

研究论文

敬钊毒素-V对Kv4.3通道的抑制作用

蔡丽君, 徐德宏, 罗吉, 陈仁忠, 池宇朋, 曾雄智*, 王贤纯, 梁宋平

湖南师范大学蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 长沙 410081

摘要: K⁺通道亚型Kv4.3在调节心肌细胞动作电位的幅度与时程方面具有重要作用,是治疗心律失常的有效作用靶点,但目前世界上该通道的特异性抑制剂非常缺乏。敬钊毒素-V (Jingzhaotoxin-V, JZTX-V)是从敬钊缨毛蜘蛛粗毒中纯化到的一种新型肽类神经毒素,能够部分抑制大鼠背根神经节细胞上的瞬时外向K⁺电流,其半数有效抑制浓度(IC₅₀值)为52.3 nmol/L。为了研究JZTX-V对Kv4.3通道的作用,本实验通过多肽固相化学合成的方法得到JZTX-V,并用双电极电压钳技术检测JZTX-V对表达在非洲爪蟾卵母细胞上的Kv4.3通道电流的作用。结果显示,JZTX-V能够完全抑制Kv4.3通道电流,并且这种抑制作用具有浓度依赖性和时间依赖性,其IC₅₀值为425.1 nmol/L,JZTX-V还能够使通道的电流-电压关系曲线和稳态失活曲线分别向去极化方向漂移大约29 mV和10 mV,改变Kv4.3通道的动力学特征,因此我们推测JZTX-V是一种Kv4.3通道门控调制毒素。以上研究结果对于开发心肌Kv4.3通道的分子探针及以Kv4.3通道为靶点的药物设计具有借鉴作用。

关键词: 敬钊毒素-V; Kv4.3通道; 电压钳技术; 非洲爪蟾

中图分类号: R329

Inhibition of Jingzhaotoxin-V on Kv4.3 channel

CAI Li-Jun, XU De-Hong, LUO Ji, CHEN Ren-Zhong, CHI Yu-Peng, ZENG Xiong-Zhi*, WANG Xian-Chun, LIANG Song-Ping

Key Laboratory of Protein Chemistry and Developmental Biology of Ministry of Education, Hunan Normal University, Changsha 410081, China

Abstract: Kv4.3 channel is present in many mammalian tissues, predominantly in the heart and central nervous system. Its currents are transient, characterized by rapid activation and inactivation. In the hearts of most mammals, it is responsible for repolarization of the action potential of ventricular myocytes and is important in the regulation of the heart rate. Because of its central role in this important physiological process, Kv4.3 channel is a promising target for anti-arrhythmic drug development. Jingzhaotoxin-V (JZTX-V) is a novel peptide neurotoxin isolated from the venom of the spider *Chilobrachys jingzhao*. Whole-cell patch clamp recording showed that it partly blocked the transient outward potassium channels in dorsal root ganglion neurons of adult rats with an IC₅₀ value of 52.3 nmol/L. To investigate the effect of JZTX-V on Kv4.3 channel, JZTX-V was synthesized using the solid-phase chemical synthesis and separated by reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC). The purity was tested by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MOLDI-TOF mass spectrometry). Two-electrode voltage-clamp technique was used to characterize the action of JZTX-V on Kv4.3 channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes. As a result, JZTX-V displayed fast kinetics of inhibition and recovery from inactivation. Furthermore, it could inhibit Kv4.3 channel current in a time- and concentration-dependent manner with an IC₅₀ value of 425.1 nmol/L. The application of JZTX-V affected the activation and inactivation characteristics of Kv4.3 channel and caused a shift of the current-voltage relationship curve and the steady-state inactivation curve to depolar-

Received 2010-03-01 Accepted 2010-04-15

This work was supported by the National Basic Research Development Program (973) of China (No. 2009CB526510, 2010CB529801), National High Technology Research and Development Program (863) of China (No. 2006AA02Z141), Natural Science Foundation of Hunan Province, China (No. 07JJ3072), and Program for New Century Excellent Talents in University, Ministry of Education, China (NCET-07-0279).

*Corresponding author. Tel: +86-731-88872556; Fax: +86-731-88861304; E-mail: xiongzhiheng@yahoo.com.cn

izing direction by approximately 29 mV and 10 mV, respectively. So we deduced that JZTX-V is a gating modifier toxin of Kv4.3 channel. Present findings should be helpful to develop JZTX-V into a molecular probe and drug candidate targeting to Kv4.3 channel in the myocardium.

Key words: Jingzhaotoxin-V; Kv4.3 channel; voltage clamp techniques; *Xenopus laevis*

敬钊毒素-V (Jingzhaotoxin-V, JZTX-V)是从我国新发现的珍稀蜘蛛品种敬钊缨毛蛛(*Chilobrachys jingzhao*)^[1]粗毒中分离纯化到的一种新型肽类神经毒素,其相对分子质量为3 605.73,由29个氨基酸残基组成,含3对二硫键。采用Edman降解气相蛋白质方法测序得到JZTX-V的一级结构为YCQKWMWTCDSKRACCEGLRCKLWCRKII。已有电生理实验显示,JZTX-V能够强有力地抑制大鼠背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)细胞上表达的河豚毒素不敏感型(TTX-R)与河豚毒素敏感型(TTX-S)钠电流,其半数有效抑制浓度(IC₅₀值)分别为27.6 nmol/L和30.2 nmol/L^[2]。还有研究显示JZTX-V对大鼠背根神经节细胞上表达的电压门控钙通道和延迟整流钾通道电流均没有抑制作用,却能够部分抑制瞬时外向钾电流^[3]。瞬时外向钾电流由瞬时外向钾通道产生,这类通道主要包括Kv1.4通道和Kv4家族的Kv4.1、Kv4.2、Kv4.3通道。以前的研究显示JZTX-V对爪蟾卵母细胞上表达的Kv1.4和Kv4.1通道没有抑制作用,却能够完全抑制同样表达的Kv4.2通道^[2]。Kv4.3通道也属于瞬时外向钾通道,它的激活和失活都非常迅速,同时Kv4.3通道在调节心肌细胞动作电位的幅度与时程方面具有重要作用,是治疗心律失常的有效作用靶点,其特异性抑制剂具有开发成抗心律失常药物的医用价值,但目前世界上Kv4.3通道的特异性抑制剂非常缺乏。本研究在非洲爪蟾卵母细胞上成功表达了Kv4.3通道,通过研究JZTX-V对Kv4.3通道的作用,初步探索它作用于Kv4.3通道的作用机制,为将其开发成研究Kv4.3通道的工具试剂提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及毒素 非洲爪蟾购自中国科学院北京遗传与发育生物学研究所,然后由本实验室饲养;JZTX-V,由本实验室多肽固相化学合成法合成、复性并分离纯化,纯度达99%以上。

1.2 Kv4.3通道的体外转录 Kv4.3通道质粒由David Mckinnon教授(美国纽约州立大学)提供。先将质粒扩增,然后用Plasmid Midi Kit (Omega公司,

美国)进行提取。将提取的质粒用NdeI限制性内切酶(Fermentas公司,加拿大)进行线性化后,用体外转录试剂盒mMESSAGE mMACHINE[®] T7 High Yield Capped RNA Transcription Kit (Ambion公司,美国)进行体外转录。将转录后的mRNA用MicroElute RNA Clean-Up Kit (Omega公司,美国)进行纯化。

1.3 卵母细胞的获取 取成年雌性非洲爪蟾,放入碎冰内麻醉约30 min。将处于麻醉状态的爪蟾放置于冰上,于中腹部中线外侧约0.5 cm处做一个1.0~1.5 cm的横向切口,拉出子宫瓣,剪取2~3叶放入无钙ND96溶液(96 mmol/L NaCl, 2 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L HEPES, pH 7.4)中。将子宫瓣放回腹部,分两层(肌肉层和皮肤层)将其伤口缝合好。将取出的卵叶用系线镊初步分散成10~20个细胞一团,然后转入50 mL离心管中,加入含有胶原酶的无钙ND96溶液,胶原酶终浓度为1 mg/mL。在25 °C、50 r/min的条件下酶解约60 min,直至80%以上的细胞已经去除滤泡膜及微血管后则可停止酶解,在酶解过程中可取部分细胞在显微镜下观察酶解程度。酶解完毕,用无钙的ND96多次洗涤细胞,洗去残留的胶原酶。然后,挑选个体比较大、动植物极分明的细胞转入含钙的ND96培养液中(1.8 mmol/L CaCl₂, 96 mmol/L NaCl, 2 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgCl₂, 5 mmol/L HEPES, pH 7.4)于18 °C条件下培养。12~24 h后,给每个细胞显微注射10 ng左右的Kv4.3 mRNA,然后将注射后的细胞放在16 °C的条件下培养2~4 d备用。

1.4 双电极杆电压钳实验 双电极杆电压钳记录在室温(18~22 °C)条件下进行。将卵母细胞放入60 μL细胞槽中,槽内液体为含钙的ND96培养液。然后将细胞钳制在-90 mV,给予去极化脉冲刺激。所用放大器为TURBO TEC-03X (NPI Electronic公司,德国),数据采集滤波为2 kHz。参比电极用Ag/AgCl电极与浴槽相连。毒素用含钙的ND96溶液配制目的浓度,通过灌注的方法加药。每次加药的剂量为60 μL,加药过程在10 s之内完成,动作要轻缓,加药后观察药物对电流的影响,及时记录。刺激脉冲控制和电流信号记录采用Cell works

数据采集系统(NPI公司, 德国)。数据的分析和统计学比较均采用SigmaPlot软件进行。每次实验完毕, 均用0.1 mol/L HCl清洗细胞槽, 以免毒素残留而影响下次实验结果。

2 结果

2.1 JZTX-V对Kv4.3通道的抑制作用

图1A显示, 细胞被钳制在-90 mV, 通过给予+20 mV的去极化测试电压记录到外向钾电流; 在

1 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V的作用下, 该电流被显著抑制; 在10 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V的作用下, 该通道电流几乎被完全抑制。图1B显示, JZTX-V对Kv4.3通道的抑制作用具有浓度依赖性。光滑曲线经Boltzmann公式拟合得出: $\text{Inhibition}\% = 100/[1 + \exp(C - \text{IC}_{50})/k]$, 其中 IC_{50} 为半数有效抑制浓度, k 为斜率, C 为毒素浓度。图中每个数据点均来自于3个细胞, 数据以 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 的形式表示。由曲线计算得出JZTX-V抑制Kv4.3通道电流的 IC_{50} 值为425.1 nmol/L。

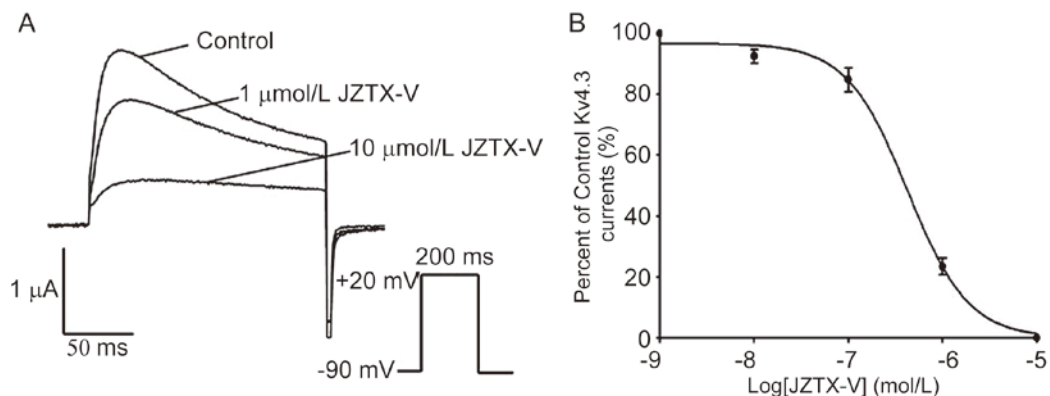


图 1. JZTX-V对Kv4.3通道电流的抑制作用

Fig. 1. Inhibition of Kv4.3 channel currents by JZTX-V. A: Current traces of Kv4.3 channel in absence and in the presence of 1 $\mu\text{mol/L}$ and 10 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V. Currents were elicited by 200 ms voltage steps to +20 mV from a holding potential of -90 mV. B: Concentration-dependent inhibition of JZTX-V on Kv4.3 channel. Every data point ($\text{mean} \pm \text{SEM}$) came from 3 separated experimental cells. The above results indicated that the IC_{50} value was 425.1 nmol/L.

2.2 JZTX-V对Kv4.3通道的抑制动力学

图2A为500 nmol/L JZTX-V作用下的Kv4.3通道的原始记录电流(钳制电压为-90 mV, 以200 ms的时程给予+20 mV的测试电压, 刺激时间间隔为5 s)。图2B为500 nmol/L JZTX-V抑制Kv4.3通道电流的时间曲线, 电流被抑制部分的曲线由方程 $y = Ae^{-kx} + C$ 拟合而成, 电流恢复部分的曲线由方程 $y = A(1 - e^{-kx}) + C$ 拟合而成, 其中 x 表示时间, A 为加入毒素之前的归一化电流值(通常为1), C 为加入毒素之后的归一化电流值, 时间常数 τ 为速率常数 k 的倒数。由曲线可知JZTX-V能快速抑制Kv4.3通道电流, 并且这种抑制是可逆的, 即把毒素洗脱掉以后, 电流以非常快的速度恢复到对照水平。由曲线计算得出, 500 nmol/L JZTX-V抑制Kv4.3通道电流的抑制时间常数为(11.29 \pm 1.54) s ($n=3$), 恢复时间常数为(27.47 \pm 4.35) s ($n=3$)。

2.3 JZTX-V对Kv4.3通道激活动力学的影响

图3A为原始记录电流(钳制电压为-90 mV, 去极化电压由-80 mV增至+60 mV, 以步长为10 mV递增), 左图为未加毒素时的原始电流记录, 右图为1 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V作用下的原始记录电流。图3B为其电流-电压关系曲线, 可见未加毒素时Kv4.3通道的起始激活电压约为-50 mV, 加入1 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V后, 在测试电压为-40 mV时, 电流被完全抑制, 当测试电压为-20 mV时, 电流只被抑制了一部分。由此我们认为提高去极化电压, 可以使结合了毒素分子的离子通道被激活。图中曲线经Boltzmann公式拟合得出, 由曲线计算得出: 加毒素前, 半数稳态激活电压 $V_{1/2}$ 为(18.67 \pm 3.47) mV ($n=3$), 斜率(k)为21.07 \pm 1.60 ($n=3$); 加100 nmol/L JZTX-V后, $V_{1/2}$ 为(23.19 \pm 3.05) mV ($n=3$), 斜率(k)为20.04 \pm 1.33 ($n=3$); 加1 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V后, $V_{1/2}$

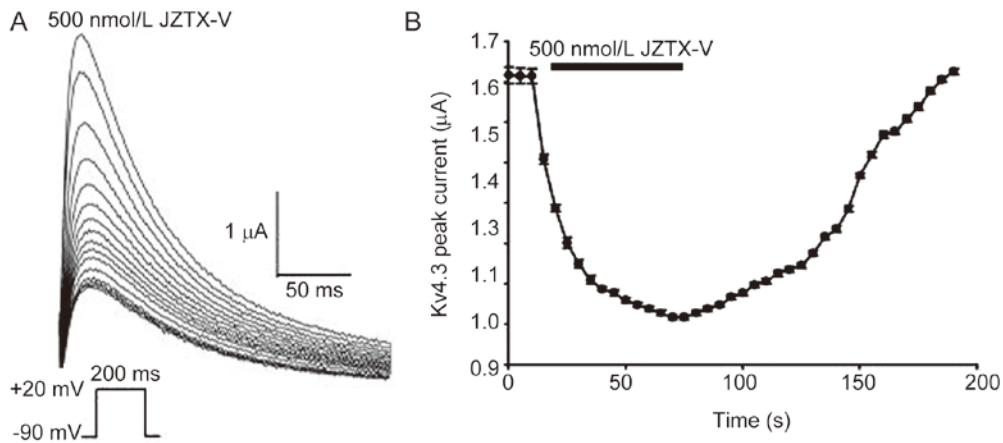


图 2. 500 nmol/L JZTX-V 抑制 Kv4.3 通道的时间曲线

Fig. 2. The time-course of inhibition of Kv4.3 channels in the presence of 500 nmol/L JZTX-V. A: Current traces of Kv4.3 channel in the presence of 500 nmol/L JZTX-V. Currents were activated by 200 ms voltage steps to +20 mV from a holding potential of -90 mV. B: Onsets of inhibition and recovery are shown for the application of 500 nmol/L JZTX-V to Kv4.3-expressing *Xenopus laevis* oocytes. $\tau_{onset} = (11.29 \pm 1.54)$ s, $\tau_{recovery} = (27.47 \pm 4.35)$ s from three separated experimental cells.

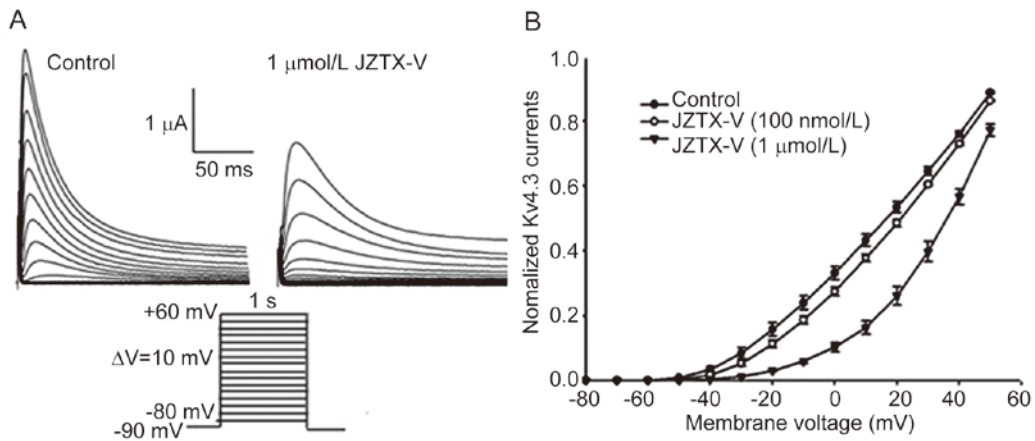


图 3. JZTX-V 对 Kv4.3 通道电流 - 电压关系曲线的影响

Fig. 3. Current-voltage relationships for Kv4.3 channel in absence and in the presence of 100 nmol/L and 1 µmol/L JZTX-V. A: Current traces of Kv4.3 channel in absence and in the presence of 1 µmol/L JZTX-V. Currents were elicited using 1 s depolarization to potentials from -80 mV to +60 mV in 10 mV steps from a holding potential of -90 mV. B: Current-voltage relationships of Kv4.3 channel in absence and in the presence of 100 nmol/L and 1 µmol/L JZTX-V. Every data point (mean±SEM) came from 3-5 separated experimental cells.

为(47.56±1.87) mV (n=3), 斜率(k)为 18.14±0.46 (n=3)。该结果表明 100 nmol/L JZTX-V 对通道激活的影响不明显($\Delta V_{1/2} = 4.52$ mV, <5 mV, $P = 0.39$), 而 1 µmol/L JZTX-V 使通道的电流 - 电压关系曲线向去极化方向漂移约 29 mV ($\Delta V_{1/2} = 28.89$ mV)。由此可知 JZTX-V 对 Kv4.3 通道激活动力学的影响也具有浓度依赖性。

2.4 JZTX-V 对 Kv4.3 通道失活动力学的影响

图 4A 为稳态失活曲线的原始记录, 左图为未加

毒素时的原始电流记录, 右图为 1 µmol/L JZTX-V 作用下的原始记录电流。实验中, 我们通过选用一标准双脉冲刺激方式, 进一步观察了 JZTX-V 对 Kv4.3 通道的稳态失活特征的影响, 双脉冲刺激参数为: 预钳制电压为 -120 mV, 持续时间为 3 s, 然后将细胞膜电位变为 -90 mV, 持续时间为 50 ms, 目的是消除细胞膜电容的充电状态, 再将去极化电压跃迁到 +50 mV, 去极化持续时间为 1 s, 之后膜电位回到 -90 mV。进行下一次刺激时, 只需改

变预钳制电压(从 -120 mV 至 +50 mV, 以步幅为 10 mV 递增), 而去极化的测试电压水平同上。图 4B 为其稳态失活曲线, 在不同的预钳制电压条件下, 我们发现当预钳制电压为 -120 mV 时所诱导出的电流幅值最大, 当预钳制电压增大时, 电流幅值逐渐减小; 当预钳制电压为 -20 mV 时, 相同的测试电压几乎不能诱导出电流。图中曲线经 Boltzmann 公式拟合得出, 由曲线计算得出: 加毒素前, 半数

稳态失活电压 $V_{1/2,i}$ 为 (-68.10 ± 3.01) mV ($n=3$), 斜率 (k_i) 为 -11.35 ± 2.43 ($n=3$); 加 1 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V 后, $V_{1/2,i}$ 为 (-57.85 ± 4.08) mV ($n=3$), 斜率 (k_i) 为 -10.84 ± 3.12 ($n=3$), $\Delta V_{1/2,i} = 10.25$ mV, $\Delta k_i = 0.51$ 。结果表明 JZTX-V 改变了 Kv4.3 通道的稳态失活特征, 使稳态失活曲线向去极化方向漂移大约 10 mV, 但没有明显改变对照曲线的斜率。

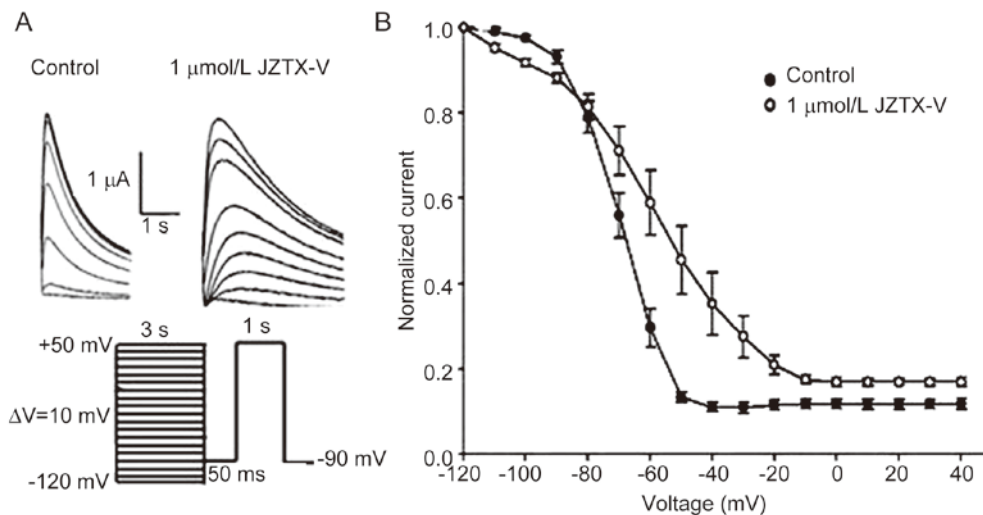


图 4. JZTX-V 对 Kv4.3 通道稳态失活动力学特征的影响

Fig. 4. Steady-state inactivation curves for Kv4.3 channel before and after application of 1 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V. A: Current traces of Kv4.3 channel in absence and in the presence of 1 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V. A two-pulse protocol was used to measure the steady-state inactivation relationship. From a holding potential of -90 mV, 18 3-s voltage steps (P1) were applied from -120 to +50 mV in 10 mV increments followed by a 1-s pulse (P2) to +50 mV. B: Steady-state inactivation curves for Kv4.3 channel in absence and in the presence of 1 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V. Every data point (mean \pm SEM) came from 3-5 separated experimental cells.

3 讨论

JZTX-V能部分抑制大鼠背根神经节细胞上的瞬时外向钾电流, 钾通道亚型 Kv1.4、Kv4.1、Kv4.2、Kv4.3 均能产生瞬时外向钾电流。本室之前的研究结果显示 JZTX-V 对 Kv1.4 电流没有抑制作用, 对 Kv4.1 电流有微弱的抑制作用(5 $\mu\text{mol/L}$ JZTX-V 抑制 23% 的钾电流), 对 Kv4.2 电流有较强的抑制作用, 其 IC_{50} 为 585 nmol/L^[2]。本研究结果显示 JZTX-V 对 Kv4.3 通道有更强的抑制作用(其 IC_{50} 值为 425.1 nmol/L), 是 Kv4.3 通道的强阻断剂, 因此可将 JZTX-V 开发成为研究钾通道亚型 Kv4.3 的工具试剂。同时由于 Kv4.3 通道是治疗心律不齐的靶标, 所以 JZTX-V 也具有开发成抗心律不齐药物的潜在医用价值。

JZTX-V 能够使 Kv4.3 通道的电流 - 电压关系曲

线和稳态失活曲线向去极化方向漂移, 并且使通道激活的电压依赖性降低。这表明 JZTX-V 改变了 Kv4.3 通道的门控性质, 是一种门控调制毒素。门控调制毒素是通过与电压门控离子通道的电压敏感域作用来改变离子通道的电压依赖性的^[4-6]。电压门控离子通道的 S4 跨膜螺旋是电压敏感区, 由 S3(b) 与带有四个正电荷的 S4 跨膜螺旋通过反平行的方式与连接它们的转折环链构成了一个电压敏感的桨叶结构(voltage-sensor paddles), 该结构被包埋于细胞膜脂双层中, 能够感应膜电位变化而在蛋白质与磷脂的界面以 S3b 在上、S4 在下的方式移动并以此来控制通道的打开与关闭^[7]。JZTX-V 与 Kv4.3 通道的特异性毒素 phrixotoxin1 结构相似: 都由 29 个氨基酸残基组成, 其中只有 5 个氨基酸残基不同, 序列同源性高达 82.8%; 且两者都含有 3 对二硫键, 二

硫键配对方式也相同,也同属于抑制剂胱氨酸结构模体(inhibitor cystine knot, ICK)。Phrixotoxin1 的结构中还拥有一个疏水性的前突,通过这个前突与磷脂膜作用,前突的顶端又被一些重要的氨基酸残基(Arg3、Arg22)包围,并通过这些氨基酸残基与电压敏感元件接触。Phrixotoxin1 作用于 Kv4.3 通道的关键区域在 S3b-S4 片段之间^[8]。Phrixotoxin1 对 Kv4.3 通道的作用也与 JZTX-V 有着相似之处,它能使通道的电流-电压关系曲线往去极化方向漂移。提示 JZTX-V 在 Kv4.3 通道上可能也具有与 phrixotoxin1 相似的作用位点。而瞬时外向钾通道阻断剂蝎毒素 BmTx3A,主要抑制 Kv4.1 通道电流,其 IC₅₀ 值为 106 nmol/L,该毒素对 Kv4.3 通道电流的抑制作用较弱,对 Kv1.4 通道电流则完全没有抑制作用。由于 JZTX-V 含有 6 个半胱氨酸,其中有两个半胱氨酸残基直接相连,属于典型的 ICK 分子,而 BmTx3A 分子同样含有 6 个半胱氨酸残基,却没有双连半胱氨酸残基,属于典型的 CSa/b 结构模体,因此我们推断造成两者对 Kv4.3 通道抑制活性不同的主要原因就在于氨基酸序列与结构模体的巨大差异^[9]。

为了进一步探索 Kv4.3 通道与 JZTX-V 相互作用的分子机制,我们下一步的工作将在 Kv4.3 通道的 S3b-S4 片段之间进行丙氨酸扫描突变研究,以此来确定该通道与 JZTX-V 相互作用的关键活性残基。同时,也将对 JZTX-V 进行丙氨酸扫描突变研究以确定毒素与 Kv4.3 通道相互作用的关键活性残基以及生物活性表面,为进一步的分子设计及分子改造提供科学理论依据。

参 考 文 献

1 Zhu MS (朱明生), Song DX, Li TH. A new species of the family theraphosidae, with taxonomic study on the species

Selenocosmia hainana (Arachnida: Araneae). *J Baoding Teach Coll* (保定师范专科学校学报) 2001; 14(2): 1-6 (Chinese, English abstract).

- 2 Zeng XZ, Deng MC, Lin Y, Yuan CH, Pi JH, Liang SP. Isolation and characterization of Jingzhaotoxin-V, a novel neurotoxin from the venom of the spider *Chilobrachys jingzhao*. *Toxicon* 2007; 49(3): 388-399.
- 3 Jackson MB, Konnerth A, Augustine GJ. Action potential broadening and frequency-dependent facilitation calcium signals in pituitary nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(2): 380-384.
- 4 Middleton RE, Warren VA, Kraus RL, Hwang JC, Liu CJ, Dai G, Brochu RM, Kohler MG, Gao YD, Garsky VM, Bogusky MJ, Mehl JT, Cohen CJ, Smith MM. Two tarantula peptides inhibit activation of multiple sodium channels. *Biochemistry* 2002; 41(50): 14734-14747.
- 5 Takahashi H, Kim JI, Min HJ, Sato K, Swartz KJ, Shimada I. Solution structure of hanatoxin1, a gating modifier of voltage-dependent K⁺ channels: common surface features of gating modifier toxins. *J Mol Biol* 2000; 297(3): 771-780.
- 6 Chagot B, Escoubas P, Villegas E, Bernard C, Ferrat G, Lazdunski M, Durbon H. Solution structure of Phrixotoxin 1, a specific peptide inhibitor of Kv4 potassium channels from the theraphosid spider *Phrixotrichus auratus*. *Protein Sci* 2004; 13(5): 1197-1208.
- 7 Robinson JM, Kosolapov A, Deutsch C. Tertiary and quaternary structure formation of voltage-gated potassium channels. *Methods Mol Biol* 2006; 337: 41-52.
- 8 Bosmans F, Rash L, Zhu S, Diochot S, Lazdunski M, Escoubas P, Tytgat J. Four novel Tarantula toxins as selective modulators of voltage-gated sodium channel subtypes. *Mol Pharmacol* 2006; 69(2): 419-429.
- 9 Vacher H, Diochot S, Bougis PE, Martin-Eauclaire MF, Mourre C. Kv4 channels sensitive to BmTX3 in rat nervous system: autoradiographic analysis of their distribution during brain ontogenesis. *Eur J Neurosci* 2006; 24(5): 1325-1340.