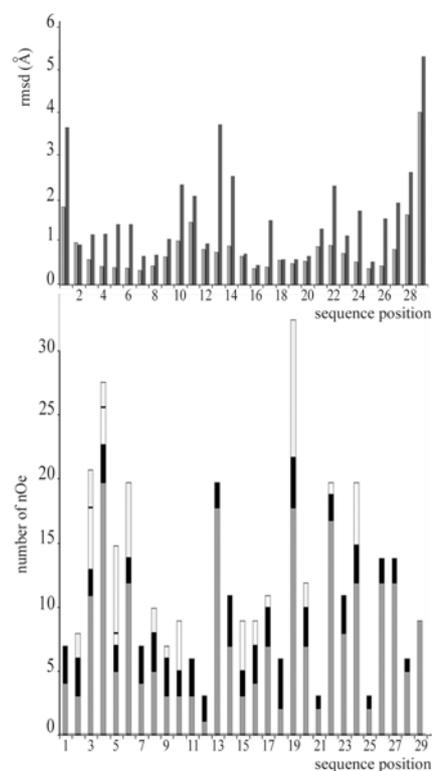


Figure 2 : RMSD (top) and nOe (bottom) distribution vs sequence. RMSD values for backbone atoms and all heavy atoms are in grey and black respectively. Intraresidue nOe are in dark grey; sequential nOe are in black, medium nOe are in light grey and long range nOe are in white.

regions, 10.3% in the generously allowed regions, and only 3.8% in the disallowed regions (data not shown).

RMSD (Å)		
Backbone	0.87 +/- 0.23	
All heavy atoms	1.87 +/- 0.37	
<hr/>		
	(DG)	<DG>
ENERGIES (kcal/mol)		
Total	32.62	34.66
Bonds	1.16	1.32
Angles	19.59	20.37
Impropers	0.93	1.1
van der Waals (repel)	5.15	5.66
nOe	5.80	6.22
RMSD		
Bonds	0.001	0.001
Angles	0.377	0.385
Impropers	0.145	0.160
Dihedral	30.219	29.926
NOe	0.015	0.016

Table 2. Structural Statistics of the 20 Best Structures

(DG) are the final 20 PaTx1 structures obtained by distance geometry and minimization. <DG> is the minimized mean structure obtained by averaging the coordinates of the individual DG structures best fitted to each other.

1 (Leu 19 to Cys21) and β -strand 2 (Lys 26 to Ile 28). No other regular secondary structure can be described. Over the 29 residues of PaTX1, only the side chains of Cys residues are buried. All side chain conformations are well determined with the exception of the region of the N-terminus and of the last two residues.

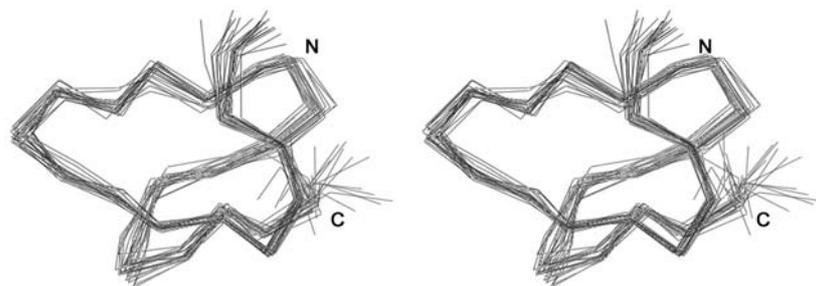


Figure 3 : Stereo view of the best fit of 20 solution structures of PaTx1. C_{α} are shown. The N and C termini are labeled (N and C)

Structure description

The three-dimensional structure of PaTx1 consists in a compact disulfide-bonded core, from which four loops emerge (i.e., loop1 from Gln3 to Thr8, loop2 from Asp10 to Lys14, loop3 from Glu17 to Val20 and loop4 from Arg22 to Trp24) as well as N- and C-terminii . The figure 3 shows a stereopair representation of the best-fit superposition of the backbone atoms (N, C_{α} , C) for 20 converged structures.

Analysis of the 20 converged structures indicates that the molecular structure of PaTx1 contains a β -sheet region made of two antiparallel β -strands, i.e., β -strand

Comparison with related toxins

The PaTx1 fold can be classified as a *inhibitor cystine knot* (ICK) fold already described for numerous toxic and inhibitory animal venom peptides. Many ion channels effectors from marine snails, spider and scorpion venoms share the same ICK fold although they

possess widely different pharmacological profiles. PaTx1 is active on calcium channels, the spider peptides μ -agatoxin I whereas is active on muscle Na⁺ channel, similarly to the δ -palutoxins, and the δ -atracotoxins. By

contrast, κ -conotoxin PVIIA from cone snails, hanatoxins, HpTx2 and stromatoxins respectively from the spiders *Grammostola spatulata*, *Heteropoda venatoria* and *Stromatopelma calceata* act against voltage-dependent K⁺ channels. Other ICK toxins have been reported to act on Ca²⁺ channels, such as the ω -conotoxins MVIIA and GVIA ,

ω -agatoxins IVA and IVB, huwentoxin , SNX482, ω -GsTx SIA and the ω -atracotoxins respectively from the venoms of the spiders *Agelenopsis aperta*, *Selenocosmia huwena*, *Hysteroocrates gigas*, *Grammostola spatulata* and *Hadronyche ssp*, Ptu1 from saliva of the assassin bug *Peirates turpis* maurocalcine from the scorpion *Scorpio maurus*. Figure 4 represents the PaTx1 structure compared with the one of other K_V channel blockers.

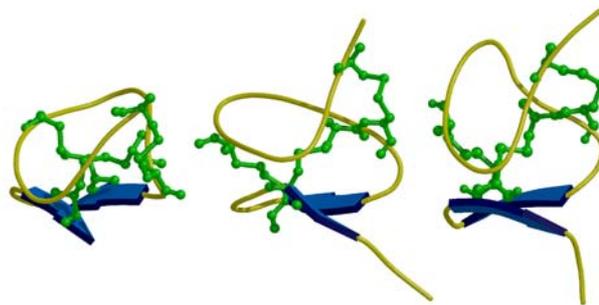


Figure 4 : Comparison of the structure of ICK toxins that acts against K_V channels: κ -conotoxin PVIIA (left) PaTx1 (middle) and HpTx2 (right).

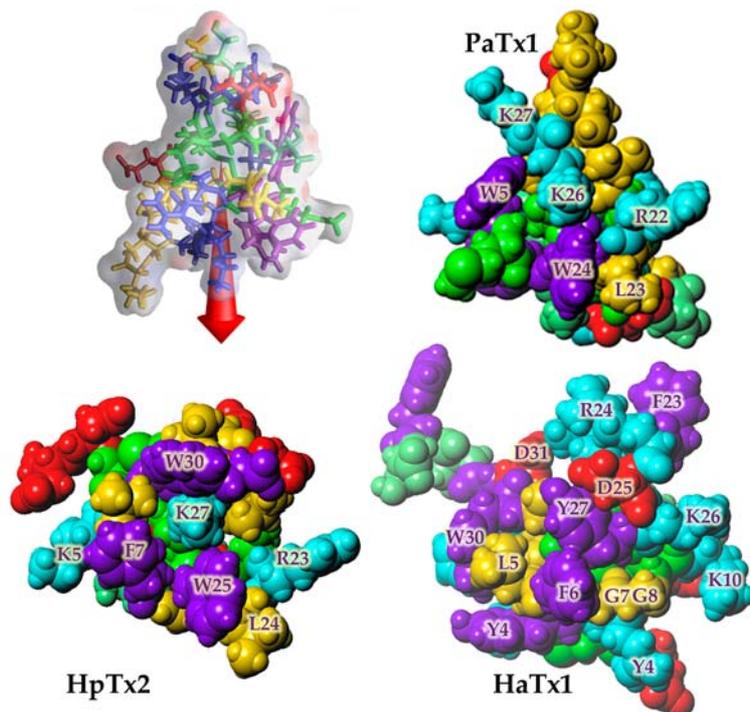


Figure 5 : Orientation of the dipole moment of PaTx1 (top left) emerging through K26. The resulting putative functional surface of PaTx1 is represented, centered around K26 (top right). The same procedure was used to generate the corresponding surfaces of HpTx2 (bottom left) and HaTx1 (bottom right). Residues are colored as follow : green for polar uncharged residues, blue for basic residues, red for acidic residues, purple for aromatic residues, and yellow for aliphatic residues.

Then both surfaces are very similar : close to the central lysine are a second basic residue (R22 and R23 for PaTx1 and HpTx2 respectively), an aromatic cluster (W5 and

More informative is the analysis of the putative functional surface. In that aim, we have developed a prediction method using the orientation of the dipole moment resulting from the electrostatic anisotropy of the studied toxin as a guideline to predict the functional surface. Figure 5 describes the putative functional surface as proposed by the dipole moment orientation for PaTx1 as well as for HpTx2 (Heteropodatoxin 2) and HaTx1 (Hanatoxin 1). Interestingly, the orientation of the dipole moment of Patx1 emerges through K26 just like the one of HpTx2, emerging through K27.

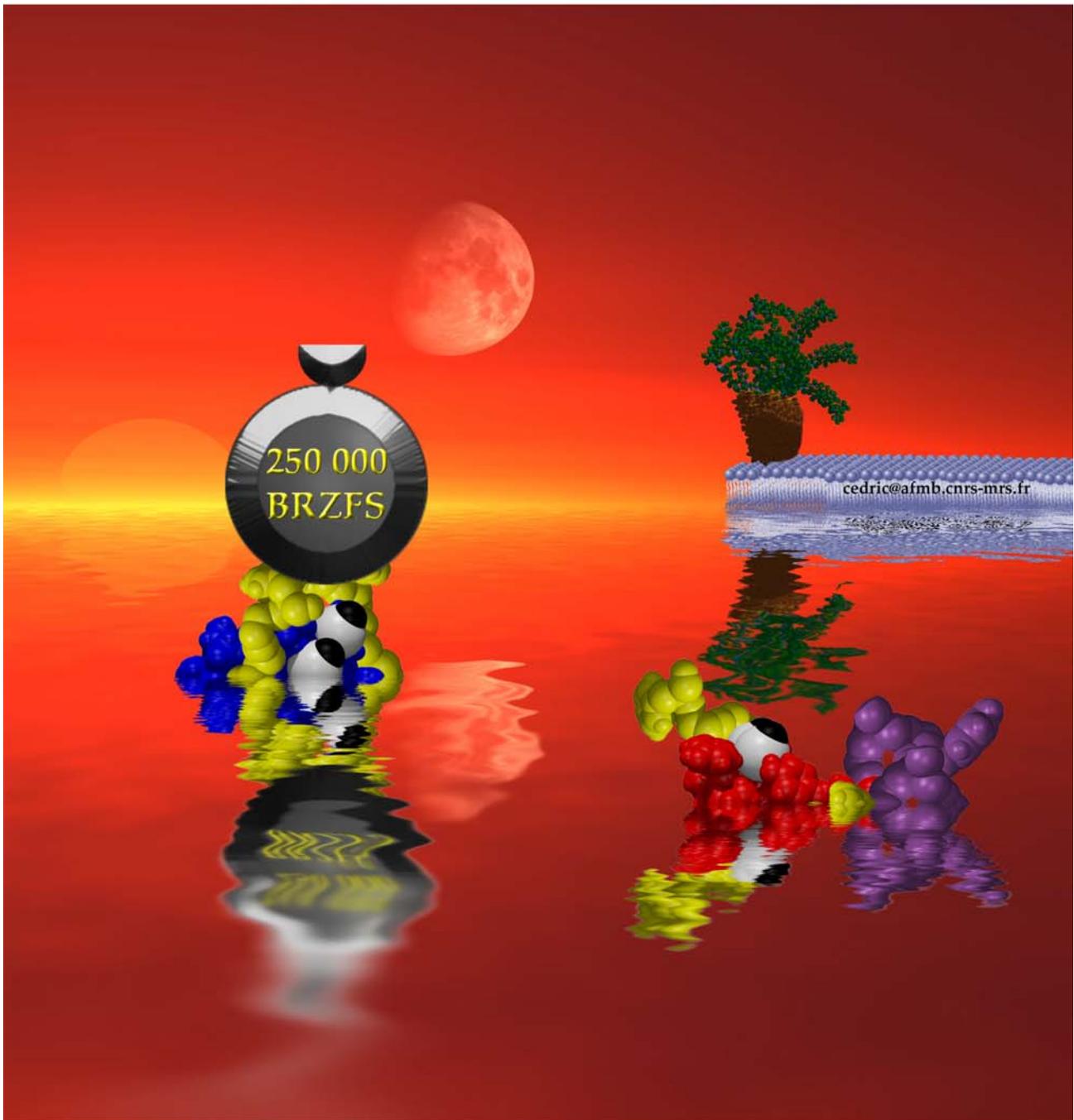
W24 for PaTx1, and F7, W25 and W30 for HpTx2) and a hydrophobic side chain (L23 and L24 for PaTx1 and HpTx2 respectively). These functional surfaces are therefore in good accordance with those of Kv channels inhibitors that occlude the extracellular entryway of the pore. PaTx1 has been described as a gating modifier, but it seems, as well as HpTx2, to display the needed residues to dock to the pore region of $K_{v4.2}$ channels. The structure of Hanatoxin1, another K_v channel gating modifier, has been solved. The dipole moment calculation applied to this toxin shows that it emerges through F6. The resulting surface display some common features with the one of PaTx1 and HpTx2, i.e. a cluster of aromatic residues (Y4, F6, Y27, W30), an hydrophobic side chain (L5) and some basic residues (R3, K10, R24 and K26); But these residues are dispatched in a different manner, especially the central lysine K26 in Patx1 which is replaced by the hydrophobic Leucine L5 in HaTx1. The main hypothesis that could be made is that PaTx1, as well as HpTx2, interact with the $K_{v4.2}$ channel in a similar manner than HaTx1 but that the location of the interaction site is slightly different for these toxins. Indeed, this hypothesis needs to be confirmed by mutant analysis and competition experiment for binding between [I^{125} -HaTx1] and PaTx1 (or HpTx2).

Conclusion

La structure de PaTx1 s'organise autour du motif ICK classique. L'analyse de l'anisotropie des charges électrostatiques nous a permis de proposer une surface d'interaction potentielle avec le canal $K_{V4.2}$. Cette surface présente un certain nombre d'analogies avec celle d'HpTx2, dont le mode d'interaction avec le même canal est inconnu. Enfin, la comparaison avec la surface d'interaction putative de l'HaTx1 montre moins de points communs que ceux observés avec HpTx2. Ces observations semblent indiquer que PaTx1 et HpTx2 interagissent avec le canal en un site différent de celui décrit pour l'hanatoxine. Cette assertion peut être vérifiée, par exemple, en testant s'il existe une compétition de fixation entre PaTx1 et HaTx1.

Toutefois, la discussion doit encore être approfondie puisque les surfaces décrites pour PaTx1 et HpTx2 présentent les déterminants nécessaires à un blocage direct du pore, comme cela avait été envisagé dans l'article traitant de la structure de l'HpTx2.

Discussion



Conclusion

Les canaux ioniques sont exprimés de façon ubiquitaire et occupent donc une place primordiale dans les mécanismes du vivant, et leurs dysfonctionnements sont à l'origine de nombreuses pathologies. Dans l'optique d'envisager un traitement efficace de ces maladies, la compréhension des mécanismes de fonctionnement des canaux ioniques constitue un objectif majeur à atteindre. Les toxines animales, initialement étudiées pour obtenir des anti-venins efficaces, apparaissent aujourd'hui comme un outil de choix pour étudier et mieux comprendre le fonctionnement des canaux ioniques. Comme nous avons pu le constater, au travers de l'introduction bibliographique et des résultats obtenus, ces toxines s'organisent autour de deux motifs structuraux bien distincts, le motif $Cs\alpha\beta$ et le motif ICK, tout en présentant des spectres d'activité très différents. Le motif structural peut alors se décrire comme un support très stable sur lequel viennent se greffer les chaînes latérales d'acides aminés dont les propriétés physico-chimiques sont nécessaires non seulement à l'interaction avec le canal ionique considéré mais aussi importants dans les étapes de repliement de la toxine. L'observation de la diversité des toxines aux spécificités variées résulte de la combinaison de la librairie de résidus existants et de la localisation des résidus concernés au sein de la protéine. En ce qui concerne le motif $Cs\alpha\beta$, nos résultats montrent que l'on peut modifier la spécificité et/ou la sélectivité des bloqueurs naturels des canaux potassium.

Mais la majorité du travail présenté dans ce manuscrit traite des toxines architecturées autour du motif ICK. Concernant les toxines étudiées actives sur les canaux calcium, Ptu1 et Ado1, il est une observation dont nous n'avons pas parlé : la spécificité de ces toxines. En effet, si on se base sur les résultats publiés sur les oméga-conotoxines, le lecteur est enclin à penser que GVIA et MVIIA sont spécifiques des canaux calcium de type N, MVIIC de ceux de type P/Q et SVIB, par exemple, de ceux de type L. Le terme « spécifique » revient dans une très grande majorité de publications mais elle ne reflète pas l'exacte réalité puisque, par exemple, GVIA et MVIIA sont actives, à une moindre échelle, sur les canaux calcium de type P/Q. Cette spécificité est donc toute relative et devrait plutôt être citée comme un « taux de spécificité » entre les différents types de canaux (rapport [activité N-type]/[activité P/Q-type]). Il est de plus difficile de trouver quelle est la part réelle de spécificité portée par les résidus dits cruciaux (telle la tyrosine 13 de GVIA et MVIIA) puisque seuls les déterminants des toxines actives sur les canaux de type N et P/Q sont recherchés. En ce qui concerne les toxines actives sur les canaux de type L, il n'y a tout simplement pas de résultats disponibles. Cette absence d'études s'explique par l'utilisation des dérivés des dihydropyridines qui semble satisfaire les applications thérapeutiques potentielles. Pourtant, la comparaison de toutes ces toxines entre elles donne déjà lieu à une observation importante : les déterminants

décrits comme critiques pour l'interaction des conotoxines GVIA et MVIIA sont retrouvés dans toutes les toxines et ce quel que soit le type principal de canal calcium ciblé (voir **figure 67**).

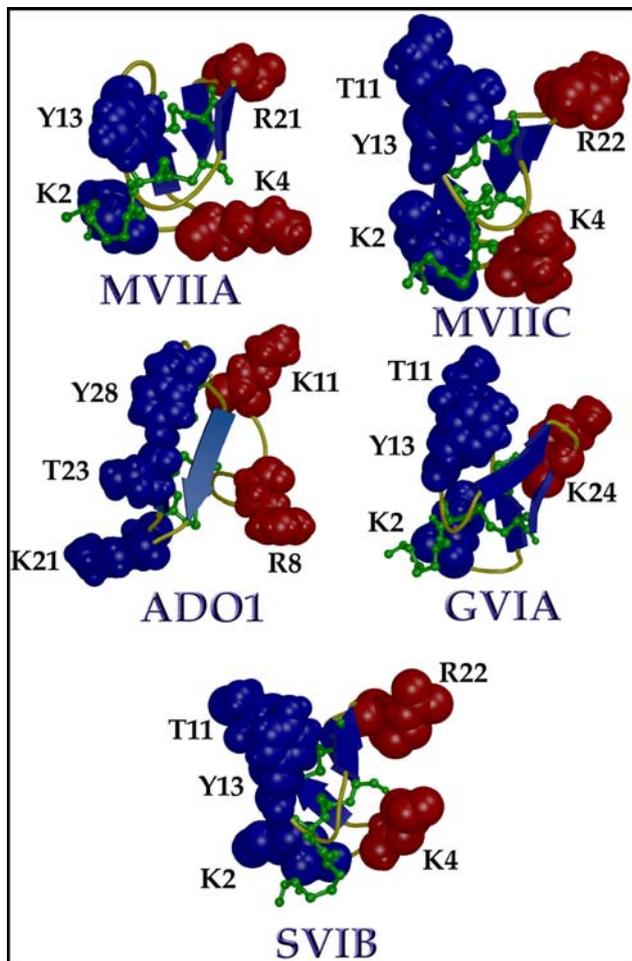


Figure 67 : Les résidus caractérisés comme cruciaux pour l'activité de GVIA et MVIIA sur les canaux Ca^{2+} de type N (Y13, crucial, et K2, grande importance) sont retrouvés dans la structure de toxines actives principalement sur d'autres types de canaux : MVIIC et potentiellement ADO1 sur les canaux de type P/Q, SVIB sur les canaux de type L. **Rouge** et **bleu** mettent en exergue deux surfaces impliquées dans l'interaction.

Ainsi, le résidu critique Y13 est constamment retrouvé (Y28 pour ADO1 qui pourrait compenser l'absence de résidus aromatiques dans la boucle 2), résidu caractérisé de façon univoque comme indispensable à l'interaction des toxines GVIA et MVIIA avec les canaux de type N. De la même manière, les résidus K2 et R21 (K24 dans GVIA), de grande importance pour l'activité de ces mêmes toxines, est lui retrouvé (K21 et K11 respectivement dans ADO1). On peut noter enfin le cas particulier de la Thr11 : dans MVIIA on trouve une leucine à cette position et il a été proposé qu'en cette position une thréonine est favorable à l'interaction avec des canaux de type P/Q et qu'une leucine est plutôt favorable à l'interaction avec les canaux de type N. La présence de cette thréonine dans GVIA (cible les canaux N-type) et dans SVIB (cible les canaux L-type) semble au contraire indiquer qu'en cette position la nature du résidu importe peu. Il apparaît donc que la notion de spécificité de ces toxines est encore très mal comprise

et il semble raisonnable de proposer que ces toxines partagent des déterminants communs. Ces résidus (Y13, K2 et R21 sur MVIIA) pourraient donc constituer le pré-requis minimum pour que la toxine interagisse avec le canal. La préférence de tel ou tel autre type de canal calcium serait induite par certains résidus clé. Toutefois, ces résidus clé n'ont pas encore été localisés à l'issue de la comparaison de MVIIA et MVIIC pourtant très homologues en séquence et faisant preuve d'une spécificité relative différente.

Par ailleurs, une molécule, à usage thérapeutique ayant été modélisée à partir de l' ω -MVIIA, est en cours de test clinique : le ziconotide. Utilisé comme analgésique, il est

encore plus efficace que la morphine sans induire les effets dramatiques d'accoutumance provoqués par la prise de ce puissant dérivé de l'opium, mais le dosage et les effets secondaires sont encore à l'étude.

Enfin, et pour clore la discussion sur les toxines actives sur les canaux calcium, nous indiquons que, délibérément, nous n'avons pas décrit une conotoxine particulière : l' ω -conotoxine-CVID. Cette toxine a été caractérisée comme étant la plus spécifique pour les canaux calcium de type N (le rapport [activité N-type]/[activité P/Q type] est le plus grand rencontré jusqu'à aujourd'hui). Sa structure a été publiée en 2000 mais ses coordonnées atomiques n'ont pas été déposées dans la *Protein Data Bank*, banque de donnée aux ressources inestimables pour les structuralistes, car cette spécificité inédite implique bien évidemment une utilisation commerciale potentielle de cette molécule. Ce pillage des connaissances communes sans rien donner en retour a motivé l'omission volontaire de cette toxine de l'introduction et de ses auteurs des références bibliographiques.

D'une manière générale, l'interaction d'une toxine avec sa cible dépend de sa carte fonctionnelle, c'est à dire des résidus portés par la surface moléculaire que la toxine met en jeu lors de l'interaction avec le canal considéré. Un autre paramètre qui a son importance a été décrit par notre groupe : l'anisotropie de répartition des charges électrostatiques. Le modèle élaboré s'applique avec succès sur les toxines actives sur les canaux potassium, et ce quel que soit le motif structural adopté (ICK ou $Cs\alpha\beta$) : l'orientation du moment dipolaire, résultante de cette anisotropie de répartition des charges électrostatiques, indique la surface moléculaire de la toxine impliquée dans l'interaction avec le canal K^+ . Il est donc tout naturel pour nous d'utiliser l'orientation de ce dipôle comme outil permettant de prédire la surface d'interaction mise en jeu par la toxine dans l'interaction avec les canaux K^+ .

Le calcul du moment dipolaire, appliqué aux toxines actives sur les canaux calcium, donne un résultat différent de celui observé avec les toxines actives sur les canaux potassium. En effet, pour ces dernières le dipôle indique la surface moléculaire de la toxine impliquée dans l'interaction avec le canal K^+ et pour les ω -conotoxines, ce dipôle pointe dans une toute autre direction. (voir **figure 68**).

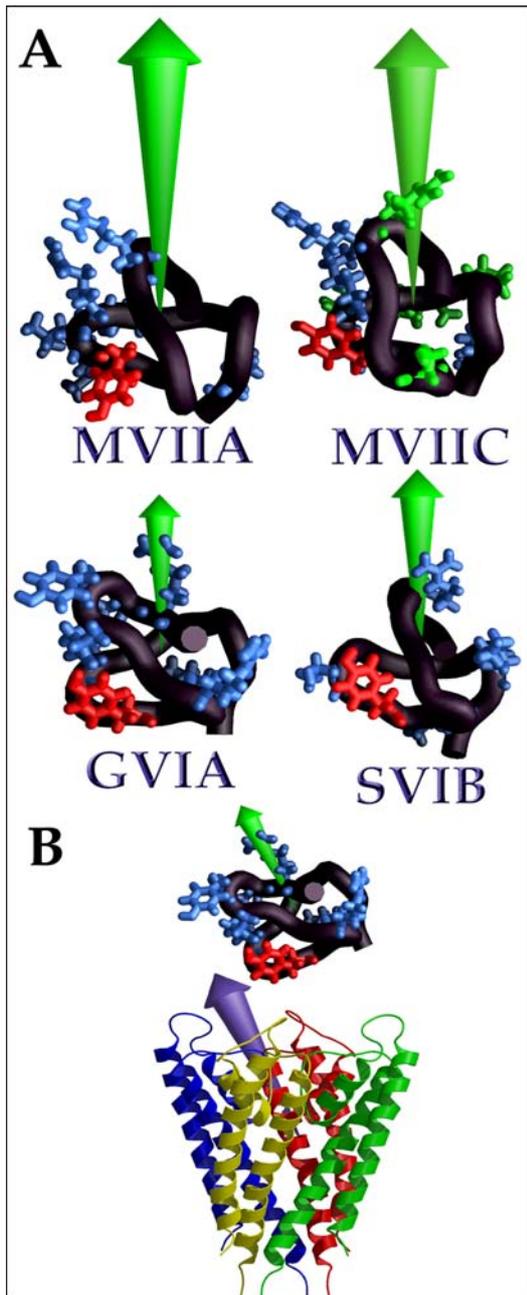


Figure 68 : (A) Représentation du moment dipolaire (flèche verte) d' ω -CTX actives sur différents types de canaux calcium : MVIIA et GVIA (N-type), MVIIC (P/Q type) et SVIB (L-type). Résidus importants pour GVIA et MVIIA : la tyrosine critique, Y13, **en rouge** et les autres résidus importants **en bleu**. Pour MVIIC, le code couleur est le suivant : **en rouge** Y13, **en bleu** les résidus communs à MVIIA et **en vert** les résidus qui diffèrent de MVIIA. Pour SVIB : résidus communs aux autres toxines : Y13 **en rouge**, les résidus périphériques **en bleu**. (B) Modèle d'interaction qui rendrait compte de l'orientation du dipôle des ω -conotoxines et de la dissymétrie électrostatique de canal Ca^{2+} .

Ce dipôle émerge pratiquement à l'opposé de la surface portant les résidus critiques, dont la tyrosine 13. Surprenant, ce calcul s'avère finalement très intéressant puisque cette même orientation est retrouvée à chaque fois que nous avons calculé le dipôle pour une ω -conotoxine ou même pour les toxines extraites de la salive des insectes assassins, ADO1 et Ptu1. Reste maintenant à essayer d'expliquer une telle anisotropie de répartition des charges électrostatiques. Aucune structure de canal calcium n'est à ce jour disponible et nous ne pouvons donc qu'émettre des hypothèses. L'idée la plus satisfaisante consiste à considérer que l'orientation du moment dipolaire du canal est de sens opposé à celui du canal potassium, c'est à dire que ce dipôle émergerait du côté extracellulaire du canal et non pas cytoplasmique comme c'est le cas pour le canal potassium. De plus, si on regarde l'angle formé par le couple (Y13 ; dipôle) dans les toxines, on peut l'estimer à environ 120° . Cet angle observé est compatible avec les différences constatées entre les canaux calcium et potassium : le canal potassium est un homotétramère, son dipôle ne peut donc être que colinéaire au pore de conduction des ions, alors que la sous-unité α du canal calcium est composée de 4 sous-unités homologues en séquence mais pas identiques. On peut sans peine extrapoler cette différence de séquence en un dipôle qui ne sera pas colinéaire au pore de conduction des ions (voir **figure 68**). Ceci nous permet de proposer un modèle d'interaction entre toxines et canal calcium régit par les mêmes lois que dans le cas toxine/canal potassium, à savoir, orientation du dipôle de la toxine colinéaire à

celui du canal. Ce modèle est renforcé par la comparaison de la séquence des 4 domaines qui constituent la sous-unité α du canal calcium, dans l'exemple suivant : le canal calcium de type P/Q du cerveau humain (voir **figure 69**).

DomI	--NVVRKYAKKITEWPPPEYMI LATI IANCI VLALEQHLPDDDKTPMSERLDDTEPYFIG
DomII	-ERRMRFYIRRMVKTQAFYWTVLSLVALNTLCVAIVHYNQPE---WLSDFLYYAEFIFLG
DomIII	--NPLRRLCHYILNLRYPFEMCILMVIAMSSIALAAEDPVQPN--APRNNVLRYPDYVFTG
DomIV	NKQSFQYRMWQFVVSPPFEYTIMAMIALNTIVLMMKFY GASV---AYENALRVFNIVFTS
	*** ** *
DomI	IFCFEAGIKI IALG--FAFHKGSYL RNGWNVMDFV VVLTGILATVGT EFD-----LRT
DomII	LFMSEMIKMYGLGTRPYFHSSFCDFCGVIIGSIFEVIWAVIKPGTSFG-----ISV
DomIII	VFTFEMVIK MIDLG--LVLHQGAYFRDLWNILDFIVVSGALVAFATGNSKGDINTIKS
DomIV	LFSLECVLKVMAFG-----ILNYFRDAWNIFDFVTVLGSITDILVTEFG--NNFINLSF
	* *
DomI	LRAVRVLRPLKLVSGIPSLQVVLKSIMKAMIPLLQIGLLFFAILIFAIIGLEFYMGKFKH
DomII	LRALRLLRIFKVTKYWASLRNLLVVSLLNSMKSIISLLFLLFLFIVVFALLGMQLFGGQFN
DomIII	LRVLRVLRPLKTIKRLPKLKA VFD CVVNSLKNVFNILIVYMLFMFIFAVVAVQLFKGKFF
DomIV	LRLFRAARLIKLLRQGYTIRILLWTFVQSFKALPYVCLLIAMLFFIYAIIGMQVFGNIGI
	* *
DomI	TTCFEEGTDDIQGES PAPCGTEEPARTCPNGTKCQPYWEGPNNGITQFDNILFAVLTVFQ
DomII	---FDEGTPPTN-----FDTFFPAAIMTVFQ
DomIII	HCTDESKEFEKDCRG-----KYLLEYEKNEVKARDREWKKYEFHYDNVLWALLTLFT
DomIV	DVEDEDSDEDEFQITEHN-----NFRTEFFQALMLLFR
	* *
DomI	CITM E GWTDLLYNSNDASGNTWN-----WLYFIPLIIIGSFFMLNLV LGVLS
DomII	ILTG E DWNEVMDGIKSQGGVQGG-----MVFSIYFIVLTLFGNYTLLNVFLAIAV
DomIII	VSTG E GWVQVLKHSVDATFENQGPSPGY----RMEMSIYVYVVFVFPFFVFNIFVALII
DomIV	SATG E AWHNIMLSCLSGKPCDKNSGILTRECNEFAYFYVVSFIFLCSFLMLNLFVAVIM
	* *
DomI	GEF
DomII	DNL
DomIII	ITF
DomIV	DNF
	*

Figure 69 : comparaison de la séquence des 4 domaines de la sous-unité $\alpha 1A$ du canal calcium de type P/Q du cerveau humain. L'anneau de glutamates est représenté par **E**. Les astérisques (*) indiquent la **non conservation** des résidus chargés et font apparaître clairement la dissymétrie électrostatique du canal Ca^{2+} .

Bien entendu, cette hypothèse ne se base sur aucune donnée expérimentale mais l'interaction entre deux molécules doit bien dépendre de facteurs d'orientation. Ces interactions ne peuvent dépendre du hasard d'une rencontre entre une protéine et son récepteur. Ceci renforce l'importance relative qu'occupe l'anisotropie des charges électrostatiques qui agissent comme un élément d'orientation du ligand vis-à-vis de son récepteur (et non pas comme une force d'attraction). Enfin, pour appuyer nos propos et pour élargir le champs d'application du calcul du moment dipolaire, on peut citer un autre exemple où l'anisotropie de répartition des charges semble être importante pour la reconnaissance de deux molécules : l'acétylcholine estérase et son inhibiteur, la

fasciculine (voir **figure 70**). L'acétylcholine estérase est une hydrolase dont la fonction est entre autre l'hydrolyse rapide du neuromédiateur acétylcholine lors de la transmission de l'influx nerveux au niveau des synapses cholinergiques. Son inhibiteur, la fasciculine, interagit au niveau du site d'entrée du substrat. Le calcul du dipôle des 2 partenaires montre là encore une reconnaissance gouvernée en partie par l'anisotropie de répartition des charges électrostatiques.

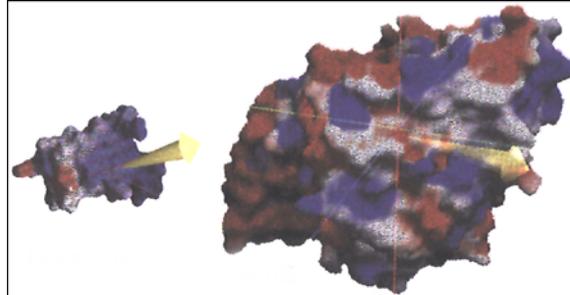
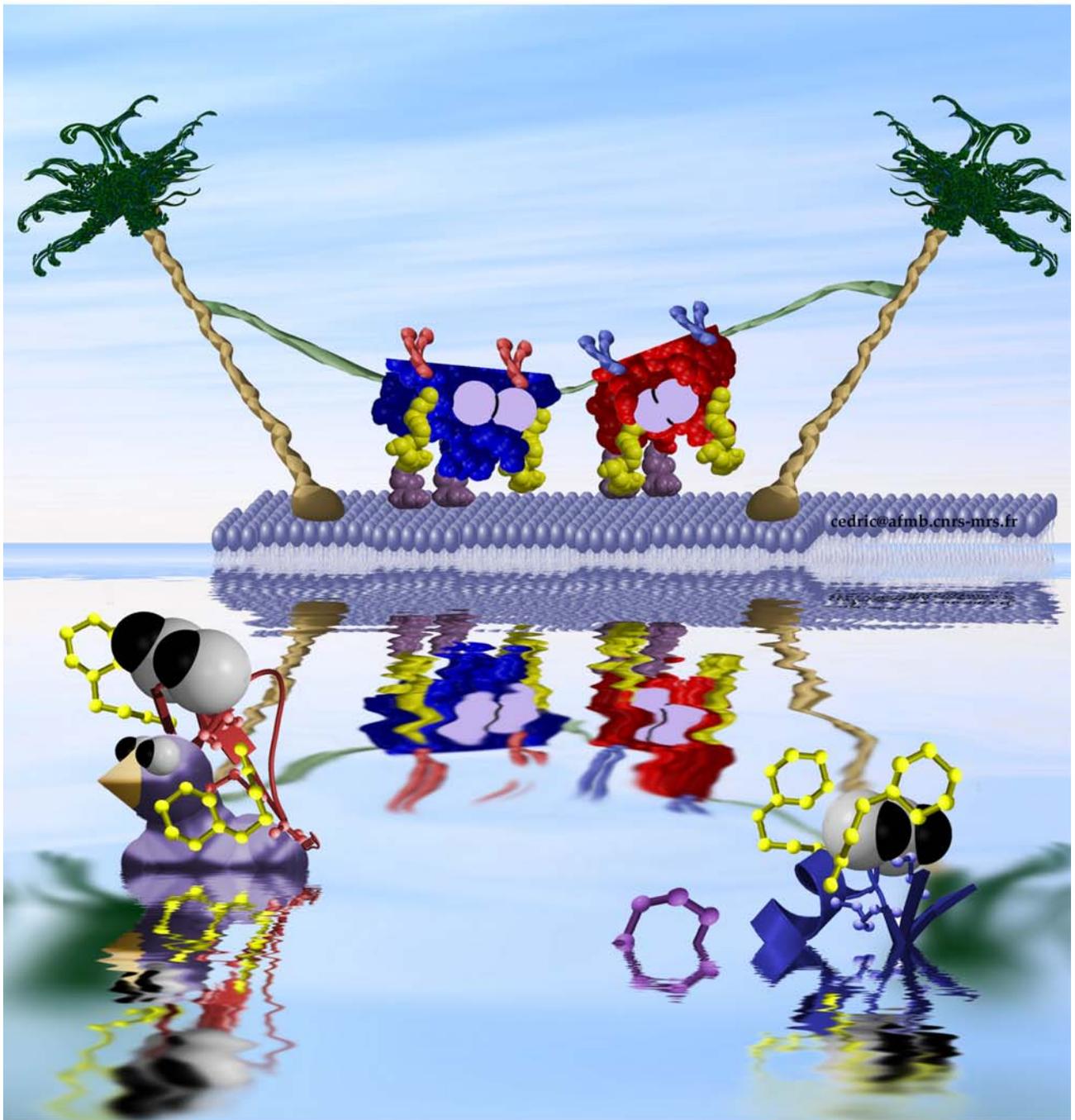


Figure 70 : représentation de la surface moléculaire de la fasciculine (à gauche) et de l'acétylcholine estérase (à droite). Le dipôle est représenté par une **flèche jaune**. La surface moléculaire est colorée suivant les propriétés électrostatiques : **bleu** pour les résidus chargés positivement, **rouge** pour les résidus chargés négativement et **blanc** pour les résidus non chargés (figure d'après P. Marchot, communication personnelle).

Références



Bibliographiques

- Adams, M.E., estérase, V.P., estérase, L. and Venema, V.J.** (1990). Omega-agatoxins: novel calcium channel antagonists of two subtypes from funnel web spider (*Agelenopsis aperta*) venom. *J Biol Chem* **265**: 861-7.
- Adams, M.E., Herold, E.E. and Venema, V.J.** (1989). Two classes of channel-specific toxins from funnel web spider venom. *J Comp Physiol [A]* **164**: 333-42.
- Adams, M.E., Mintz, I.M., Reily, M.D., Thanabal, V. and Bean, B.P.** (1993). Structure and properties of omega-agatoxin IVB, a new antagonist of P-type calcium channels. *Mol Pharmacol* **44**: 681-8.
- Ahlijanian, M.K., Westenbroek, R.E. and Catterall, W.A.** (1990). Subunit structure and localization of dihydropyridine-sensitive calcium channels in mammalian brain, spinal cord, and retina. *Neuron* **4**: 819-32.
- Aiyar, J., Rizzi, J.P., Gutman, G.A. and Chandy, K.G.** (1996). The signature sequence of voltage-gated potassium channels projects into the external vestibule. *J Biol Chem* **271**: 31013-6.
- Aiyar, J., Withka, J.M., Rizzi, J.P., Singleton, D.H., Andrews, G.C., Lin, W., Boyd, J., Hanson, D.C., Simon, M., Dethlefs, B. and et al.** (1995). Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. *Neuron* **15**: 1169-81.
- Almassy, R.J., Fontecilla-Camps, J.C., Suddath, F.L. and Bugg, C.E.** (1983). Structure of variant-3 scorpion neurotoxin from *Centruroides sculpturatus* Ewing, refined at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* **170**: 497-527.
- Almers, W. and McCleskey, E.W.** (1984). Nonselective conductance in calcium channels of frog muscle : calcium selectivity in a single file-pore. *J Physiol* **353**: 585-608.
- Armstrong, C.M.** (1998). The vision of the pore. *Science* **280**: 56-7.
- Ashcroft, F.M., Ashcroft, S.J. and Harrison, D.E.** (1988). properties of single potassium channels modulated by glucose in rat pancreatic beta-cells. *J Physiol* **400**: 501-27.
- 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**: 648-54.
- Basus, V.J., Nadasdi, L., Ramachandran, J. and Miljanich, G.P.** (1995). Solution structure of omega-conotoxin MVIIA using 2D NMR spectroscopy. *FEBS Lett* **370**: 163-9.
- Bean, B.P.** (1989). Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol* **51**: 367-84.
- Bednarek, M.A., Bugianesi, R.M., Leonard, R.J. and Felix, J.P.** (1994). Chemical synthesis and structure-function studies of margatoxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channel in human T lymphocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **198**: 619-25.
- Beneski, D.A. and Catterall, W.A.** (1980). Covalent labeling of proteins components of sodium channel with a photoactivable derivative of scorpion toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 639-43.
- Benkhalifa, R., Stankiewicz, M., Lapied, B., Turkov, M., Zilberberg, N., Gurevitz, M. and Pelhate, M.** (1997). Refined electrophysiological analysis suggests that a depressant toxin is a sodium channel opener rather than a blocker. *Life Sci* **61**: 819-30.
- Bernatchez, G., Berrou, L., Benakezouh, Z., Ducay, J. and Parent, L.** (2001). Role of Repeat I in the fast inactivation kinetics of the Ca(V)2.3 channel. *Biochim Biophys Acta* **1514**: 217-29.
- Blanc, E., Fremont, V., Sizun, P., Meunier, S., Van Rietschoten, J., Thevand, A., Bernassau, J.M. and Darbon, H.** (1996). Solution structure of P01, a natural scorpion peptide structurally analogous to scorpion toxins specific for apamin-sensitive potassium channel. *Proteins* **24**: 359-69.
- Blatz, A.L. and Magleby, K.L.** (1984). Ion conductance and selectivity of single calcium-activated potassium channels in cultured rat muscle. *J Gen Physiol* **84**: 1-23.
- Bontems, F., Roumestand, C., Gilquin, B., Menez, A. and Toma, F.** (1991). Refined structure of charybdotoxin: common motifs in scorpion toxins and insect defensins. *Science* **254**: 1521-3.
- Bottiglieri, C., Ferrara, L., Corona, M., Gurrola, G.B., Batista, C., Wanke, E. and Possani, L.D.** (2000). Disulfide bridges of ergotoxin, a member of a new sub-family of peptide blockers of the ether-a-go-go-related K⁺ channel. *FEBS Lett* **479**: 156-7.
- Bougis, P.E., Rochat, H. and Smith, L.A.** (1989). Precursors of *Androctonus australis* scorpion neurotoxins. Structures of precursors, processing outcomes, and expression of a functional recombinant toxin II. *J Biol Chem* **264**: 19259-65.
- Bulaj, G., DeLaCruz, R., Azimi-Zonooz, A., West, P., Watkins, M., Yoshikami, D. and Olivera, B.M.** (2001). Delta-conotoxin structure/function through a cladistic analysis. *Biochemistry* **40**: 13201-8.
- Butler, A., Wei, A.G., Baker, K. and Salkoff, L.** (1989). A family of putative potassium channel genes in *Drosophila*. *Science* **243**: 943-7.
- Cahalan, M.D.** (1975). Modification of sodium channel gating in frog myelinated nerve fibres by *Centruroides sculpturatus* scorpion venom. *J Physiol* **244**: 511-34.
- Calabro, V., Sabatier, J.M., Blanc, E., Lecomte, C., Van Rietschoten, V. and Darbon, H.** (1997). Differential involvement of disulfide bridges on the folding of a scorpion toxin. *J Pept Res* **50**: 39-47.
- Capiod, T. and Odgen, D.C.** (1989). The properties of calcium-activated potassium ion channels in guinea pig isolated hepatocytes. *J Physiol* **409**: 285-95.

- Carbone, E. and Lux, H.D.** (1984). A low voltage-activated fully inactivating Ca channel in vertebrate sensory neurones. *Nature* **310**: 501-2.
- 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**: 90-1.
- Castle, N.A. and Strong, P.N.** (1986). Identification of two toxins from scorpion (*Leiurus quinquestriatus*) venom which block distinct classes of calcium-activated potassium channel. *FEBS Lett* **209**: 117-21.
- Catterall, W.A.** (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* **64**: 493-531.
- Catterall, W.A.** (1995). Structure and function of voltage-gated ion channels. *Annu Rev Biochem* **64**: 493-531.
- Catterall, W.A.** (1996). Molecular properties of sodium and calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* **28**: 219-30.
- Catterall, W.A.** (2000a). From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **26**: 13-25.
- Catterall, W.A.** (2000b). Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 521-55.
- Cestele, S. and Catterall, W.A.** (2000). Molecular mechanisms of neurotoxin action on voltage-gated sodium channels. *Biochimie* **82**: 883-92.
- Cestele, S., Gordon, D., Kopeyan, C. and Rochat, H.** (1997). Toxin III from *Leiurus quinquestriatus*: a specific probe for receptor site 3 on insect sodium channels. *Insect Biochem Mol Biol* **27**: 523-8.
- Cestele, S., Qu, Y., Rogers, J.C., Rochat, H., Scheuer, T. and Catterall, W.A.** (1998). Voltage sensor-trapping: enhanced activation of sodium channels by beta-scorpion toxin bound to the S3-S4 loop in domain II. *Neuron* **21**: 919-31.
- Cestele, S., Stankiewicz, M., Mansuelle, P., De Waard, M., Dargent, B., Gilles, N., Pelhate, M., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.F. and Gordon, D.** (1999). Scorpion alpha-like toxins, toxic to both mammals and insects, differentially interact with receptor site 3 on voltage-gated sodium channels in mammals and insects. *Eur J Neurosci* **11**: 975-85.
- Chandy, K.G. and Gutman, G.A.** (1993). Nomenclature for mammalian potassium channel genes. *Trends Pharmacol Sci* **14**: 434.
- Chang, F.C. and Hosey, M.M.** (1988). Dihydropyridine and phenylalkylamine receptors associated with cardiac and skeletal muscle calcium channels are structurally different. *J Biol Chem* **263**: 18929-37.
- Chang, N.S., French, R.J., Lipkind, G.M., Fozzard, H.A. and Dudley, S., Jr.** (1998). Predominant interactions between mu-conotoxin Arg-13 and the skeletal muscle Na⁺ channel localized by mutant cycle analysis. *Biochemistry* **37**: 4407-19.
- Chen, C.C., England, S., Akopian, A.N. and Wood, J.N.** (1998). A sensory neuron-specific, proton-gated ion channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10240-5.
- Chicchi, G.G., Gimenez-Gallego, G., Ber, E., Garcia, M.L., Winkquist, R.J. and Cascieri, M.A.** (1988). Purification and characterization of a unique, potent inhibitor of apamin binding from *Leiurus quinquestriatus hebraeus* venom. *J Biol Chem* **263**: 10192-7.
- Chiche, L., Gaboriaud, C., Heitz, A., Mornon, J.P., Castro, B. and Kollman, P.A.** (1989). Use of restrained molecular dynamics in water to determine three-dimensional protein structure: prediction of the three-dimensional structure of *Echallium elaterium* trypsin inhibitor II. *Proteins* **6**: 405-17.
- Colledge, C.J., Hunsperger, J.P., Imperial, J.S. and Hillyard, D.R.** (1992). Precursor structure of omega-conotoxin GVIA determined from a cDNA clone. *Toxicon* **30**: 1111-6.
- Connor, J.A. and Stevens, C.F.** (1971). Voltage clamp studies of a transient outward membrane current in gastropod neural somata. *J Physiol* **213**: 21-30.
- Cook, W.J., Zell, A., Watt, D.D. and Ealick, S.E.** (2002). Structure of variant 2 scorpion toxin from *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Protein Sci* **11**: 479-86.
- Cormier, J.W., Rivolta, I., Tateyama, M., Yang, A.S. and Kass, R.S.** (2002). Secondary structure of the human cardiac Na⁺ channel C terminus: evidence for a role of helical structures in modulation of channel inactivation. *J Biol Chem* **277**: 9233-41.
- Covarrubias, M., Wei, A. and Salkoff, L.** (1991). Shaker, Shal, Shab and Shaw express independent K⁺ current systems. *Neuron* **7**: 763-73.
- Craik, D.J.** (2001). Plant cyclotides: circular, knotted peptide toxins. *Toxicon* **39**: 1809-13.
- Craik, D.J., Daly, N.L., Bond, T. and Waime, C.** (1999). Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *J Mol Biol* **294**: 1327-36.
- Craik, D.J., Daly, N.L. and Waime, C.** (2001). The cystine knot motif in toxins and implications for drug design. *Toxicon* **39**: 43-60.
- 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 Ca(2+)-activated K⁺ channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J Biol Chem* **267**: 1640-7.
- Cuello, L.G., Romero, J.G., Cortes, D.M. and Perozo, E.** (1998). pH-dependent gating in the *Streptomyces lividans* K⁺ channel. *Biochemistry* **37**: 3229-36.
- Curtis, B.M. and Catterall, W.A.** (1984). Purification of the calcium antagonist receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubule. *Biochemistry* **23**: 2113-8.

- Daly, N.L. and Craik, D.J.** (2000). Acyclic permutants of naturally occurring cyclic proteins. Characterization of cystine knot and beta-sheet formation in the macrocyclic polypeptide kalata B1. *J Biol Chem* **275**: 19068-75.
- Darbon, H. and Angelides, K.J.** (1984). Structural mapping of the voltage-dependent sodium channel. Distance between the tetrodotoxin and Centruroides suffusus suffusus II beta-scorpion toxin receptors. *J Biol Chem* **259**: 6074-84
- Darbon, H., Blanc, E. and Sabatier, J.M.** (1999). Three-dimensional structure of scorpion toxins : towards a new model of interaction with potassium channels. *Animal toxins and potassium channels*. J. M. Sabatier. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. **15**: 41-60.
- Darbon, H., Jover, E., Couraud, F. and Rochat, H.** (1983). Alpha-scorpion neurotoxin derivatives suitable as potential markers of sodium channels. Preparation and characterization. *Int J Pept Protein Res* **22**: 179-86.
- Darbon, H., Weber, C. and Braun, W.** (1991). Two-dimensional ¹H nuclear magnetic resonance study of AaH IT, an anti-insect toxin from the scorpion *Androctonus australis* Hector. Sequential resonance assignments and folding of the polypeptide chain. *Biochemistry* **30**: 1836-45.
- Darbon, H., Zlotkin, E., Kopeyan, C., van Rietschoten, J. and Rochat, H.** (1982). Covalent structure of the insect toxin of the North African scorpion *Androctonus australis* Hector. *Int J Pept Protein Res* **20**: 320-30.
- Davis, J.H., Bradley, E.K., Miljanich, G.P., Nadasdi, L., Ramachandran, J. and Basus, V.J.** (1993). Solution structure of omega-conotoxin GVIA using 2-D NMR spectroscopy and relaxation matrix analysis. *Biochemistry* **32**: 7396-405.
- De Jongh, K.S., Warner, C., Colvin, A.A. and Catterall, W.A.** (1991). Characterization of the two size of the α 1 subunit of skeletal muscle L-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 10778-82.
- DeCoursey, T.E., Chandy, K.G., Gupta, S. and Cahalan, M.D.** (1987). Mitogen induction of ion channels in murine T lymphocytes. *J Gen Physiol* **89**: 405-20.
- Denac, H., Mevissen, M. and Scholtysik, G.** (2000). Structure, function and pharmacology of voltage-gated sodium channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **362**: 453-79.
- Devaux, C., Knibiehler, M., Defendini, M.L., Mabrouk, K., Rochat, H. and Van Rietschoten, J.** (1995). Recombinant and derivatives of apamin. Implication of post-transcriptional C-terminal amidation of apamin in biological activity. *Eur J Biochem* **231**: 544-50.
- 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 Itol1 in cardiac electrogenesis. *Br J Pharmacol* **126**: 251-63.
- Douppnik, C.A., Davidson, N. and Lester, H.A.** (1995). The inward rectifier potassium channel family. *Curr Opin Neurobiol* **5**: 268-77.
- 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.
- Drakopoulou, E., Vizzavona, J., Neyton, J., Anior, V., Bouet, F., Virelizier, H., Menez, A. and Vita, C.** (1998). Consequence of the removal of evolutionary conserved disulfide bridges on the structure and function of charybdotoxin and evidence that particular cysteine spacings govern specific disulfide bond formation. *Biochemistry* **37**: 1292-301.
- Droogmans, G. and Nilius, B.** (1989). Kinetic properties of the cardiac T-type calcium channel in the guinea-pig. *J Physiol* **419**: 627-50.
- Dudley, S.C., Jr., Chang, N., Hall, J., Lipkind, G., Fozzard, H.A. and French, R.J.** (2000). mu-conotoxin GIIIA interactions with the voltage-gated Na(+) channel predict a clockwise arrangement of the domains. *J Gen Physiol* **116**: 679-90.
- Dudley, S.C., Jr., Todt, H., Lipkind, G. and Fozzard, H.A.** (1995). A mu-conotoxin-insensitive Na⁺ channel mutant: possible localization of a binding site at the outer vestibule. *Biophys J* **69**: 1657-65.
- Dufton, M.J. and Rochat, H.** (1984). Classification of scorpion toxins according to amino acid composition and sequence. *J Mol Evol* **20**: 120-7.
- Eitan, M., Fowler, E., Herrmann, R., Duval, A., Pelhate, M. and Zlotkin, E.** (1990). A scorpion venom neurotoxin paralytic to insects that affects sodium current inactivation: purification, primary structure, and mode of action. *Biochemistry* **29**: 5941-7.
- el Ayeb, M., Darbon, H., Bahraoui, E.M., Vargas, O. and Rochat, H.** (1986). Differential effects of defined chemical modifications on antigenic and pharmacological activities of scorpion alpha and beta toxins. *Eur J Biochem* **155**: 289-94.
- Ellinor, P.T., Yang, J., Sather, W.A., Zhang, J.F. and Tsien, R.W.** (1995). Ca²⁺ selectivity at a single locus for high affinity Ca²⁺ interactions. *Neuron* **15**: 1121-32.
- Ellinor, P.T., Zhang, J.F., Horne, W.A. and Tsien, R.W.** (1994). Structural determinants of the blockade of N-type calcium channels by a peptide neurotoxin. *Nature* **372**: 272-5.
- Ellis, S.B., Williams, M.E., Ways, N.R., Brenner, C. and Sharp, A.H.** (1988). Sequence and expression of mRNAs encoding the α 1 and α 2 subunits of a DHP-sensitive calcium channel. *Science* **241**: 1661-4.
- Ertel, E.A., Campbell, K.P., Harpold, M.M., Hofmann, F., Mori, Y., Perez-Reyes, E., Schwartz, A., Snutch, T.P., Tanabe, T., Birnbaumer, L., Tsien, R.W. and Catterall, W.A.** (2000). Nomenclature of voltage-gated calcium channels. *Neuron* **25**: 533-5.
- Ertel, E.A., Warren, V.A., Adams, M.E., Griffin, P.R., Cohen, C.J. and Smith, M.M.** (1994). Type III omega-agatoxins: a family of probes for similar binding sites on L- and N-type calcium channels. *Biochemistry* **33**: 5098-108.

- Escoubas, P., De Welle, J.R., Lecoq, A., Diochot, S., Waldmann, R., Champigny, G., Moinier, D., Menez, A. and Lazdunski, M. (2000). Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na⁺ channels. *J Biol Chem* **275**: 25116-21.
- Fainzilber, M., Gordon, D., Hasson, A., Spira, M. and Zlotkin, E. (1991). Mollusc-specific toxins from the venom of *Conus textile neovicarius*. *Eur J Biochem* **202**: 589-95.
- Fainzilber, M., Kofman, O., Zlotkin, E. and Gordon, D. (1994). A new neurotoxin receptor site on sodium channels is identified by a conotoxin that affects sodium channel inactivation in molluscs and acts as an antagonist in rat brain. *J Biol Chem* **269**: 2574-80.
- Fainzilber, M., Lodder, J.C., Kits, K.S., Kofman, O., Vinnitsky, I., Van Rietschoten, J., Zlotkin, E. and Gordon, D. (1995a). A new conotoxin affecting sodium current inactivation interacts with the delta-conotoxin receptor site. *J Biol Chem* **270**: 1123-9.
- Fainzilber, M., van der Schors, R., Lodder, J.C., Li, K.W., Geraerts, W.P. and Kits, K.S. (1995b). New sodium channel-blocking conotoxins also affect calcium currents in *Lymnaea* neurons. *Biochemistry* **34**: 5364-71.
- Fajloun, Z., Ferrat, G., Carlier, E., Fathallah, M., Lecomte, C., Sandoz, G., di Luccio, E., Mabrouk, K., Legros, C., Darbon, H., Rochat, H., Sabatier, J.M. and De Waard, M. (2000a). Synthesis, 1H NMR structure, and activity of a three-disulfide-bridged maurotoxin analog designed to restore the consensus motif of scorpion toxins. *J Biol Chem* **275**: 13605-12.
- Fajloun, Z., Kharrat, R., Chen, L., Lecomte, C., Di Luccio, E., Bichet, D., El Ayeb, M., Rochat, H., Allen, P.D., Pessah, I.N., De Waard, M. and Sabatier, J.M. (2000b). Chemical synthesis and characterization of maurocalcine, a scorpion toxin that activates Ca²⁺ release channel/ryanodine receptors. *FEBS Lett* **469**: 179-85.
- 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. (2000c). Maurotoxin versus P1/HsTx1 scorpion toxins. Toward new insights in the understanding of their distinct disulfide bridge patterns. *J Biol Chem* **275**: 39394-402.
- Fanger, C.M., Ghanshani, S., Logsdon, N.J., Rauer, H., Kalman, K., Zhou, J., Beckingham, K., Chandy, K.G., Cahalan, M.D. and Aiyar, J. (1999). Calmodulin mediates calcium-dependent activation of the intermediate conductance KCA channel, IKCa1. *J Biol Chem* **274**: 5746-54.
- Farr-Jones, S., Miljanich, G.P., Nadasdi, L., Ramachandran, J. and Basus, V.J. (1995). Solution structure of omega-conotoxin MVIIc, a high affinity ligand of P-type calcium channels, using 1H NMR spectroscopy and complete relaxation matrix analysis. *J Mol Biol* **248**: 106-24.
- Fernandez, I., Romi, R., Szendeffy, S., Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H., Van Rietschoten, J., Pons, M. and Giralt, E. (1994). Kaliotoxin (1-37) shows structural differences with related potassium channel blockers. *Biochemistry* **33**: 14256-63.
- Fletcher, J.I., Chapman, B.E., Mackay, J.P., Howden, M.E. and King, G.F. (1997a). The structure of versutoxin (delta-atracotoxin-Hv1) provides insights into the binding of site 3 neurotoxins to the voltage-gated sodium channel. *Structure* **5**: 1525-35.
- Fletcher, J.I., Smith, R., O'Donoghue, S.I., Nilges, M., Connor, M., Howden, M.E., Christie, M.J. and King, G.F. (1997b). The structure of a novel insecticidal neurotoxin, omega-atracotoxin-HV1, from the venom of an Australian funnel web spider. *Nat Struct Biol* **4**: 559-66.
- Flinn, J.P., Pallaghy, P.K., Lew, M.J., Murphy, R., Angus, J.A. and Norton, R.S. (1999a). Role of disulfide bridges in the folding, structure and biological activity of omega-conotoxin GVIA. *Biochim Biophys Acta* **1434**: 177-90.
- Flinn, J.P., Pallaghy, P.K., Lew, M.J., Murphy, R., Angus, J.A. and Norton, R.S. (1999b). Roles of key functional groups in omega-conotoxin GVIA synthesis, structure and functional assay of selected peptide analogues. *Eur J Biochem* **262**: 447-55.
- Fontecilla-Camps, J.C., Almasy, R.J., Ealick, S.E., Suddath, F.L., Watt, D.D., Feldmann, R.J. and Bugg, C.E. (1981). Architecture of scorpion neurotoxins: a class of membrane binding proteins. *Trends Biochem Sci* **6**: 291-6.
- Fontecilla-Camps, J.C., Almasy, R.J., Suddath, F.L., Watt, D.D. and Bugg, C.E. (1980). Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**: 6496-500.
- Fontecilla-Camps, J.C., Habersetzer-Rochat, C. and Rochat, H. (1988). Orthorhombic crystals and three-dimensional structure of the potent toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 7443-7.
- Fox, A.P., Nowycky, M. and Tsien, R.W. (1987). Single channel recordings of three types of calcium channels in chick sensory neurones. *J Physiol* **394**: 173-200.
- Fremont, V., Blanc, E., Crest, M., Martin-Eau Claire, M.F., Gola, M., Darbon, H. and Van Rietschoten, J. (1997). Dipole moments of scorpion toxins direct the interaction towards small- or large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Lett Pep Sci* **4**: 1-9.
- Froy, O., Zilberberg, N., Gordon, D., Turkov, M., Gilles, N., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Lorete, E., Oren, D.A., Shaanan, B. and Gurevitz, M. (1999). The putative bioactive surface of insect-selective scorpion excitatory neurotoxins. *J Biol Chem* **274**: 5769-76.
- Gallagher, M.J. and Blumenthal, K.M. (1994). Importance of the unique cationic residues arginine 12 and lysine 49 in the activity of the cardiotoxic polypeptide anthopleurin B. *J Biol Chem* **269**: 254-9.
- 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**: 11083-90.

- 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**: 18866-74.
- Geib, S., Sandoz, G., Cornet, V., Mabrouk, K., Fund-Saunier, O., Bichet, D., Villaz, M., Hoshi, H., Sabatier, J.M. and De Waard, M.** (2002). The interaction between the I-II loop and the III-IV loop of $Ca_v2.1$ contributes to voltage-dependent inactivation in a β -dependent manner. *J Biol Chem* **277**: 10003-13.
- Giangiaco, K.M., Sugg, E.E., Garcia-Calvo, M., Leonard, R.J., McManus, O.B., Kaczorowski, G.J. and Garcia, M.L.** (1993). Synthetic charybdotoxin-iberiotoxin chimeric peptides define toxin binding sites on calcium-activated and voltage-dependent potassium channels. *Biochemistry* **32**: 2363-70.
- Gilles, N., Harrison, G., Karbat, I., Gurevitz, M., Nicholson, G.M. and Gordon, D.** (2002). Variations in receptor site-3 on rat brain and insect sodium channels highlighted by binding of a funnel-web spider delta-atracotoxin. *Eur J Biochem* **269**: 1500-10.
- Gimenez-Gallego, G., Navia, M.A., Reuben, J.P., Katz, G.M., Kaczorowski, G.J. and Garcia, M.L.** (1988). Purification, sequence, and model structure of charybdotoxin, a potent selective inhibitor of calcium-activated potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 3329-33.
- Goldin, A.L.** (2001). Resurgence of sodium channel research. *Annu Rev Physiol* **63**: 871-94.
- Goldin, A.L.** (2002). Evolution of voltage-gated Na^+ channels. *J Exp Biol* **205**: 575-84.
- Goldin, A.L., Barchi, R.L., Caldwell, J.H., Hofmann, F., Howe, J.R., Hunter, J.C., Kallen, R.G., Mandel, G., Meisler, M.H., Netter, Y.B., Noda, M., Tamkun, M.M., Waxman, S.G., Wood, J.N. and Catterall, W.A.** (2000). Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron* **28**: 365-8.
- Goldstein, S.A. and Miller, C.** (1993). Mechanism of charybdotoxin block of a voltage-gated K^+ channel. *Biophys J* **65**: 1613-9.
- 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**: 1377-88.
- Gonzalez, C., Rosenman, E., Bezanilla, F., Alvarez, O. and Latorre, R.** (2000). Modulation of the Shaker K^+ channel gating kinetics by the S3-S4 linker. *J Gen Physiol* **115**: 193-208.
- Gordon, D., Jover, E., Couraud, F. and Zlotkin, E.** (1984). The binding of the insect selective neurotoxin (AaIT) from scorpion venom to locust synaptosomal membranes. *Biochimica Biophysica Acta* **778**: 349-58.
- Gordon, D., Martin-Eauclaire, M.F., Cestele, S., Kopeyan, C., Carlier, E., Khalifa, R.B., Pelhate, M. and Rochat, H.** (1996). Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J Biol Chem* **271**: 8034-45.
- Gordon, D., Moskowicz, H., Eitan, M., Warner, C., Catterall, W.A. and Zlotkin, E.** (1992). Localization of receptor sites for insect-selective toxins on sodium channels by site-directed antibodies. *Biochemistry* **31**: 7622-8.
- Gordon, D., Savarin, P., Gurevitz, M. and Zinn-Justin, S.** (1998). Functional anatomy of scorpion toxins affecting sodium channels. *J. Toxicol. Toxin Rev.* **17**: 131-59.
- Goyffon, M., Vachon, M. and Broglio, N.** (1982). Epidemiology and clinical characteristics of scorpion envenomation in Tunisia. *Toxicon* **24**: 337-44.
- 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). Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K^+ channels, types $Kv1.1$, 1.2 , 1.3 , 1.5 , and 3.1 , stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* **45**: 1227-34.
- Gurevitz, M., Froy, O., Zilberberg, N., Turkov, M., Strugatsky, D., Gershburg, E., Lee, D., Adams, M.E., Tugarinov, V., Anglister, J., Shaanan, B., Loret, E., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Gordon, D. and Chejanovsky, N.** (1998). Sodium channel modifiers from scorpion venom: structure-activity relationship, mode of action and application. *Toxicon* **36**: 1671-82.
- Gurevitz, M., Gordon, D., Ben-Natan, S., Turkov, M. and Froy, O.** (2001). Diversification of neurotoxins by C-tail 'wiggling': a scorpion recipe for survival. *Faseb J* **15**: 1201-5.
- Gurnett, C.A., De Waard, M. and Campbell, K.P.** (1996). Dual function of the voltage-dependent Ca^{2+} channel $\alpha2\delta$ subunit in current stimulation and subunit interaction. *Neuron* **16**: 431-40.
- Gurrola, G.B., Molinar-Rode, R., Sitges, M., Bayon, A. and Possani, L.D.** (1989). Synthetic peptides corresponding to the sequence of noxiustoxin indicate that the active site of this K^+ channel blocker is located on its amino-terminal portion. *J Neural Transm* **77**: 11-20.
- Gurrola, G.B., Rosati, B., Rocchetti, M., Pimienta, G., Zaza, A., Arcangeli, A., Olivotto, M., Possani, L.D. and Wanke, E.** (1999). A toxin to nervous, cardiac, and endocrine ERG K^+ channels isolated from *Centruroides noxius* scorpion venom. *Faseb J* **13**: 953-62.
- Gustafson, K.R., Sowder II, R.C.I., Henderson, L.E., Parsons, I.C., Kashman, Y., Cardenilla II, J.H., McMahon, J.B., Buckheit Jr, R.W., Pannell, L.K. and Boyd, M.R.** (1994). Circulins A and B: novel HIV-inhibitory macrocyclic peptides from the tropical tree *Chassalia parvifolia*. *J Am Chem Soc* **116**: 9337-8.
- Guy, H.R. and Conti, F.** (1990). Pursuing the structure and function of voltage-gated channels. *Trends Neurosci* **13**: 201-6.

- Hanlon, M.R. and Wallace, B.A.** (2002). Structure and function of voltage-dependent ion channel regulatory β subunits. *Biochemistry* **41**: 2886-94.
- Hartshorne, R.P., Messner, D.J., Coppersmith, J.C. and Catterall, W.A.** (1982). The saxitoxin receptor of the sodium channel from rat brain. Evidence for two nonidentical beta subunits. *J Biol Chem* **257**: 13888-91.
- Hasson, A., Fainzilber, M., Gordon, D., Zlotkin, E. and Spira, M.** (1993). Alteration of sodium currents by new peptide toxins from the venom of *Molluscivorous Conus* snail. *Eur J Neurosci* **5**.
- Hasson, A., Fainzilber, M., Zlotkin, E. and Spira, M.** (1995a). Electrophysiological characterization of a novel conotoxin that blocks molluscan sodium channels. *Eur J Neurosci* **7**: 815-8.
- Hasson, A., Shon, K.J., Olivera, B.M. and Spira, M.E.** (1995b). Alterations of voltage-activated sodium current by a novel conotoxin from the venom of *Conus gloriamaris*. *J Neurophysiol* **73**: 1295-301.
- Heginbotham, L., LeMasurier, M., Kolmakova-Partensky, L. and Miller, C.** (1999). Single Streptomyces lividans K(+) channels : functional asymmetries and sidedness of proton activation. *J Gen Physiol* **114**: 551-60.
- Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T. and MacKinnon, R.** (1994). Mutation in the signature sequence. *Biophys J* **66**: 1061-7.
- Heinemann, S., Terlau, H., Stühmer, W., Imoto, K. and Numa, S.** (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature* **356**: 441-3.
- Hess, P. and Tsien, R.W.** (1984). Mechanism of ion permeation through calcium channels. *Nature* **309**: 453-6.
- Hill, J.M., Alewood, P.F. and Craik, D.J.** (1996). Three-dimensional solution structure of mu-conotoxin GIIIB, a specific blocker of skeletal muscle sodium channels. *Biochemistry* **35**: 8824-35.
- Hille, B.** (1975). The receptor site for tetrodotoxin and saxitoxin. A structural hypothesis. *Biophys J* **15**: 615-9.
- Hille, B.** (1992). Ionic channels of excitable membranes. 2nd ed. *Sinauer Associates Inc, Sunderland, MA*.
- Hillyard, D.R., Olivera, B.M., Woodward, S.R., Gray, W.R., Corpuz, G.P., Ramilo, C.A. and Cruz, L.J.** (1989). A molluscivorous conus toxin : conserved frameworks in conotoxins. *Biochemistry* **28**: 358-61.
- Houssset, D., Benabicha, F., Pichon-Pesme, V., Jelsch, C., Maierhofer, A., David, S., Fontecilla-Camps, J.C. and Lecomte, C.** (2000). Towards the charge-density study of proteins: a room-temperature scorpion-toxin structure at 0.96 Å resolution as a first test case. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56 (Pt 2)**: 151-60.
- Houssset, D., Habersetzer-Rochat, C., Astier, J.P. and Fontecilla-Camps, J.C.** (1994). Crystal structure of toxin II from the scorpion *Androctonus australis Hector* refined at 1.3 Å resolution. *J Mol Biol* **238**: 88-103.
- Hugnot, J.P., Salinas, M., Lesage, F., Guillemare, E., de Weille, J., Heurteaux, C., Mattei, M.G. and Lazdunski, M.** (1996). Kv8.1, a new neuronal potassium channel subunit with specific inhibitory properties towards Shab and Shaw channels. *Embo J* **15**: 3322-31.
- Huguenard, J.R.** (1998). Low-voltage-activated (T-type) calcium-channel genes identified. *Trends Neurosci* **21**: 451-2.
- Inisan, A.G., Meunier, S., Fedelli, O., Altbach, M., Fremont, V., Sabatier, J.M., Thevan, A., Bernassau, J.M., Cambillau, C. and Darbon, H.** (1995). Structure-activity relationship study of a scorpion toxin with high affinity for apamin-sensitive potassium channels by means of the solution structure of analogues. *Int J Pept Protein Res* **45**: 441-50.
- Isaacs, N.W.** (1995). Cystine knots. *Curr Opin Struct Biol* **5**: 391-5.
- Ishii, T.M., Silvia, C., Hirschberg, B., Bond, C.T., Adelman, J.P. and Maylie, J.** (1997). A human intermediate conductance calcium-activated potassium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 11651-6.
- Islas, L.D. and Sigworth, F.J.** (1999). Voltage sensitivity and gating charge in Shaker and Shab family potassium channels. *J Gen Physiol* **114**: 723-42.
- Jablonsky, M.J., Jackson, P.L. and Krishna, N.R.** (2001). Solution structure of an insect-specific neurotoxin from the New World scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Biochemistry* **40**: 8273-82.
- Jablonsky, M.J., Jackson, P.L., Trent, J.O., Watt, D.D. and Krishna, N.R.** (1999). Solution structure of a beta-neurotoxin from the New World scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Biochem Biophys Res Commun* **254**: 406-12.
- Jablonsky, M.J., Watt, D.D. and Krishna, N.R.** (1995). Solution structure of an Old World-like neurotoxin from the venom of the New World scorpion *Centruroides sculpturatus* Ewing. *J Mol Biol* **248**: 449-58.
- Jacobsen, R.B., Koch, E.D., Lange-Malecki, B., Stocker, M., Verhey, J., Van Wagoner, R.M., Vyazovkina, A., Olivera, B.M. and Terlau, H.** (2000). Single amino acid substitutions in kappa-conotoxin PVIIA disrupt interaction with the shaker K+ channel. *J Biol Chem* **275**: 24639-44.
- Jaimovich, E., Hedefonse, M., Barhanin, J., Rougier, O. and Lazdunski, M.** (1982). *Centruroides* toxin, a selective blocker of surface Na⁺ channels in skeletal muscle: voltage-clamp analysis and biochemical characterization of the receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 3896-900.
- Jan, L.Y. and Jan, Y.N.** (1990). How Might the diversity of potassium channels be generated ? *Trends Neurosci* **13**: 415-9.

- Jan, L.Y. and Jan, Y.N.** (1992). Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. *Annu Rev Physiol* **54**: 537-55.
- Jan, L.Y. and Jan, Y.N.** (1997). Cloned potassium channels from eucaryotes and procaryotes. *Annu Rev Neurosci* **20**: 91-123.
- Jay, S.D., Ellis, S.B., McCue, A.F., Williams, M.E. and Vedvick, T.S.** (1990). Primary structure of the gamma subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* **248**: 490-2.
- Jay, S.D., Sharp, A.H., Kahl, S.D., Vedvick, T.S. and Harpold, M.M.** (1991). Structural characterization of the dihydropyridine-sensitive calcium channel α 2-subunit and the associated δ peptides. *J Biol Chem* **266**: 3287-93.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R.** (2002a). Crystal structure and mechanism of a calcium-gated potassium channel. *Nature* **417**: 515-22.
- Jiang, Y., Lee, A., Chen, J., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R.** (2002b). The open pore conformation of potassium channels. *Nature* **417**: 523-6.
- Jiang, Y., Pico, A., Cadene, M., Chait, B.T. and MacKinnon, R.** (2001). Structure of the RCK domain from the E. coli K⁺ channel and demonstration of its presence in the human BK channel. *Neuron* **29**: 593-601.
- Johnson, B.A. and Sugg, E.E.** (1992). Determination of the three-dimensional structure of iberiotoxin in solution by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* **31**: 8151-9.
- Jover, E., Couraud, F. and Rochat, H.** (1980). Two types of scorpion neurotoxins characterized by their binding to two separate receptor sites on rat brain synaptosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **95**: 1607-14.
- Kamb, A., Iverson, L.E. and Tanouye, M.A.** (1987). Molecular characterization of Shaker, a Drosophila gene that encodes a potassium channel. *Cell* **50**: 405-13.
- Kellenberger, S., Scheuer, T. and Catterall, W.A.** (1996). Movement of the Na⁺ channel inactivation gating during inactivation. *J Biol Chem* **271**: 30971-9.
- Kellenberger, S., West, J.W., Scheuer, T. and Catterall, W.A.** (1997). Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na⁺ channels. *J Gen Physiol* **109**: 589-605.
- Kharrat, R., Darbon, H., Granier, C. and Rochat, H.** (1990). Structure-activity relationships of scorpion alpha-neurotoxins: contribution of arginine residues. *Toxicon* **28**: 509-23.
- Kharrat, R., Darbon, H., Rochat, H. and Granier, C.** (1989). Structure/activity relationships of scorpion alpha-toxins. Multiple residues contribute to the interaction with receptors. *Eur J Biochem* **181**: 381-90.
- Kharrat, R., Mabrouk, K., Crest, M., Darbon, H., Oughideni, R., Martin-Eauclaire, M.F., Jacquet, G., el Ayeb, M., Van Rietschoten, J., Rochat, H. and Sabatier, J.M.** (1996). Chemical synthesis and characterization of maurotoxin, a short scorpion toxin with four disulfide bridges that acts on K⁺ channels. *Eur J Biochem* **242**: 491-8.
- Khöler, 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**: 1709-14.
- Kim, J.I., Konishi, S., Iwai, H., Kohno, T., Gouda, H., Shimada, I., Sato, K. and Arata, Y.** (1995a). Three-dimensional solution structure of the calcium channel antagonist omega-agatoxin IVA: consensus molecular folding of calcium channel blockers. *J Mol Biol* **250**: 659-71.
- Kim, J.I., Takahashi, M., Ogura, A., Kohno, T., Kudo, Y. and Sato, K.** (1994). Hydroxyl group of Tyr13 is essential for the activity of omega-conotoxin GVIA, a peptide toxin for N-type calcium channel. *J Biol Chem* **269**: 23876-8.
- Kim, J.I., Takahashi, M., Ohtake, A., Wakamiya, A. and Sato, K.** (1995b). Tyr13 is essential for the activity of omega-conotoxin MVIIA and GVIA, specific N-type calcium channel blockers. *Biochem Biophys Res Commun* **206**: 449-54.
- Kim, M.S., Morii, T., Sun, L.-X., Imoto, K. and Mori, Y.** (1993). Structural determinants of ion selectivity in brain calcium channel. *FEBS Lett* **318**: 145-8.
- Knaus, H.G., Eberhart, A., Glossmann, H., Munujos, P., Kaczorowski, G.J. and Garcia, M.L.** (1994). Pharmacology and structure of high conductance calcium-activated potassium channels. *Cell Signal* **6**: 861-70.
- Kobayashi, K., Sasaki, T., Sato, K. and Kohno, T.** (2000). Three-dimensional solution structure of omega-conotoxin TxVII, an L-type calcium channel blocker. *Biochemistry* **39**: 14761-7.
- Koch, S.E., Bodi, I., Schwartz, A. and Varadi, G.** (2000). Architecture of Ca(2+) channel pore-lining segments revealed by covalent modification of substituted cysteines. *J Biol Chem* **275**: 34493-500.
- Kohno, T., Kim, J.I., Kobayashi, K., Kodera, Y., Maeda, T. and Sato, K.** (1995). Three-dimensional structure in solution of the calcium channel blocker omega-conotoxin MVIIA. *Biochemistry* **34**: 10256-65.
- Kohno, T., Sasaki, T., Kobayashi, K., Fainzilber, M. and Sato, K.** (2002). Three-dimensional solution structure of the sodium channel agonist/antagonist δ -Conotoxin TxVIA. *J Biol Chem epub*: manuscript M206833200.
- Kopeyan, C., Mansuelle, P., Martin-Eauclaire, M.F., Rochat, H. and Miranda, F.** (1993). Characterization of toxin III of the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*: a new type of alpha-toxin highly toxic both to mammals and insects. *Nat Toxins* **1**: 308-12.

- Kopeyan, C., Mansuelle, P., Sampieri, F., Brando, T., Bahraoui, E.M., Rochat, H. and Granier, C.** (1990). Primary structure of scorpion anti-insect toxins isolated from the venom of *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *FEBS Lett* **261**: 423-6.
- Koppenhofer, E. and Schmidt, H.** (1968). Incomplete sodium inactivation in nodes of Ranvier treated with scorpion venom. *Experientia* **24**: 41-2.
- Krimm, I., Gilles, N., Sautiere, P., Stankiewicz, M., Pelhate, M., Gordon, D. and Lancelin, J.M.** (1999). NMR structures and activity of a novel alpha-like toxin from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus*. *J Mol Biol* **285**: 1749-63.
- Kristipati, R., Nadasdi, L., Tarczy-Hornoch, K., Lau, K., Miljanich, G.P., Ramachandran, J. and Bell, J.R.** (1994). Characterization of the binding of omega-conopeptides to different classes of non-L-type neuronal calcium channels. *Mol Cell Neurosci* **5**: 219-28.
- Kuniyasu, A., Oka, K., Ide-Yamada, T., Hatanaka, Y. and Abe, T.** (1992). Structural characterization of the dihydropyridine receptor-linked calcium channel from porcine heart. *J Biochem* **112**: 235-42.
- 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**: 639-45.
- Lancaster, B., Nicoll, R.A. and Perkel, D.J.** (1991). Calcium activates two types of potassium channels in rat hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* **11**: 23-30.
- Lancelin, J.M., Kohda, D., Tate, S., Yanagawa, Y., Abe, T., Satake, M. and Inagaki, F.** (1991). Tertiary structure of conotoxin GIIIA in aqueous solution. *Biochemistry* **30**: 6908-16.
- Landon, C., Cornet, B., Bonmatin, J.M., Kopeyan, C., Rochat, H., Vovelle, F. and Ptak, M.** (1996). 1H-NMR-derived secondary structure and the overall fold of the potent anti-mammal and anti-insect toxin III from the scorpion *Leiurus quinquestriatus quinquestriatus*. *Eur J Biochem* **236**: 395-404.
- Landon, C., Sodano, P., Cornet, B., Bonmatin, J.M., Kopeyan, C., Rochat, H., Vovelle, F. and Ptak, M.** (1997). Refined solution structure of the anti-mammal and anti-insect LqIII scorpion toxin: comparison with other scorpion toxins. *Proteins* **28**: 360-74.
- Laraba-Djebari, F., Legros, C., Crest, M., Ceard, B., Romi, R., Mansuelle, P., Jacquet, G., Van Rietschoten, J., Gola, M. and Rochat, H.** (1994). The kaliotoxin family enlarged. Purification, characterization, and precursor nucleotide sequence of KTX2 from *Androctonus australis* venom. *J Biol Chem* **269**: 32835-43.
- Latorre, R. and Miller, C.** (1983). Conduction and selectivity in potassium channels. *J Membr Biol* **71**: 11-30.
- Lee, W., Moore, C.H., Watt, D.D. and Krishna, N.R.** (1994). Solution structure of the variant-3 neurotoxin from *Centruroides sculpturatus* Ewing. *Eur J Biochem* **219**: 89-95.
- 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**: 10094-8.
- Lester, D., Lazarovici, P., Pelhate, M. and Zlotkin, E.** (1982). Purification and action of two insect toxins from the venom of the scorpion *Buthotus judaicus*. *Biochim Biophys Acta* **701**: 370-81.
- Letts, V.A., Felix, R., Biddlecome, G.H., Arikath, J., Mahaffey, C.L., Valenzuela, A., Bartlett, F.S., 2nd, Mori, Y., Campbell, K.P. and Frankel, W.N.** (1998). The mouse stargazer gene encodes a neuronal Ca²⁺-channel gamma subunit. *Nat Genet* **19**: 340-7.
- Leung, A.T., Imagawa, T. and Campbell, K.P.** (1987). Structural characterization of the 1,4-dihydropyridine receptor of the voltage-dependent Ca²⁺ channel from rabbit skeletal muscle. Evidence for two distinct high molecular weight subunits. *J Biol Chem* **262**: 7943-6.
- Lew, M.J., Flinn, J.P., Pallaghy, P.K., Murphy, R., Whorlow, S.L., Wright, C.E., Norton, R.S. and Angus, J.A.** (1997). Structure-function relationships of omega-conotoxin GVIA. Synthesis, structure, calcium channel binding, and functional assay of alanine-substituted analogues. *J Biol Chem* **272**: 12014-23.
- Lipkind, G.M. and Fozzard, H.A.** (2001). Modeling of the outer vestibule and selectivity filter of the L-type Ca²⁺ channel. *Biochemistry* **40**: 6786-94.
- Li-Smerin, Y., Hackos, D.H. and Swartz, K.J.** (2000a). alpha-helical structural elements within the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *J Gen Physiol* **115**: 33-50.
- Li-Smerin, Y., Hackos, D.H. and Swartz, K.J.** (2000b). A localized interaction surface for voltage-sensing domains on the pore domain of a K⁺ channel. *Neuron* **25**: 411-23.
- Li-Smerin, Y. and Swartz, K.J.** (2000). Localization and molecular determinants of the Hanatoxin receptors on the voltage-sensing domains of a K(+) channel. *J Gen Physiol* **115**: 673-84.
- Li-Smerin, Y. and Swartz, K.J.** (2001). Helical structure of the COOH terminus of S3 and its contribution to the gating modifier toxin receptor in voltage-gated ion channels. *J Gen Physiol* **117**: 205-18.
- Liu, H., De Waard, M., Scott, V.E., Gurnett, C.A., Lennon, V.A. and Campbell, K.P.** (1996). Identification of three subunits of the high affinity omega-conotoxin MVIIIC-sensitive Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* **271**: 13804-10.
- Liu, Y.S., Sompornpisut, P. and Perozo, E.** (2001). Structure of the KcsA channel intracellular gate in the open state. *Nat Struct Biol* **8**: 883-7.
- Loret, E.P., Mansuelle, P., Rochat, H. and Granier, C.** (1990). Neurotoxins active on insects: amino acid sequences, chemical modifications, and secondary structure estimation by circular dichroism of toxins from the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Biochemistry* **29**: 1492-501.

- MacKinnon, R., Cohen, S.L., Kuo, A., Lee, A. and Chait, B.T.** (1998). Structural conservation in prokaryotic and eukaryotic potassium channels. *Science* **280**: 106-9.
- MacKinnon, R. and Miller, C.** (1989a). Functional modification of a Ca²⁺-activated K⁺ channel by trimethylxonium. *Biochemistry* **28**: 8087-92.
- MacKinnon, R. and Miller, C.** (1989b). Mutant potassium channels with altered binding of charybdotoxin, a pore-blocking peptide inhibitor. *Science* **245**: 1382-5.
- MacKinnon, R. and Yellen, G.** (1990). Mutations affecting TEA blockade and ion permeation in voltage-activated K⁺ channels. *Science* **250**: 276-9.
- Mantegazza, M., Yu, F.H., Catterall, W.A. and Scheuer, T.** (2001). Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 15348-53.
- Martin-Eau Claire, M.F. and Rochat, H.** (1986). Large scale purification of toxins from the venom of the scorpion *Androctonus australis hector*. *Toxicon* **24**: 1131-9.
- Martin-Eau Claire, M.F. and Couraud, F.** (1995). Scorpion neurotoxins : effects and mechanism. "Handbook of Neurotoxicology", Chang & Dyer ED., N.Y., Basel, Hong-Kong: 683-716.
- Martinez, F., Munoz-Garay, C., Gurrola, G., Darszon, A., Possani, L.D. and Becerril, B.** (1998). Site directed mutants of noxiustoxin reveal specific interactions with potassium channels. *FEBS Lett* **429**: 381-4.
- Martins, J.C., Zhang, W.G., Tartar, A., Lazdunski, M. and Borremans, F.A.** (1990). Solution conformation of leiurotoxin I (scyllatoxin) by 1H nuclear magnetic resonance. Resonance assignment and secondary structure. *FEBS Lett* **260**: 249-53.
- Matsuda, H.** (1991). Magnesium gating of the inwardly rectifying K⁺ channel. *Annu Rev Physiol* **53**: 289-98.
- McCleskey, E.W. and Almers, W.** (1985). The Ca channel in skeletal muscle is a large pore. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**: 7149-53.
- McDonald, N.Q. and Hendrickson, W.A.** (1993). A structural superfamily of growth factors containing a cystine knot motif. *Cell* **73**: 421-4.
- McDonough, A.A., Swartz, K.J., Mintz, I.M., Boland, L.M. and Bean, B.P.** (1996). Inhibition of calcium channels in rat central and peripheral neurons by ω -conotoxin MVIIC. *J Neurosci* **16**: 2612-23.
- McIntosh, J.M., Hasson, A., Spira, M.E., Gray, W.R., Li, W., Marsh, M., Hillyard, D.R. and Olivera, B.M.** (1995). A new family of conotoxins that blocks voltage-gated sodium channels. *J Biol Chem* **270**: 16796-802.
- McIntosh, M., Cruz, L.J., Hunkapiller, M.W., Gray, W.R. and Olivera, B.M.** (1982). Isolation and structure of a peptide toxin from the marine snail *Conus magus*. *Arch Biochem Biophys* **218**: 329-34.
- Meuser, D., Splitt, H., Wagner, R. and Schrempf, H.** (1999). Exploring the open pore of the potassium channel from *Streptomyces lividans*. *FEBS Lett* **462**: 447-52.
- Meves, H., Rubly, N. and Watt, D.D.** (1982). Effect of toxins isolated from the venom of the scorpion *Centruroides sculpturatus* on the Na currents of the node of Ranvier. *Pflugers Arch* **393**: 56-62.
- Mikami, A., Imoto, K., Tanabe, T., Niidome, T., Mori, Y., Takeshima, H., Narumiya, S. and Numa, S.** (1989). Primary structure and functional expression of the cardiac dihydropyridine-sensitive calcium channel. *Nature* **340**: 230-3.
- Milani, D., Malgaroli, A., Guidolin, D., Fasolato, C. and Skaper, S.D.** (1990). Ca²⁺ channels and intracellular Ca²⁺ stores in neuronal and neuroendocrine cells. *Cell Calcium* **11**: 191-9.
- Miller, C.** (1995). The charybdotoxin family of K⁺ channel-blocking peptides. *Neuron* **15**: 5-10.
- Minami, K., Raymond, C., Martin-Moutot, N., Ohtake, A., Van Renterghem, C., Takahashi, M., Seagar, M.J., Mori, Y. and Sato, K.** (2001). Role of Thr(11) in the binding of omega-conotoxin MVIIC to N-type Ca²⁺ channels. *FEBS Lett* **491**: 127-30.
- Mintz, I.M.** (1994). Block of Ca channels in rat central neurons by the spider toxin omega-Aga-IIIa. *J Neurosci* **14**: 2844-53.
- Mintz, I.M., Venema, V.J., Adams, M.E. and Bean, B.P.** (1991). Inhibition of N- and L-type Ca²⁺ channels by the spider venom toxin omega-Aga-IIIa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6628-31.
- Mintz, I.M., Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Bean, B.P. and Adams, M.E.** (1992). P-type calcium channels blocked by the spider toxin omega-Aga-IVa. *Nature* **355**: 827-9.
- Mitterdorfer, J., Grabner, M., Kraus, R.L., Hering, S., Prinz, H., Glossmann, H. and Striessnig, J.** (1998). Molecular basis of drug interaction with L-type Ca²⁺ channels. *J Bioenerg Biomembr* **30**: 319-34.
- Moczydlowski, E., Olivera, B.M., Gray, W.R. and Strichartz, G.R.** (1986a). Discrimination of muscle and neuronal Na-channel subtypes by binding competition between [3H]saxitoxin and mu-conotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5321-5.
- Moczydlowski, E., Olivera, B.M., Gray, W.R. and Strichartz, G.R.** (1986b). Discrimination of muscle and neuronal sodium channel subtypes by binding competition between [³H] saxitoxin and μ -conotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 5321-5.
- Morgan, K., Stevens, E.B., Shah, B., Cox, P.J., Dixon, A.K., Lee, K., Pinnock, R.D., Hughes, J., Richardson, P.J., Mizuguchi, K. and Jackson, A.P.** (2000). beta 3: an additional auxiliary subunit of the voltage-sensitive sodium channel that modulates channel gating with distinct kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 2308-13.

- Morgans, C.W., Gaughwin, P. and Maleszka, R.** (2001). Expression of the $\alpha 1F$ calcium channel subunit by photoreceptors in the rat retina. *Mol Vis* **7**: 202-9.
- Mosbah, A., Kharrat, R., Fajloun, Z., Renisio, J.G., Blanc, E., Sabatier, J.M., El Ayeb, M. and Darbon, H.** (2000). A new fold in the scorpion toxin family, associated with an activity on a ryanodine-sensitive calcium channel. *Proteins* **40**: 436-42.
- Mullmann, T.J., Munujos, P., Garcia, M.L. and Giangiacomo, K.M.** (1999). Electrostatic mutations in iberiotoxin as a unique tool for probing the electrostatic structure of the maxi-K channel outer vestibule. *Biochemistry* **38**: 2395-402.
- Murray-Rust, J., McDonald, N.Q., Blundell, T.L., Hosang, M., Oefner, C., Winkler, F. and Bradshaw, R.A.** (1993). Topological similarities in TGF- β 2, PDGF-BB and NGF define a superfamily of polypeptide growth factors. *Structure* **1**: 153-9.
- Mylecharane, E.J., Spence, I., Sheumack, D.D., Claassens, R. and Howden, M.E.** (1989). Actions of robustoxin, a neurotoxic polypeptide from the venom of the male funnel-web spider (*Atrax robustus*), in anaesthetized monkeys. *Toxicon* **27**: 481-92.
- Nadasdi, L., Yamashiro, D., Chung, D., Tarczy-Hornoch, K., Adriaenssens, P. and Ramachandran, J.** (1995). Structure - activity analysis of a conus peptide blocker of N-type neuronal calcium channel. *Biochemistry* **34**: 8076-81.
- Nakamura, M., Niwa, Y., Ishida, Y., Kohno, T., Sato, K., Oba, Y. and Nakamura, H.** (2001). Modification of Arg-13 of μ -conotoxin GIIIA with piperidinyl-Arg analogs and their relation to the inhibition of sodium channels. *FEBS Lett* **503**: 107-10.
- Naranjo, D.** (2002). Inhibition of single *Shaker* K channels by κ -conotoxin-PVIIA. *Biophys J* **82**: 3003-11.
- Naranjo, D. and Miller, C.** (1996). A strongly interacting pair of residues on the contact surface of charybdotoxin and a *Shaker* K⁺ channel. *Neuron* **16**: 123-30.
- Nemoto, N., Kubo, S., Yoshida, T., Chino, N., Kimura, T., Sakakibara, S., Kyogoku, Y. and Kobayashi, Y.** (1995). Solution structure of omega-conotoxin MVIIC determined by NMR. *Biochem Biophys Res Commun* **207**: 695-700.
- Nicholson, G.M., Little, M.J., Tyler, M. and Narahashi, T.** (1996). Selective alteration of sodium channel gating by Australian funnel-web spider toxins. *Toxicon* **34**: 1443-53.
- Nicholson, G.M., Walsh, R., Little, M.J. and Tyler, M.I.** (1998). Characterisation of the effects of robustoxin, the lethal neurotoxin from the Sydney funnel-web spider *Atrax robustus*, on sodium channel activation and inactivation. *Pflugers Arch* **436**: 117-26.
- Nicholson, G.M., Willow, M., Howden, M.E. and Narahashi, T.** (1994). Modification of sodium channel gating and kinetics by versutoxin from the Australian funnel-web spider *Hadronyche versuta*. *Pflugers Arch* **428**: 400-9.
- Nielsen, K.J., Adams, D., Thomas, L., Bond, T., Alewood, P.F., Craik, D.J. and Lewis, R.J.** (1999a). Structure-activity relationships of omega-conotoxins MVIIA, MVIIC and 14 loop splice hybrids at N and P/Q-type calcium channels. *J Mol Biol* **289**: 1405-21.
- Nielsen, K.J., Adams, D.A., Alewood, P.F., Lewis, R.J., Thomas, L., Schroeder, T. and Craik, D.J.** (1999b). Effects of chirality at Tyr13 on the structure-activity relationships of omega-conotoxins from *Conus magus*. *Biochemistry* **38**: 6741-51.
- Nieto, A.R., Gurrola, G.B., Vaca, L. and Possani, L.D.** (1996). Noxiustoxin2, a novel K⁺ channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centroides noxius* Hoffman. *Toxicon* **34**: 913-22.
- Nilges, M., Habazettl, J., Brünger, A.T. and Holak, T.A.** (1991). relaxation matrix refinement of the solution structure of squash trypsin inhibitor. *J Mol Biol* **248**: 106-24.
- Noda, M., Shimizu, S., Tanabe, T., Kayano, T., Ikeda, T., Takahashi, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y., Minamino, N., Kangawa, K., Matsuo, H., Raftery, M.A., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. and Numa, S.** (1984). Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**: 121-7.
- Noda, M., Suzuki, H., Numa, S. and Stühmer, W.** (1989). A single point mutation confers tetrodotoxin and saxitoxin insensitivity on the sodium channel II. *FEBS Lett* **259**: 213-6.
- Norton, R.S. and Pallaghy, P.K.** (1998). The cystine knot structure of ion channel toxins and related polypeptides. *Toxicon* **36**: 1573-83.
- Novello, J.C., Arantes, E.C., Varanda, W.A., Oliveira, B., Giglio, J.R. and Marangoni, S.** (1999). TsTX-IV, a short chain four-disulfide-bridged neurotoxin from *Tityus serrulatus* venom which acts on Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Toxicon* **37**: 651-60.
- Nowycky, M.C., Fox, A.P. and Tsien, R.W.** (1985). three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* **316**: 440-3.
- Ohizumi, Y., Nakamura, H., Kobayashi, J. and Catterall, W.A.** (1986). Geographutoxin II, a peptide sodium channel blocker that selectively inhibits [³H] saxitoxin binding to muscle and nerve sodium channels. *J Biol Chem* **261**: 6149-52.
- Olivera, B.M. and Cruz, L.J.** (2001). Conotoxins, in retrospect. *Toxicon* **39**: 7-14.
- Olivera, B.M., Cruz, L.J., de Santos, V., LeCheminant, G.W., Griffin, D., Zeikus, R., McIntosh, J.M., Galyean, R., Varga, J., Gray, W.R. and et al.** (1987). Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from *Conus magus* venom. *Biochemistry* **26**: 2086-90.
- Olivera, B.M., McIntosh, J.M., Cruz, L.J., Luque, F.A. and Gray, W.R.** (1984). Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from *Conus geographus* venom. *Biochemistry* **23**: 5087-90.

- Omecinsky, D.O., Holub, K.E., Adams, M.E. and Reily, M.D.** (1996). Three-dimensional structure analysis of mu-agatoxins: further evidence for common motifs among neurotoxins with diverse ion channel specificities. *Biochemistry* **35**: 2836-44.
- Oren, D.A., Froy, O., Amit, E., Kleinberger-Doron, N., Gurevitz, M. and Shaanan, B.** (1998). An excitatory scorpion toxin with a distinctive feature: an additional alpha helix at the C terminus and its implications for interaction with insect sodium channels. *Structure* **6**: 1095-103.
- Ott, K.H., Becker, S., Gordon, R.D. and Ruterjans, H.** (1991). Solution structure of mu-conotoxin GIIIA analysed by 2D-NMR and distance geometry calculations. *FEBS Lett* **278**: 160-6.
- Ozawa, T.** (2001). Ryanodine-sensitive Ca²⁺ release mechanism in non-excitabile cells (Review). *Int J Mol Med* **7**: 21-5.
- Pallaghy, P.K., Duggan, B.M., Pennington, M.W. and Norton, R.S.** (1993). Three-dimensional structure in solution of the calcium channel blocker omega-conotoxin. *J Mol Biol* **234**: 405-20.
- Pallaghy, P.K., Nielsen, K.J., Craik, D.J. and Norton, R.S.** (1994). A common structural motif incorporating a cystine knot and a triple-stranded beta-sheet in toxic and inhibitory polypeptides. *Protein Sci* **3**: 1833-9.
- Pallaghy, P.K. and Norton, R.S.** (1999). Refined solution structure of omega-conotoxin GVIA: implications for calcium channel binding. *J Pept Res* **53**: 343-51.
- Papazian, D.M., Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (1987). Cloning of genomic and complementary DNA from Shaker, a putative potassium channel gene from *Drosophila*. *Science* **237**: 749-53.
- Park, C.S. and Miller, C.** (1992a). Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry* **31**: 7749-55.
- Park, C.S. and Miller, C.** (1992b). Interaction of charybdotoxin with permeant ions inside the pore of a K⁺ channel. *Neuron* **9**: 307-13.
- Parsegian, V.A.** (1975). Ion-membrane interactions as structural forces. *Ann N Y Acad Sci* **264**: 161-71.
- Pauron, D., Barhanin, J. and Lazdunski, M.** (1985). The voltage-dependent Na⁺ channel of insect nervous system identified by receptor sites for tetrodotoxin, and scorpion and sea anemone toxins. *Biochem Biophys Res Commun* **131**: 1226-33.
- Pedersen, K.A., Jorgensen, N.K., Jensen, B.S. and Olesen, S.P.** (2000). Inhibition of the human intermediate-conductance Ca²⁺ channel by intracellular acidification. *Pflugers Arch* **440**: 153-6.
- Perez-Reyes, E.** (1998). Molecular characterization of a novel family of low voltage-activated, T-type, calcium channels. *J Bioenerg Biomembr* **30**: 313-8.
- Perez-Reyes, E.** (1999). Three for T: molecular analysis of the low voltage-activated calcium channel family. *Cell Mol Life Sci* **56**: 660-9.
- Perez-Reyes, E., Cribbs, L.L., Daud, A., Lacerda, A.E., Barclay, J., Williamson, M.P., Fox, M., Rees, M. and Lee, J.H.** (1998). Molecular characterization of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel. *Nature* **391**: 896-900.
- Perez-Reyes, E., Kim, H.S., Lacerda, A.E., Horne, W.A. and Wey, X.Y.** (1989). Induction of calcium currents by the expression of the alpha 1-subunit of the dihydropyridine receptor from skeletal muscle. *Nature* **340**: 233-6.
- Perez-Reyes, E., Lee, J.H. and Cribbs, L.L.** (1999). Molecular characterization of two members of the T-type calcium channel family. *Ann N Y Acad Sci* **868**: 131-43.
- Perozo, E., Cortes, D.M. and Cuello, L.G.** (1999). Structural rearrangements underlying K⁺-channel activation gating. *Science* **285**: 73-8.
- Pichler, M., Cassidy, T.N., Reimer, D., Haase, H., Kraus, R., Ostler, D. and Striessnig, J.** (1997). Beta subunit heterogeneity in neuronal L-type Ca²⁺ channels. *J Biol Chem* **272**: 13877-82.
- Pintar, A., Possani, L.D. and Delepierre, M.** (1999). Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a beta-scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *J Mol Biol* **287**: 359-67.
- Plummer, M.R., Logothetis, D.E. and Hess, P.** (1989). Elementary properties and pharmacological sensitivities of calcium channels in mammalian peripheral neurons. *Neuron* **2**: 1453-63.
- Pongs, O.** (1992). Molecular biology of voltage-dependent potassium channels. *Physiol Rev* **72**: 69-78.
- Price-Carter, M., Gray, W.R. and Goldenberg, D.P.** (1996a). Folding of omega-conotoxins. 1. Efficient disulfide-coupled folding of mature sequences in vitro. *Biochemistry* **35**: 15537-46.
- Price-Carter, M., Gray, W.R. and Goldenberg, D.P.** (1996b). Folding of omega-conotoxins. 2. Influence of precursor sequences and protein disulfide isomerase. *Biochemistry* **35**: 15547-57.
- Price-Carter, M., Hull, M.S. and Goldenberg, D.P.** (1998). Roles of individual disulfide bonds in the stability and folding of an omega-conotoxin. *Biochemistry* **37**: 9851-61.
- Ramilo, C.A., Zafaralla, G.C., Nadasdi, L., Hammerland, L.G., Yoshikami, D., Gray, W.R., Kristipati, R., Ramachandran, J., Miljanich, G., Olivera, B.M. and et al.** (1992). Novel alpha- and omega-conotoxins from *Conus striatus* venom. *Biochemistry* **31**: 9919-26.
- Rees, M., Chang, G. and Spencer, R.H.** (2000). Crystallographic analyses of ion channels : lessons and challenges. *J Biol Chem* **275**: 713-6.

- Regan, L.J., Sah, D.W. and Bean, B.P.** (1991). Ca²⁺ channels in rat central and peripheral neurons : high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω -conotoxin. *Neuron* **6**: 269-80.
- Reily, M.D., Holub, K.E., Gray, W.R., Norris, T.M. and Adams, M.E.** (1994). Structure-activity relationships for P-type calcium channel-selective omega-agatoxins. *Nat Struct Biol* **1**: 853-6.
- Reily, M.D., Thanabal, V. and Adams, M.E.** (1995). The solution structure of omega-Aga-IVB, a P-type calcium channel antagonist from venom of the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *J Biomol NMR* **5**: 122-32.
- Reuter, H.** (1983). Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs. *Nature* **301**: 569-74.
- Rogers, J.C., Qu, Y., Tanada, T.N., Scheuer, T. and Catterall, W.A.** (1996). Molecular determinants of high affinity binding of alpha-scorpion toxin and sea anemone toxin in the S3-S4 extracellular loop in domain IV of the Na⁺ channel alpha subunit. *J Biol Chem* **271**: 15950-62.
- Romi, R., Crest, M., Gola, M., Sampieri, F., Jacquet, G., Zerrouk, H., Mansuelle, P., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., Rochat, H. and et al.** (1993). Synthesis and characterization of kaliotoxin. Is the 26-32 sequence essential for potassium channel recognition? *J Biol Chem* **268**: 26302-9.
- Romi-Lebrun, R., Lebrun, B., Martin-Eauclaire, M.F., Ishiguro, M., Escoubas, P., Wu, F.Q., Hisada, M., Pongs, A. and Nakajima, T.** (1997). Purification, characterization, and synthesis of three novel toxins from the Chinese scorpion *Buthus martensi*, which act on K⁺ channels. *Biochemistry* **36**: 13473-82.
- Roux, B., Berneche, S. and Im, W.** (2000). Ion channels, permeation, and electrostatics : insight into the function of KcsA. *Biochemistry* **39**: 13295-306.
- Roux, B. and MacKinnon, R.** (1999). The cavity and pore helices in the KcsA K⁺ channel : electrostatic stabilization of monovalent cations. *Science* **285**: 100-2.
- Rudy, B.** (1988). Diversity and ubiquity of K channels. *Neuroscience* **25**: 729-49.
- Ruth, P., Röhrkasten, A., Biel, M., Bosse, E. and Regula, S.** (1989). Primary structure of the beta subunit of the DHP-sensitive calcium channel from skeletal muscle. *Science* **245**: 1115-8.
- Sabatier, J.M., Fremont, V., Mabrouk, K., Crest, M., Darbon, H., Rochat, H., Van Rietschoten, J. and Martin-Eauclaire, M.F.** (1994). Leiurotoxin I, a scorpion toxin specific for Ca(2+)-activated K⁺ channels. Structure-activity analysis using synthetic analogs. *Int J Pept Protein Res* **43**: 486-95.
- Sabatier, J.M., Zerrouk, H., Darbon, H., Mabrouk, K., Benslimane, A., Rochat, H., Martin-Eauclaire, M.F. and Van Rietschoten, J.** (1993). P05, a new leiurotoxin I-like scorpion toxin: synthesis and structure-activity relationships of the alpha-amidated analog, a ligand of Ca(2+)-activated K⁺ channels with increased affinity. *Biochemistry* **32**: 2763-70.
- Saether, O., Craik, D.J., Campbell, I.D., Sletten, K., Juul, J. and Norman, D.G.** (1995). Elucidation of the primary and three-dimensional structure of the uterotonic polypeptide kalata B1. *Biochemistry* **34**: 4147-58.
- Sah, P.** (1996). Ca(2+)-activated K⁺ currents in neurones : types, physiological roles and modulation. *Trends Neurosci* **19**: 150-4.
- Salinas, M., Duprat, F., Heurteaux, C., Hugnot, J.P. and Lazdunski, M.** (1997). New modulatory alpha subunits for mammalian Shab K⁺ channels. *J Biol Chem* **272**: 24371-9.
- Samsó, M., Trujillo, R., Gurrola, G.B., Valdivia, H.H. and Wagenknecht, T.** (1999). Three-dimensional location of the imperatoxin A binding site on the ryanodine receptor. *J Cell Biol* **146**: 493-9.
- Sandberg, B.E.** (1979). Solid phase synthesis of 13-lysine-apamin, 14-apamin, and the corresponding guanidinated derivatives. *Int J Pept Protein Res* **13**: 327-33.
- 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**: 491-8.
- Santos, A.D., Imperial, J.S., Chaudhary, T., Beavis, R.C., Chait, B.T., Hunsperger, J.P., Olivera, B.M., Adams, M.E. and Hillyard, D.R.** (1992). Heterodimeric structure of the spider toxin omega-agatoxin IA revealed by precursor analysis and mass spectrometry. *J Biol Chem* **267**: 20701-5.
- Satin, J. and Cribbs, L.L.** (2000). Identification of a T-type Ca(2+) channel isoform in murine atrial myocytes (AT-1 cells). *Circ Res* **86**: 636-42.
- Sato, C., Ueno, Y., Asai, K., Takahashi, K., Sato, M., Engel, A. and Fujiyoshi, Y.** (2001). The voltage-sensitive sodium channel is a bell-shaped molecule with several cavities. *Nature* **409**: 1047-51.
- Sato, K., Ishida, Y., Wakamatsu, K., Kato, R., Honda, H., Ohizumi, Y., Nakamura, H., Ohya, M., Lancelin, J.M., Kohda, D. and et al.** (1991). Active site of mu-conotoxin GIIIA, a peptide blocker of muscle sodium channels. *J Biol Chem* **266**: 16989-91.
- Sato, K., Park, N.G., Kohno, T., Maeda, T., Kim, J.I., Kato, R. and Takahashi, M.** (1993). Role of basic residues for the binding of omega-conotoxin GVIA to N-type calcium channels. *Biochem Biophys Res Commun* **194**: 1292-6.
- Sato, K., Raymond, C., Martin-Moutot, N., Sasaki, T., Ohtake, A., Minami, K., Van Renterghem, C., Kim, J.I., Takahashi, M. and Seagar, M.J.** (2000). Binding of Ala-scanning analogs of omega-conotoxin MVIIC to N- and P/Q-type calcium channels. *FEBS Lett* **469**: 147-50.

- Sato, K., Raymond, C., Martin-Moutot, N., Sasaki, T., Omori, A., Ohtake, A., Kim, J.I., Kohno, T., Takahashi, M. and Seagar, M.** (1997). Binding of chimeric analogs of omega-conotoxin MVIIA and MVIIIC to the N- and P/Q-type calcium channels. *FEBS Lett* **414**: 480-4.
- Sautiere, P., Cestele, S., Kopeyan, C., Martinage, A., Drobecq, H., Doljansky, Y. and Gordon, D.** (1998). New toxins acting on sodium channels from the scorpion *Leiurus quinquestriatus hebraeus* suggest a clue to mammalian vs insect selectivity. *Toxicon* **36**: 1141-54.
- Savarin, P., Guennegues, M., Gilquin, B., Lamthanh, H., Gasparini, S., Zinn-Justin, S. and Menez, A.** (1998). Three-dimensional structure of kappa-conotoxin PVIIA, a novel potassium channel-blocking toxin from cone snails. *Biochemistry* **37**: 5407-16.
- Scanlon, M.J., Naranjo, D., Thomas, L., Alewood, P.F., Lewis, R.J. and Craik, D.J.** (1997). Solution structure and proposed binding mechanism of a novel potassium channel toxin kappa-conotoxin PVIIA. *Structure* **5**: 1585-97.
- Schlief, T., Schonherr, R., Imoto, K. and Heinemann, S.H.** (1996). Pore properties of rat brain II sodium channels mutated in the selectivity filter domain. *Eur Biophys J* **25**: 75-91.
- Schrempf, H., Schmidt, O., Kummerlen, R., Hinnah, S., Muller, D., Betzler, M., Steinkamp, T. and Wagner, R.** (1995). A prokaryotic potassium ion channel with two predicted transmembrane segments from *Streptomyces lividans*. *Embo J* **14**: 5170-8.
- Schwarz, T.L., Tempel, B.L., Papazian, D.M., Jan, Y.N. and Jan, L.Y.** (1988). Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila*. *Nature* **331**: 137-42.
- Sevilla, P., Bruix, M., Santoro, J., Gago, F., Garcia, A.G. and Rico, M.** (1993). Three-dimensional structure of omega-conotoxin GVIA determined by ¹H NMR. *Biochem Biophys Res Commun* **192**: 1238-44.
- Sheumack, D.D., Claassens, R., Whiteley, N.M. and Howden, M.E.** (1985). Complete amino acid sequence of a new type of lethal neurotoxin from the venom of the funnel-web spider *Atrax robustus*. *FEBS Lett* **181**: 154-6.
- Shon, K.J., Grilley, M.M., Marsh, M., Yoshikami, D., Hall, A.R., Kurz, B., Gray, W.R., Imperial, J.S., Hillyard, D.R. and Olivera, B.M.** (1995). Purification, characterization, synthesis, and cloning of the lockjaw peptide from *Conus purpurascens* venom. *Biochemistry* **34**: 4913-8.
- Shon, K.J., Hasson, A., Spira, M.E., Cruz, L.J., Gray, W.R. and Olivera, B.M.** (1994). Delta-conotoxin GmVIA, a novel peptide from the venom of *Conus gloriamaris*. *Biochemistry* **33**: 11420-5.
- Shon, K.J., Stocker, M., Terlau, H., Stuhmer, 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**: 33-8.
- Sidach, S.S. and Mintz, I.M.** (2000). Low-affinity blockade of neuronal N-type Ca channels by the spider toxin omega-agatoxin-IVA. *J Neurosci* **20**: 7174-82.
- Skalicky, J.J., Metzler, W.J., Ciesla, D.J., Galdes, A. and Pardi, A.** (1993). Solution structure of the calcium channel antagonist omega-conotoxin GVIA. *Protein Sci* **2**: 1591-603.
- Skinner, W.S., Adams, M.E., Quistad, G.B., Kataoka, H., Cesarin, B.J., Enderlin, F.E. and Schooley, D.A.** (1989). Purification and characterization of two classes of neurotoxins from the funnel web spider, *Agelenopsis aperta*. *J Biol Chem* **264**: 2150-5.
- Snutch, T.P., Leonard, J.P., Gilbert, M.M., Lester, H.A. and Davidson, N.** (1990). Rat brain expresses a heterogeneous family of calcium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 3391-5.
- Song, J., Gilquin, B., Jamin, N., Drakopoulou, E., Guennegues, M., Dauplais, M., Vita, C. and Menez, A.** (1997). NMR solution structure of a two-disulfide derivative of charybdotoxin: structural evidence for conservation of scorpion toxin alpha/beta motif and its hydrophobic side chain packing. *Biochemistry* **36**: 3760-6.
- Sorensen, J.B., Cha, A., Latorre, R., Rosenman, E. and Bezanilla, F.** (2000). Deletion of the S3-S4 linker in the Shaker potassium channel reveals two quenching groups near the outside of S4. *J Gen Physiol* **115**: 209-22.
- Srairi-Abid, N., Mansuelle, P., Mejri, T., Karoui, H., Rochat, H., Sampieri, F. and El Ayeb, M.** (2000). Purification, characterization and molecular modelling of two toxin-like proteins from the *Androctonus australis* Hector venom. *Eur J Biochem* **267**: 5614-20.
- Staes, M., Talavera, K., Klugbauer, N., Prenen, J., Lacinova, L., Droogmans, G., Hofmann, F. and Nilius, B.** (2001). The amino side of the C-terminus determines fast inactivation of the T-type calcium channel alpha1G. *J Physiol* **530**: 35-45.
- Stampe, P., Kolmakova-Partensky, L. and Miller, C.** (1994). Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry* **33**: 443-50.
- Stephan, M.M., Potts, J.F. and Agnew, W.S.** (1994). The microI skeletal muscle sodium channel: mutation E403Q eliminates sensitivity to tetrodotoxin but not to muconotoxins GIHA and GIIB. *J Membr Biol* **137**: 1-8.
- Strichartz, G.R. and Wang, G.K.** (1986). Rapid voltage-dependent dissociation of scorpion alpha-toxins coupled to Na channel inactivation in amphibian myelinated nerves. *J Gen Physiol* **88**: 413-35.
- Striessnig, J.** (1999). Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels. *Cell Physiol Biochem* **9**: 242-69.
- Striessnig, J.** (2001). Targeting voltage-gated Ca²⁺ channels. *Lancet* **357**: 1294.

- Striessnig, J., Grabner, M., Mitterdorfer, J., Hering, S., Sinnegger, M.J. and Glossmann, H.** (1998). Structural basis of drug binding to L Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci* **19**: 108-15.
- Sun, P.D. and Davies, D.R.** (1995). The cystine-knot growth-factor superfamily. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **24**: 269-91.
- Sun, Y.M., Favre, L., Schild, L. and Moczydlowski, E.** (1997). On the structural basis for size selective permeation of organic cations through the voltage-gated sodium channel-effect of alanine mutations at the DEKA locus on selectivity, inhibition by Ca²⁺ and H⁺, and molecular sieving. *J Gen Physiol* **110**: 693-715.
- Sutro, J.B., Vayuvegula, B.S., Gupta, S. and Cahalan, M.** (1989). Voltage-sensitive ion channels in human B lymphocytes. *Adv Exp Med Biol* **254**: 113-22.
- 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**: 941-9.
- Swartz, K.J. and MacKinnon, R.** (1997a). Hanatoxin modifies the gating of a voltage-dependent K⁺ channel through multiple binding sites. *Neuron* **18**: 665-73.
- Swartz, K.J. and MacKinnon, R.** (1997b). Mapping the receptor site for hanatoxin, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels. *Neuron* **18**: 675-82.
- 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**: 771-80.
- Takahashi, M., Seagar, M.J., Jones, J.F., Reber, B.F. and Catterall, W.A.** (1987). Subunit structure of dihydropyridine-sensitive calcium channels from skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 5478-82.
- Tanabe, T., Takeshima, H., Mikami, A., Flockerzi, V., Takahashi, H., Kangawa, K., Kojima, M., Matsuo, H., Hirose, T. and Numa, S.** (1987). Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature* **328**: 313-8.
- Tedford, H.W., Fletcher, J.I. and King, G.F.** (2001). Functional significance of the β -hairpin in the insectidal neurotoxin ω -atracotoxin-Hv1a. *J Biol Chem* **276**: 26568-76.
- Tejedor, F.J. and Catterall, W.A.** (1988). Site of covalent attachment of alpha-scorpion toxin derivatives in domain I of the sodium channel alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 8742-6.
- Terlau, H., Heinemann, S.H., Stühmer, W., Pusch, M., Conti, F., Imoto, K. and Numa, S.** (1991). Mapping the site of block by tetrodotoxin and saxitoxin of sodium channel II. *FEBS Lett* **293**: 93-6.
- Terlau, H., Shon, K.J., Grilley, M., Stocker, M., Stuhmer, W. and Olivera, B.M.** (1996a). Strategy for rapid immobilization of prey by a fish-hunting marine snail. *Nature* **381**: 148-51.
- Terlau, H., Stocker, M., Shon, K.J., McIntosh, J.M. and Olivera, B.M.** (1996b). MicroO-conotoxin MrVIA inhibits mammalian sodium channels, but not through site I. *J Neurophysiol* **76**: 1423-9.
- Thomsen, W.J. and Catterall, W.A.** (1989). Localization of the receptor site for alpha-scorpion toxins by antibody mapping: implications for sodium channel topology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 10161-5.
- Trigg, D.J.** (1999). The pharmacology of ion channels: with particular reference to voltage-gated Ca²⁺ channels. *Eur J Pharmacol* **375**: 311-25.
- Tugarinov, V., Kustanovich, I., Zilberberg, N., Gurevitz, M. and Anglister, J.** (1997). Solution structures of a highly insecticidal recombinant scorpion alpha-toxin and a mutant with increased activity. *Biochemistry* **36**: 2414-24.
- Vaca, L., Gurrola, G.B., Possani, L.D. and Kunze, D.L.** (1993). Blockade of a KCa channel with synthetic peptides from noxiustoxin: a K⁺ channel blocker. *J Membr Biol* **134**: 123-9.
- Valdivia, H.H., Smith, J.S., Martin, B.M., Coronado, R. and Possani, L.D.** (1988). Charybdotoxin and noxiustoxin, two homologous peptide inhibitors of the K⁺ (Ca²⁺) channel. *FEBS Lett* **226**: 280-4.
- Vandorpe, D.H., Shmukler, B.E., Jiang, L., Lim, B., Maylie, J., Adelman, J.P., De franceschi, L., Capellini, M.D., Brugnara, C. and Alper, S.L.** (1998). cDNA cloning and functional characterization of the mouse Ca²⁺-gated K⁺ channel, mK1. Roles in regulatory volume and erythroid differentiation. *J Biol Chem* **273**: 21542-53.
- Vargas, O., Martin, M.F. and Rochat, H.** (1987). Characterization of six toxins from the venom of the Moroccan scorpion *Buthus occitanus mardochei*. *Eur J Biochem* **162**: 589-99.
- Vassilev, P.M., Scheuer, T. and Catterall, W.A.** (1988). Identification of an intracellular peptide segment involved in sodium channel inactivation. *Science* **241**: 1658-61.
- Vassilev, P.M., Scheuer, T. and Catterall, W.A.** (1989). Inhibition of inactivation of single sodium channels site-directed antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 8147-51.
- Venema, V.J., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Hathaway, G.M. and Adams, M.E.** (1992). Antagonism of synaptosomal calcium channels by subtypes of omega-agatoxins. *J Biol Chem* **267**: 2610-5.
- Wakamatsu, K., Kohda, D., Hatanaka, H., Lancelin, J.M., Ishida, Y., Oya, M., Nakamura, H., Inagaki, F. and Sato, K.** (1992). Structure-activity relationships of mu-conotoxin GIIIA: structure determination of active and inactive sodium channel blocker peptides by NMR and simulated annealing calculations. *Biochemistry* **31**: 12577-84.
- Waldmann, R., Champigny, G., Bassilana, F., Heurteaux, C. and Lazdunski, M.** (1997). A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature* **386**: 173-7.

- Wallner, M., Meera, P. and Toro, L.** (1996). Determinant for beta-subunit regulation in high conductance voltage-activated and Ca(2+)-sensitive K⁺ channels : an additional transmembrane region at the N-terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 14922-7.
- Wang, M.H., Oh, U. and Rhee, H.I.** (2000). Amino acid substitution within the S2 and S4 transmembrane segments in Shaker potassium channel modulates channel gating. *Biochem Biophys Res Commun* **275**: 720-4.
- Wang, X., Smith, R., Fletcher, J.I., Wilson, H., Wood, C.J., Howden, M.E. and King, G.F.** (1999). Structure-function studies of omega-atracotoxin, a potent antagonist of insect voltage-gated calcium channels. *Eur J Biochem* **264**: 488-94.
- Wang, X.H., Connor, M., Wilson, D., Wilson, H.I., Nicholson, G.M., Smith, R., Shaw, D., Mackay, J.P., Alewood, P.F., Christie, M.J. and King, G.F.** (2001). Discovery and structure of a potent and highly specific blocker of insect calcium channels. *J Biol Chem* **276**: 40306-12.
- Wei, A., Jegla, T. and Salkoff, L.** (1996). Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology* **35**: 805-29.
- West, J.W., Patton, D.E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A.L. and Catterall, W.A.** (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na⁺-channel inactivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**: 10910-4.
- Witherup, K.M., Bogusky, M.J., Anderson, P.S., Ramjit, H., Ransom, R.W., Wood, T. and Sardana, M.** (1994). Cyclopsychoptide A, a biologically active 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. *J Nat Prod* **57**: 1619-25.
- Woodward, S.R., Cruz, L.J., Olivera, B.M. and Hillyard, D.R.** (1990). Constant and hypervariable regions in conotoxin propeptides. *Embo J* **9**: 1015-20.
- Wu, X.S., Edwards, H.D. and Sather, W.A.** (2000). Side chain orientation in the selectivity filter of a voltage-gated Ca²⁺ channel. *J Biol Chem* **275**: 31778-85.
- Wütrich, K.** (1986). Resonance assignment and structure determination in proteins. *NMR of proteins and nucleic acids*. New York : John Wiley and Sons.
- Xu, Y., Jablonsky, M.J., Jackson, P.L., Braun, W. and Krishna, N.R.** (2001). Automatic assignment of NOESY cross peaks and determination of the protein structure of a new world scorpion neurotoxin using NOAH/DIAMOD. *J Magn Reson* **148**: 35-46.
- Xu, Y., Wu, J., Pei, J., Shi, Y., Ji, Y. and Tong, Q.** (2000). Solution structure of BmP02, a new potassium channel blocker from the venom of the Chinese scorpion *Buthus martensi Karsch*. *Biochemistry* **39**: 13669-75.
- Yan, L. and Adams, M.E.** (2000). The spider toxin omega-Aga IIIA defines a high affinity site on neuronal high voltage-activated calcium channels. *J Biol Chem* **275**: 21309-16.
- Yanagawa, Y., Abe, T. and Satake, M.** (1986). Blockade of [3H]lysine-tetrodotoxin binding to sodium channel proteins by conotoxin GIII. *Neurosci Lett* **64**: 7-12.
- Yanagawa, Y., Abe, T. and Satake, M.** (1987). Muconotoxins share a common binding site with tetrodotoxin/saxitoxin on eel electroplax Na channels. *J Neurosci* **7**: 1498-502.
- Yang, J., Ellinor, P.T., Sather, W.A., Zhang, J.-F. and Tsien, R.W.** (1993). Molecular determinants of Ca²⁺ selectivity and ion permeation in L-type Ca²⁺ channels. *Nature* **366**: 158-61.
- Yatani, A., Kirsch, G.E., Possani, L.D. and Brown, A.M.** (1988). Effects of New World scorpion toxins on single-channel and whole cell cardiac sodium currents. *Am J Physiol* **254**: H443-51.
- Yellen, G., Jurman, M.E., Abramson, T. and MacKinnon, R.** (1991). Mutations affecting internal TEA blockade identify the probable pore-forming region of a K⁺ channel. *Science* **251**: 939-42.
- Yool, A.J. and Schwarz, T.L.** (1991). Alteration of ionic selectivity of a K⁺ channel by mutation of the H5 region. *Nature* **349**: 700-4.
- Yu, H., Rosen, M.K., Saccomano, N.A., Phillips, D., Volkmann, R.A. and Schreiber, S.L.** (1993). Sequential assignment and structure determination of spider toxin omega-Aga-IVB. *Biochemistry* **32**: 13123-9.
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martin, B.M., Gurrola-Briones, G., Herion, P. and Possani, L.D.** (1992). Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius Hoffmann*. *Eur J Biochem* **204**: 281-92.
- Zerrouk, H., Laraba-Djebari, F., Fremont, V., Meki, A., Darbon, H., Mansuelle, P., Oughideni, R., Van Rietschoten, J., Rochat, H. and Martin-Eau Claire, M.F.** (1996). Characterization of P01, a new peptide ligand of the apamin-sensitive Ca²⁺ activated K⁺ channel. *Int J Pept Protein Res* **48**: 514-21.
- Zerrouk, H., Mansuelle, P., Benslimane, A., Rochat, H. and Martin-Eau Claire, M.F.** (1993). Characterization of a new leurotoxin I-like scorpion toxin. PO5 from *Androctonus mauretanicus mauretanicus*. *FEBS Lett* **320**: 189-92.
- Zhang, J.-F., Randall, A.D., Ellinor, P.T., Horne, W.A., Sather, W.A., Tanabe, T., Schwartz, T.L. and Tsien, R.W.** (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* **32**: 1075-88.
- Zhao, B., Carson, M., Ealick, S.E. and Bugg, C.E.** (1992). Structure of scorpion toxin variant-3 at 1.2 Å resolution. *J Mol Biol* **227**: 239-52.
- Zhao, B., Rassendren, F., Kaang, B.K., Furukawa, Y., Kubo, T. and Kandel, E.R.** (1994). A new class of noninactivating K⁺ channels from *Aplysia* capable of contributing to the resting potential and firing patterns of neurons. *Neuron* **13**: 1205-13.

Zhorov, B.S., Folkman, E.V. and Ananthanarayanan, V.S. (2001). Homology model of dihydropyridine receptor: implications for L-type Ca(2+) channel modulation by agonists and antagonists. *Arch Biochem Biophys* **393**: 22-41.

Zhou, Y., Morais-Cabral, J.H., Kaufman, A. and MacKinnon, R. (2001). Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K⁺ channel-Fab complex at 2.0 Å resolution. *Nature* **414**: 43-8.

Zilberberg, N., Froy, O., Loret, E., Cestele, S., Arad, D., Gordon, D. and Gurevitz, M. (1997). Identification of structural elements of a scorpion alpha-neurotoxin important for receptor site recognition. *J Biol Chem* **272**: 14810-6.

Zilberberg, N., Gordon, D., Pelhate, M., Adams, M.E., Norris, T.M., Zlotkin, E. and Gurevitz, M. (1996). Functional expression and genetic alteration of an alpha scorpion neurotoxin. *Biochemistry* **35**: 10215-22.

Zilberberg, N., Zlotkin, E. and Gurevitz, M. (1991). The cDNA sequence of a depressant insect selective neurotoxin from the scorpion *Buthotus judaicus*. *Toxicon* **29**: 1155-8.

Zlotkin, E. (1987). Pharmacology of survival: insect selective neurotoxins derived from scorpion venom. *Endeavour* **11**: 168-74.

Zlotkin, E., Eitan, M., Bindokas, V.P., Adams, M.E., Moyer, M., Burkhart, W. and Fowler, E. (1991). Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry* **30**: 4814-21.

Zlotkin, E., Kadouri, D., Gordon, D., Pelhate, M., Martin, M.F. and Rochat, H. (1985). An excitatory and a depressant insect toxin from scorpion venom both affect sodium conductance and possess a common binding site. *Arch Biochem Biophys* **240**: 877-87.

Zlotkin, E., Rochat, H., Kopeyan, Miranda, F. and Lissitzky, S. (1971). Purification and properties of the insect toxin from the venom of the scorpion *Androctonus australis* Hector. *Biochimie* **53**: 1073-8.



RÉSUMÉ

Les canaux ioniques occupent une place primordiale dans les mécanismes du vivant, et leurs dysfonctionnements sont à l'origine de nombreuses pathologies. Dans l'optique d'envisager un traitement efficace de ces maladies, la compréhension des mécanismes de fonctionnement des canaux ioniques constitue un objectif majeur à atteindre. Les toxines animales actives sur les canaux ioniques apparaissent aujourd'hui comme un outil de choix pour mieux comprendre le fonctionnement de ces canaux. Au travers de son introduction bibliographique, ce manuscrit présente les canaux K^+ , Na^+ et Ca^{2+} et les toxines animales dont ces canaux sont les cibles naturelles. Ces toxines s'organisent majoritairement autour de deux motifs structuraux distincts : le motif $Cs\alpha\beta$ (*Cystine stabilized α/β motif*), décrit principalement dans les toxines de scorpion actives sur les canaux K^+ et Na^+ , et le motif ICK (*Inhibitor Cystine Knot*) qui est rencontré dans certaines toxines de cônes et d'araignées actives sur les canaux K^+ , Na^+ ou Ca^{2+} . Le travail effectué au cours de cette thèse est sous-tendu par un objectif, améliorer encore la connaissance et la compréhension de l'interaction d'une toxine et de sa cible, le canal. Les résultats obtenus s'articulent autour de la détermination de la structure RMN de plusieurs toxines. Concernant le motif $Cs\alpha\beta$, nos résultats montrent que, par conception de protéines chimères, nous pouvons modifier la spécificité et/ou la sélectivité des toxines envers les canaux K^+ . Concernant le motif ICK, nos résultats pour les toxines actives sur les canaux K^+ doivent être confirmés par des études complémentaires puisque la structure indique que ces toxines semblent interagir au niveau du pore du canal, hypothèse en contradiction avec les données biologiques ; pour les toxines actives sur les canaux Ca^{2+} , la spécificité envers les différents types de canaux et l'influence de l'anisotropie de répartition des charges électrostatiques sur l'interaction toxine/canal sont discutées.

ABSTRACT

Ionic channels are of crucial importance as they are involved in numerous biological processes. In the aim of finding an efficient treatment against diseases, those are produced by a functional alteration of such channels, the understanding of functional mechanisms of these channels is the main goal to reach. Animal toxins acting against ionic channels are valuable tools for probing channel's pharmacological and structural properties. This manuscript present the K^+ , Na^+ and Ca^{2+} channels and their natural blockers : animal toxins. These toxins are organized around two main structural motifs : the $Cs\alpha\beta$ motif (*Cystine stabilized α/β motif*), mainly described for scorpion toxins acting against K^+ and Na^+ channels, and the ICK motif (*Inhibitor Cystine Knot*) encountered in many conotoxins and spider toxins that are active on Ca^{2+} , K^+ or Na^+ channels. The work presented in this manuscript is underlined by the goal to improve the knowledge and understandings of the molecular interaction between a toxin and an ionic channel. The results are organized around the NMR solution structure determination of such toxins. Concerning the $Cs\alpha\beta$ motif, the conception of toxin chimaeras shows that the specificity and/or the selectivity of the toxin toward a type of K^+ channel can be modified. Considering the toxins organized around the ICK structural motif, our results concerning those acting against K^+ channels have to be confirmed with some more experiments: the structure indicates these toxins might be pore channel blockers whereas biological assay purposes these toxins acting as gating modifiers. Concerning the toxins that are active on Ca^{2+} channels, the specificity against the different channel's subtypes and the influence of the anisotropy of electrostatic charges repartition on the interaction between the toxin and the channel are discussed.