

ОГЛАВЛЕНИЕ

БЛАГОДАРНОСТИ	8
ПРЕДИСЛОВИЕ	9
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	11
1. РАЗНООБРАЗИЕ И СТРУКТУРА ИОННЫХ КАНАЛОВ	14
1.1. Концепция ионных каналов	14
1.2. Строение ионных каналов.....	15
1.3. Принципы наименования и классификации ионных каналов	16
1.4. Механизмы управления ионными каналами	18
1.5. Эволюция ионных каналов	19
1.6. Потенциал-зависимые (ПЗ) каналы	25
1.7. Лиганд-зависимые (ЛЗ) каналы.....	26
1.8. Фотозависимые ионные каналы	29
2. ИОННЫЕ КАНАЛЫ И ПАТОЛОГИЯ.....	32
2.1. Заболевания нервной системы.....	32
2.1.1. Эпилепсия.....	33
2.1.2. Рассеянный склероз.....	35
2.1.3. Эпизодические атаксии	35
2.2. Мышечные и нервно-мышечные заболевания.....	36
2.2.1. Миотония.....	36
2.2.2. Периодический гиперкалиемический паралич.....	36
2.2.3. Миастенический синдром.....	36
2.3. Каналопатии сердечной мышцы.....	37
2.3.1. Синдром удлиненного интервала QT (LQTS).....	37
2.3.2. Синдром укороченного интервала QT (SQTS).....	39
2.3.3. Синдром Бругада	40
2.4. Ионные каналы и канцерогенез.....	41
2.5. Участие ионных каналов в развитии диабета и гиперинсулинемии	42
3. РЕНТГЕНОСТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ	44
3.1. Получение кристаллов белка	44
3.2. Кристаллизация ионных каналов	49
3.3. Методы белковой инженерии для оптимизации условий кристаллизации	50
3.4. Сбор дифракционных данных с использованием микрористаллов	50

4. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ЯМР- И ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИОННЫХ КАНАЛОВ.....	54
4.1. Применение методов спектроскопии ЯМР для исследования белковых молекул	55
4.1.1. Основы метода спектроскопии ЯМР	55
4.1.2. Химический сдвиг	59
4.1.3. Межъядерные взаимодействия и многомерная спектроскопия ЯМР	62
4.1.4. Расчет пространственной структуры по данным ЯМР	65
4.1.5. Диапазон применимости методов ЯМР высокого разрешения	69
4.1.6. Исследование внутримолекулярной динамики белков методом ЯМР	71
4.1.7. Особенности исследования мембранных белков методом ЯМР-спектроскопии высокого разрешения	72
4.1.8. Методы ЯМР-спектроскопии твердого тела для исследования мембранных белков	75
4.2. Структурные исследования ионных каналов методами ЯМР- и ЭПР-спектроскопии	76
4.2.1. Ионные каналы, образованные пептидами	76
4.2.2. Ионный канал M2 вируса гриппа А	79
4.2.3. Порины — ионные каналы, имеющие структуру β -бочонка.....	82
4.2.3.1. Канал OmpX из внешней мембраны <i>Escherichia coli</i>	82
4.2.3.2. Канал VDAC-1 внешней мембраны митохондрий	85
4.2.3.3. Структура порина OmpG по данным ЯМР-спектроскопии твердого тела.....	85
4.2.4. Исследование Na ⁺ и K ⁺ каналов, содержащих P-петлю методами ЭПР- и ЯМР-спектроскопии	86
4.2.4.1. Структура и динамика канала KcsA по данным ЭПР- и ЯМР-спектроскопии.....	87
4.2.4.2. Взаимодействие химерных каналов на основе KcsA с токсинами блокаторами из ядов скорпионов.....	89
4.2.4.3. Структура и динамика потенциалозависимого канала KvAP по данным ЭПР-спектроскопии	91
4.2.4.4. Структура и динамика изолированного ПЧД канала KvAP по данным ЯМР	92
4.2.4.5. Исследование изолированных ПЧД канала Nav1.4 человека методом ЯМР-спектроскопии	92
5. БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ, ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ИОННЫХ КАНАЛОВ В РАЗЛИЧНЫХ СИСТЕМАХ	96
5.1. Экспрессия генов ионных каналов в <i>E. coli</i>	96
5.2. Экспрессия генов в <i>P. pastoris</i>	102
5.3. Экспрессия генов в клетках насекомых	106
5.4. Экспрессия генов в <i>L. tarentolae</i>	107
5.5. Экспрессия генов в клетках млекопитающих	108
5.6. Бесклеточные белоксинтезирующие системы	110

6. МЕМБРАНОМОДЕЛИРУЮЩИЕ СРЕДЫ ДЛЯ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ИОННЫХ КАНАЛОВ	119
6.1. Экспрессия и рефолдинг мембранных белков	119
6.2. Мицеллы	122
6.3. Бицеллы	126
6.4. Липосомы и фосфолипидные везикулы	128
6.5. Липид-белковые нанодиски (ЛБН).....	129
6.5.1. Аполипопротеин А1 человека	129
6.5.2. Реконструированные частицы липопротеинов высокой плотности или липид-белковые нанодиски	131
6.5.3. Зависимость диаметра нанодисков от липидного состава.....	134
6.5.4. Практические аспекты приготовления ЛБН/белковых комплексов	134
6.5.5. ЯМР-спектроскопия высокого разрешения ионных каналов и их доменов в составе ЛБН	136
6.5.6. ЛБН как «среда сравнения» для скрининга детергент-содержащих мембраномоделирующих сред при ЯМР-исследованиях МБ	138
6.5.7. Применение ЛБН разного размера для решения задач структурной биологии	140
6.5.8. Возможность прямых структурных ЯМР-исследований комплексов МБ/ЛБН, полученных в результате бесклеточного синтеза	142
6.5.9. Применение ЛБН для ренатурации ионных каналов	142
6.6. Амфиболы	143
6.7. Амфифильные SMA полимеры, как новая мембраномоделирующая среда	148
7. МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ В ИЗУЧЕНИИ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИИ ИОННЫХ КАНАЛОВ	150
7.1. Моделирование по гомологии	150
7.1.1. Получение структурных моделей комплексов ионных каналов с токсинами методами моделирования по гомологии	155
7.2. Моделирование молекулярной динамики.....	156
7.2.1. Моделирование динамики тетрамерных ионных каналов Kv2.1 в открытой и закрытой конформациях.....	158
7.3. Моделирование броуновской динамики	160
7.4. Метод Монте-Карло.....	160
7.5. Моделирование молекулярного докинга	162
7.5.1. Алгоритмы молекулярного докинга.....	165
7.5.2. Визуализация решений докинга и анализ взаимодействий.....	169
7.5.3. Применение метода молекулярного докинга	169
7.5.3.1. Связывание с низкомолекулярными соединениями.....	169
7.5.3.2. Связывание с пептидными блокаторами	173
7.6. Методы оценки энергии взаимодействия ионных каналов с ионами, блокаторами и токсинами	176
7.6.1. Понятие свободной энергии	177
7.6.2. Метод потенциала средней силы.....	178

7.6.3. Метод зонтичной выборки для оценки профиля свободной энергии	179
7.6.4. Применение методов расчёта энергии взаимодействия	180
7.6.5. Метод ММ-PBSA	183
8. ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ И ПОЛУЧЕНИЕ ТРЁХМЕРНЫХ РЕКОНСТРУКЦИЙ ИОННЫХ КАНАЛОВ	184
8.1. Основные системы электронного микроскопа	184
8.2. Подготовка образцов	187
8.2.1. Объектные сетки и пленки-подложки	187
8.2.2. Негативное контрастирование – преимущества и недостатки	189
8.2.3. Крио-микроскопия	190
8.3. Радиационное повреждение образца	192
8.4. Получение и обработка изображений для создания трёхмерной реконструкции	197
8.4.1. Контраст и его корректировка на изображениях	197
8.4.2. Сборка частиц с микрографии	201
8.4.3. Классификация частиц	202
8.4.4. Построение начальной 3D модели	204
8.4.5. Улучшение начальной модели	206
8.5. Валидация ПЭМ структуры	208
8.6. Двумерная кристаллизация ионных каналов	210
8.6.1. Методы кристаллизации мембранных белков	211
8.6.2. Пробоподготовка двумерных кристаллов	212
8.6.3. Съёмка двумерных кристаллов	214
8.6.4. Обработка данных	216
8.7. Интерпретация трёхмерной структуры	219
8.7.1. Фиттинг кристаллической структуры	219
8.7.2. Мечение антителами или иммуномечение	223
8.7.3. Мутагенез	224
8.7.4. Кластеризация и образование комплексов	224
8.7.5. Мечение наночастицами золота	224
9. ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ИОННЫХ КАНАЛОВ	226
9.1. Прямая регистрация ионных токов	226
9.1.1. Метод фиксации потенциала	226
9.1.2. Метод локальной фиксации потенциала (patch-clamp)	228
9.1.3. Конфигурации метода локальной фиксации потенциала	230
9.1.4. Локальная фиксация потенциала <i>in vivo</i>	233
9.1.5. Метод локальной фиксации потенциала с флуориметрией	234
9.1.6. Планарный patch-clamp: автоматизация и высокопроизводительные измерения	236
9.2. Оптическая электрофизиология	238

10. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЯМ ИОННЫХ КАНАЛОВ	241
10.1. Оптогенетика	241
10.1.1. Функциональные исследования оптогенетических инструментов	242
10.1.2. Родопсины как инструменты оптогенетики	243
10.2. Флуоресцентные методы поиска блокаторов калиевых каналов	244
10.2.1. Лиганды Kv-каналов как перспективные фармацевтические средства	244
10.2.2. Методы поиска и анализа блокаторов каналов	245
10.2.3. Создание гибридных белков KcsA-Kv1.x — структурных аналогов порового домена Kv1-каналов	246
10.2.4. Биоинженерные клеточные аналитические системы	247
10.2.4.1. Принцип и преимущества клеточных систем	247
10.2.4.2. Экспрессия гибридных белков KcsA-Kv1.x и получение сферопластов	249
10.2.4.3. Процедура формирования, измерения и анализа комплексов R-AgTx2 с гибридными белками на поверхности сферопластов	251
10.2.4.4. Изучение особенностей образования комплексов R-AgTx2 с KcsA-Kv1.x (x=1,3,6)	252
10.2.4.5. Оптимизация экспрессии и мембранной презентации KcsA-Kv1.6	257
10.2.4.6. Аналитические применения клеточных систем на основе KcsA-Kv1.x	259
10.3. Перспективы структурных и динамических экспериментов с единичными биомакромолекулярными объектами с использованием рентгеновских лазеров	262
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	267
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	268

Предисловие

Предлагаемая научной общественности монография посвящена методам определения структуры ионных (в основном катионных) каналов. Это достаточно обширный и функционально значимый класс мембранных белков, который играет важнейшую роль в регуляции физиологического состояния клетки. Так, например, геном человека включает более 90 генов, которые кодируют основные субъединицы калиевых каналов.

Интерес к пространственной структуре ионных каналов резко вырос после пионерских работ Р. МакКиннона по кристаллизации и определению в 1998 г. методами рентгеноструктурного анализа пространственной структуры бактериального калиевого канала KcsA и установления причины его селективности. Эти работы были удостоены Нобелевской премии по химии 2003 г. (совместно с П. Агре). Ионные каналы являются типичными мишенями при разработке широкого спектра лекарственных средств, например, блокаторов ионных каналов.

С нарушениями в работе ионных каналов ассоциирован целый ряд патологий нервной и сердечно-сосудистой систем человека. Нарушения в работе каналов связаны также и с рядом онкологических заболеваний. Так, потенциал-зависимые калиевые каналы (наиболее обширная группа, которая кодируется порядка 40 генами) осуществляют регуляторную роль в функционировании возбудимых клеток, регуляции апоптоза, процессах клеточного роста и дифференцировки, выделении гормонов, нейротрансмиттеров и др. В этом отношении понятен живейший интерес к структурам ионных каналов не только специалистов в области структурной биологии, молекулярной биофизики, протеомики, но и фармакологов и специалистов, которые развивают новые направления персонифицированной медицины.

В отечественной литературе до настоящего времени не было монографий с систематическим изложением проблем и методов изучения структуры ионных каналов, хотя вклад российских ученых в изучение отдельных типов каналов весьма значительный. Человеческие ионные каналы, как правило, не кристаллизуются или очень плохо кристаллизуются. В этой связи для изучения их пространственной структуры широко используются методы ЯМР и крио-электронной микроскопии. В перспективе, несомненно, интерес будут представлять методы нанокристаллографии и эксперименты с единичными молекулами с использованием рентгеновских лазеров на свободных электронах. Изучение пространственной структуры ионных каналов дало толчок и к развитию новых экспериментальных платформ для изучения мембранных белков. Речь идет о нанодисках (фрагментах липидного бислоя, стабилизированного специальным белком) и липодисках (получаемых при обработке мембран клеток сополимером стирола и малеиновой кислоты). Эти технологии интересны и сами по себе как пример самоорганизации достаточно сложных биомиметических структур за счет баланса взаимодействий заряженных групп и сил, ответственных за гидрофобные взаимодействия.

При обработке получаемой структурной информации важнейшую роль играют методы молекулярного моделирования. Эти методы получили в последние годы очень широкое развитие и без них невозможно представить современную структурную биологию. Эти методы играют все большую самостоятельную роль. Широкое распространение получили методы моделирования пространственной структуры по гомологии. Методы молекулярной динамики позволяют подробнейшим образом с атомным разрешением рассматривать функционирование ионных каналов и количественно изучать пространственные и энергетические характеристики процесса, предсказывая результаты инженерии аминокислотного интерьера канала. Эти методы дают детальнейшую информацию о структуре и энергетике взаимодействия каналов с лигандами и блокаторами, что открывает новые возможности для разработки препаратов для персонифицированной медицины.

В целом, предлагаемая вниманию монография, несомненно, будет полезна широкому кругу исследователей в областях современной науки, имеющих отношение к мембранным белкам, рецепторам, каналам, методам структурной биологии и молекулярного моделирования.

*академик РАН М.П. Кирпичников,
проф. К.В. Шайтан*