

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ ИОННЫХ КАНАЛОВ



СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ СТРУКТУРЫ И ФУНКЦИЙ ИОННЫХ КАНАЛОВ

**Товарищество научных изданий КМК
Москва ❖ 2020**

УДК 577.352.3.01

ББК 28.071

C59

Современные методы изучения структуры и функций ионных каналов. / О.С. Соколова (отв. ред.). Москва: Товарищество научных изданий КМК. 2020. 316 с., ил.

Авторы: Соколова О.С., Кирпичников М.П., Шайтан К.В., Антонов М.Ю., Волинцева А.Д., Глухов Г.С., Горделий В.И., Деркачева Н.И., Карлова М.Г., Кузьмичёв П.К., Люкманова Е.Н., Моисеенко А.В., Мышкин М.Ю., Некрасова О.В., Новоселецкий В.Н., Охрименко И.С., Парамонов А.С., Попинако А.В., Станишчева-Коновалова Т.Б., Трифонова Е.С., Феофанов А.В., Чупин В.В., Шевцов М.Б., Шенкарёв З.О.

Ионные каналы обнаружены во всех тканях живых организмов, где они выполняют самые разнообразные функции: участвуют в поддержании потенциала покоя и реполяризации мембраны возбудимых клеток, в обеспечении сердечной деятельности, при выделении нейромедиаторов, в секреции гормонов. В невозбудимых клетках ионные каналы участвуют в процессах поддержания баланса электролитов почечным эпителием, гиперполяризации В и Т клеток при иммунном ответе, в процессах регуляции апоптоза, клеточной дифференцировки и роста и многих других процессах. В связи с таким разнообразием функций каналов, дефекты в их работе вызывают множество патологических состояний: неврологические расстройства сердечную аритмию, рассеянный склероз, болевой синдром и др. Доказана связь некоторых каналов с процессами возникновения и развития раковых опухолей. Одними из наиболее острых состояний, вызываемых дефектами калиевых каналов, являются нарушения сердечного ритма и неврологические расстройства. Наличие точных пространственных структур ионных каналов является предпосылкой для понимания механизмов их функционирования на атомном уровне. Монография посвящена современным методам изучения структуры и функций ионных каналов, включая структурные, электрофизиологические методы и молекулярное моделирование.

Рекомендована для студентов старших курсов по специальности “биофизика” и научных сотрудников.

Modern methods of studying the structure and functions of ion channels. / O.S. Sokolova (Editor-in-Chief). Moscow: KMK Scientific Press. 2020. 316 p.

Ion channels are found in all tissues of living organisms, where they perform a variety of functions: they participate in maintaining the resting potential and repolarization of the membrane of excitable cells, in supporting cardiac activity, in the release of neurotransmitters, and in the secretion of hormones. In non-excitable cells, ion channels participate in processes of maintaining an electrolyte balance by renal epithelium, hyperpolarization of B and T cells, during mitogenesis, and proliferation, during the immune response, in the regulation of apoptosis, cell differentiation and growth, and many other processes. Due to such a variety of channel functions, defects in their work cause many pathological conditions: neurological disorders, cardiac arrhythmia, multiple sclerosis, pain syndrome, etc. Some channels have been proved to be connected with the processes of the onset and the development of cancer tumors. One of the most acute conditions caused by defects in potassium channels are cardiac rhythm disorders and neurological disorders. The presence of accurate spatial structures of ion channels is a prerequisite for the understanding of the mechanisms of their functioning at an atomic level. This monograph is devoted to the discussion of modern methods of studying the structure and functions of ion channels, including structural, electrophysiological methods and molecular modeling. This text is recommended for senior students in the field of “biophysics” and scholars.

*Издание осуществлено при финансовой поддержке Российского фонда
фундаментальных исследований по проекту № 19-14-00025,
не подлежит продаже*



© Коллектив авторов, текст, подбор иллюстраций, 2020

© Неверова А.Л., обложка, 2020

© ООО «Товарищество научных изданий КМК», издание, 2020

ISBN 978-5-907213-43-2

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 атаки	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. Амфилолы	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