

На правах рукописи



Кудряшова Ксения Сергеевна

**РАЗРАБОТКА ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СИСТЕМЫ
ПОИСКА БЛОКАТОРОВ ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ
КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВА Kv1**

Специальность 03.01.02. – “биофизика”

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2015

Работа выполнена на кафедре биоинженерии Биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Научный руководитель:

Феофанов Алексей Валерьевич,

доктор биологических наук, заведующий лабораторией оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН,
профессор кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты:

Сури́н Александр Михайлович,

доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник,
Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» Российской академии медицинских наук, лаборатория патологии ионного транспорта и внутриклеточной сигнализации

Камнев Александр Анатольевич,

доктор химических наук, ведущий научный сотрудник, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук (офиц. сокращ. - ИБФРМ РАН), лаборатория биохимии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук

Защита диссертации состоится «26» февраля 2015 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 Биологического факультета Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.73, аудитория «Новая».

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского Государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Проблема связи структуры и функции белков и их комплексов имеет множество аспектов. Одним из актуальных направлений современной биофизики является изучение структуры и свойств ионных каналов и их комплексов с блокаторами.

В диссертации рассматриваются потенциал-чувствительные калиевые каналы семейства Kv1 – порообразующие транспортные белки, которые регулируют проницаемость мембраны для ионов калия в ответ на изменение мембранного потенциала. Каналы семейства Kv1 широко представлены в организме человека и выполняют разнообразные функции, включая поддержание потенциала покоя в невозбудимых клетках, частоту потенциала действия в возбудимых клетках, а также участвуют в кальциевой сигнализации, регуляции объема, секреции, пролиферации и миграции клеток. Неудивительно, что обнаружено множество заболеваний, связанных с нарушениями структуры и нормального функционирования каналов Kv1.

Так, например, канал Kv1.1 экспрессируется в клетках центральной нервной системы, мутации канала ассоциированы с нейрональными отклонениями. Канал Kv1.6 присутствует в легочной артерии, а его пониженная экспрессия – один из симптомов легочной гипертензии. Канал Kv1.3 типичен для клеток иммунной системы. Показано, что экспрессия канала Kv1.3 в мембране Т-лимфоцитов возрастает у больных аутоиммунными заболеваниями, астмой, пародонтозом. Блокаторы канала Kv1.3, подавляют Т-клеточную пролиферацию и препятствуют развитию симптомов перечисленных заболеваний. Примечательно, что наблюдаемый положительный эффект не сопровождается нарушениями работы иммунной системы в целом, поскольку мишенью действия блокаторов является только узкая субпопуляция Т-клеток, экспрессирующих канал Kv1.3.

Необходимость совершенствования молекулярных инструментов изучения функционирования и физиологической роли Kv1-каналов в норме и патологии, а также их терапевтическая значимость делают актуальной разработку новых биофизических методов и подходов, обеспечивающих удобный направленный поиск высокоаффинных и селективных модуляторов этих каналов. Традиционно взаимодействие лигандов с ионными каналами исследуют при помощи электрофизиологического (технология patch-clamp) и радиолигандного методов анализа. Электрофизиологический метод по праву считается “золотым стандартом” изучения работы ионных каналов. На основе этого метода созданы высокопроизводительные системы скрининга, но они дороги и имеют ряд ограничений для использования. Радиолигандный метод позволяет выявить и количественно оценить связывание лигандов с различными рецепторами, но требует особых условий работы с радиоактивными материалами. Современная безопасная альтернатива традиционным методам – это флуоресцентные методы анализа.

Информативность флуоресцентных методов изучения каналов семейства Kv1 была продемонстрирована с применением методов проточной цитометрии, флуоресцентной микроскопии одиночных молекул и оценки изменения мембранного потенциала с помощью флуоресцентных красителей в планшетном формате. Новые уникальные возможности открывает комбинированное применение современных методов флуоресцентной микроскопии и клеточной биоинженерии, но эти технологии применительно к Kv1-каналам пока практически не разработаны.

Цели и задачи работы. Цель работы заключалась в разработке клеточных систем для поиска и изучения лигандов потенциал-чувствительных калиевых каналов семейства Kv1. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1) Разработать на основе флуоресцентной лазерной сканирующей конфокальной микроскопии (ЛСКМ) методику анализа взаимодействий лигандов калиевых каналов Kv1.x с гибридными белками KcsA-Kv1.x в составе мембраны сферопластов *E.coli* с возможностью измерения констант диссоциации комплексов.

2) Разработать состав клеточных систем для поиска и изучения лигандов каналов Kv1.x (x=1,3,6) и протоколы подготовки их компонентов к измерениям.

3) Охарактеризовать специфичность взаимодействия клеточных систем с известными лигандами каналов Kv1.x (x=1,3,6), измерив константы диссоциации образующихся комплексов.

4) Апробировать разработанные клеточные системы с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) для поиска высокоаффинных пептидных лигандов Kv1-каналов в ядах животных.

5) Провести анализ структурных особенностей, определяющих функционально важную избирательность и высокую аффинность взаимодействия пептидных лигандов с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6).

Научная новизна. Разработанные в диссертации методики являются оригинальными, а все результаты исследований получены впервые.

На основе современных биофизических методов анализа и методов биоинженерии разработаны оригинальные клеточные системы для поиска и исследования лигандов каналов Kv1.x (x=1,3,6), а также методики измерения констант комплексообразования этих лигандов.

Установлена роль межмолекулярных взаимодействий с участием конкретных функциональных групп при связывании пептидных лигандов с участком S5-P-линкера каналов Kv1.x (x=1,3,6).

Клеточные системы были применены для поиска новых Kv1-лигандов в цельных ядах животных. В ядах змей 3 видов впервые установлено присутствие компонентов, способных связываться с поровой частью каналов Kv1.1 и Kv1.3. В яде скорпиона *H. laoticus* впервые найден хетлаксин, пептидный лиганд Kv1.3 канала с активностью в наномолярном диапазоне концентраций. В яде скорпиона *B. eurus* обнаружено 6 новых блокаторов каналов Kv1 в дополнение к 3 опубликованным ранее в литературе. Впервые дана количественная оценка функциональной активности ряда новых токсинов.

Практическая значимость. Разработанные методы анализа и клеточные системы могут быть использованы в различных биофизических исследовательских лабораториях и фармакологических компаниях для поиска и изучения свойств лигандов эукариотических калиевых каналов семейства Kv1. Они являются простой и удобной альтернативой более трудоемкому методу patch-clamp и небезопасному методу радиолигандного анализа. В комбинации с планшетными технологиями и автоматизированным анализом разработанные клеточные системы применимы для высокопроизводительного скрининга соединений.

Новые клеточные системы активно используются на практике в исследованиях компонентов ядов животных, проводимых лабораторией нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН и лабораторией молекулярной токсикологии ИБХ РАН.

Высокоспецифичные лиганды Kv1-каналов, обнаруженные с помощью разработанных клеточных систем, могут быть использованы как новые молекулярные инструменты исследования функциональной роли каналов Kv1.x, структурно-функциональных особенностей блокаторов этих каналов, а также, как компоненты библиотеки лигандов при разработке лекарственных средств для лечения ряда аутоиммунных заболеваний.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на I международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (Москва, 2010); научной конференции по биоорганической химии и биотехнологии “X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова” (Москва-Пушино, 2011); IV Съезде биофизиков России (Нижний Новгород, 2012); VI Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Уфа, 2013); 38-ом Конгрессе Федерации европейских биохимических обществ (Санкт-Петербург, 2013); 9-ом Европейском биофизическом конгрессе (Лиссабон, Португалия, 2013); международной конференции по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященной 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 2014).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, включая 3 статьи в рецензируемых научных журналах.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав и заключения. Список цитированной литературы содержит 210 наименований. Работа изложена на 142 страницах и содержит 8 таблиц и 38 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен обзор литературы, посвященный трем основным темам: 1) особенностям строения и функционирования каналов семейства Kv1; 2) характеристикам основных групп блокаторов каналов (пептидной и не пептидной природы); 3) биофизическим методам поиска и исследования новых блокаторов.

В обзоре литературы показано, что несмотря на успехи в развитии биофизических методов изучения лигандов мембранных белков и, в частности, ионных каналов, поиск новых блокаторов Kv1-каналов и анализ лиганд-рецепторных взаимодействий остается сложной научной задачей. Актуальность этой задачи определяется участием каналов Kv1 в патогенезе целого ряда аутоиммунных, метаболических и нейрофизиологических заболеваний.

Из анализа литературы следует, что модуляторы работы каналов присутствуют в различных природных субстанциях растительного и животного происхождения, а также могут быть синтезированы искусственным путем. Наиболее активными и высокоспецифичными лигандами каналов Kv1 являются лиганды пептидной природы,

и в настоящее время их рассматривают в качестве потенциальных терапевтических средств нового поколения.

Во второй главе перечислены применявшиеся в работе реактивы, описаны составы растворов, приведены протоколы подготовки образцов к измерениям.

Клонирование и экспрессия гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6)

Плазмидные ДНК, содержащие гены белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), были получены к.б.н. О.В. Некрасовой (группа нанобиоинженерии ИБХ РАН). Для определения оптимальных условий экспрессии гибридных белков в штамме *E. coli* BL21(DE3) варьировали параметры: состав культуральной среды, концентрацию индуктора (ИПТГ), температуру и время выращивания. Уровень экспрессии белка детектировали путем разделения белков клеточного лизата электрофорезом в денатурирующем 13,5% полиакриламидном геле (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли.

Приготовление сферопластов из клеток *E. coli*

Клетки *E. coli* обрабатывали раствором лизоцима (10 мкг/мл) в буфере 10 мМ Трис-НСl, рН 8, 0,5 М сахарозы в течение 7 мин, разбавляли в 2 раза буфером 10 мМ Трис-НСl, рН 8, 0,6 мМ ЭДТА, инкубировали еще 15-17 мин и добавляли MgCl₂ (10 мМ).

Подготовка образцов для измерения констант диссоциации комплексов лигандов с KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе мембраны сферопластов

Суспензию сферопластов разбавляли в буфере состава 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,25 М сахараза, 0,3 мМ ЭДТА, 4 мМ KCl, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1% БСА и инкубировали с исследуемыми компонентами 1 ч при 20-23°C. Клетки осаждали центрифугированием на стеклянное дно специальных микро-кювет и переносили под микроскоп для анализа.

При измерении константы связывания гибридных белков с R-AgTx2 сферопласты инкубировали с возрастающей концентраций R-AgTx2. При измерении кажущихся констант диссоциации (K_{ap}) немеченых лигандов сферопласты инкубировали с фиксированной концентрацией R-AgTx2 и возрастающей концентрацией лигандов.

Методика поиска лигандов каналов Kv1.x в ядах животных

Сферопласты смешивали с R-AgTx2 и растворенными в воде навесками ядов (или их фракций) и анализировали способность компонентов ядов конкурировать с R-AgTx2 за связывание с KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). В качестве положительного контроля использовали конкурентное вытеснение R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.x немечеными Kv1-лигандами AgTx2 или OSK1. В качестве отрицательного контроля вместо ядов или их компонентов к сферопластам добавляли эквивалентное количество воды.

Цельные яды 19 видов пауков, 6 видов скорпионов и секрет жабы были предоставлены для исследований коллегами из Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН.

Яд скорпиона *Heterometrus laoticus* и змей 7 видов были предоставлены д.х.н. Ю.Б. Уткиным (лаборатория молекулярной токсикологии ИБХ РАН)

Измерения методом конфокальной микроскопии и анализ данных

Изображения зон образца размером 146×146 мкм получали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM710 META (Zeiss, Германия) и 63-кратного масляно-иммерсионного объектива α Plan-Apochromat с числовой апертурой 1,46. Полученные флуоресцентные изображения обрабатывали при помощи программы ImageJ (National Institute of Health, США). Определяли среднюю по площади клетки интенсивность флуоресценции, которая пропорциональна количеству R-AgTx2 в комплексах с гибридными белками на поверхности сферопластов. С использованием выборки данных, полученных не менее, чем от 120 клеток, для каждого измерения с учетом нормировки на мощность лазера рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции R-AgTx2 на мембране клеток I_{cp} и стандартное отклонение этого значения.

Третья глава содержит изложение и обсуждение результатов исследования.

Схема работы клеточных систем для поиска и изучения блокаторов Kv1-каналов включает следующие основные этапы (рис. 1): (1) экспрессию гибридных белков KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$) в составе мембраны бактерий *E. coli*; (2) приготовление сферопластов из клеток *E. coli* путем удаления клеточной стенки без повреждения мембраны; (3) измерение концентрационной зависимости связывания флуоресцентно-меченного лиганда R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$) на поверхности сферопластов с целью определения констант диссоциации комплексов R-AgTx2 с KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$); (4) измерение концентрационной зависимости конкурентного связывания флуоресцентно-меченного лиганда R-AgTx2 и исследуемого соединения с гибридными белками KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$) на поверхности сферопластов с целью подтверждения способности данного соединения связываться с KcsA-Kv1.x и определения аффинности этих взаимодействий.

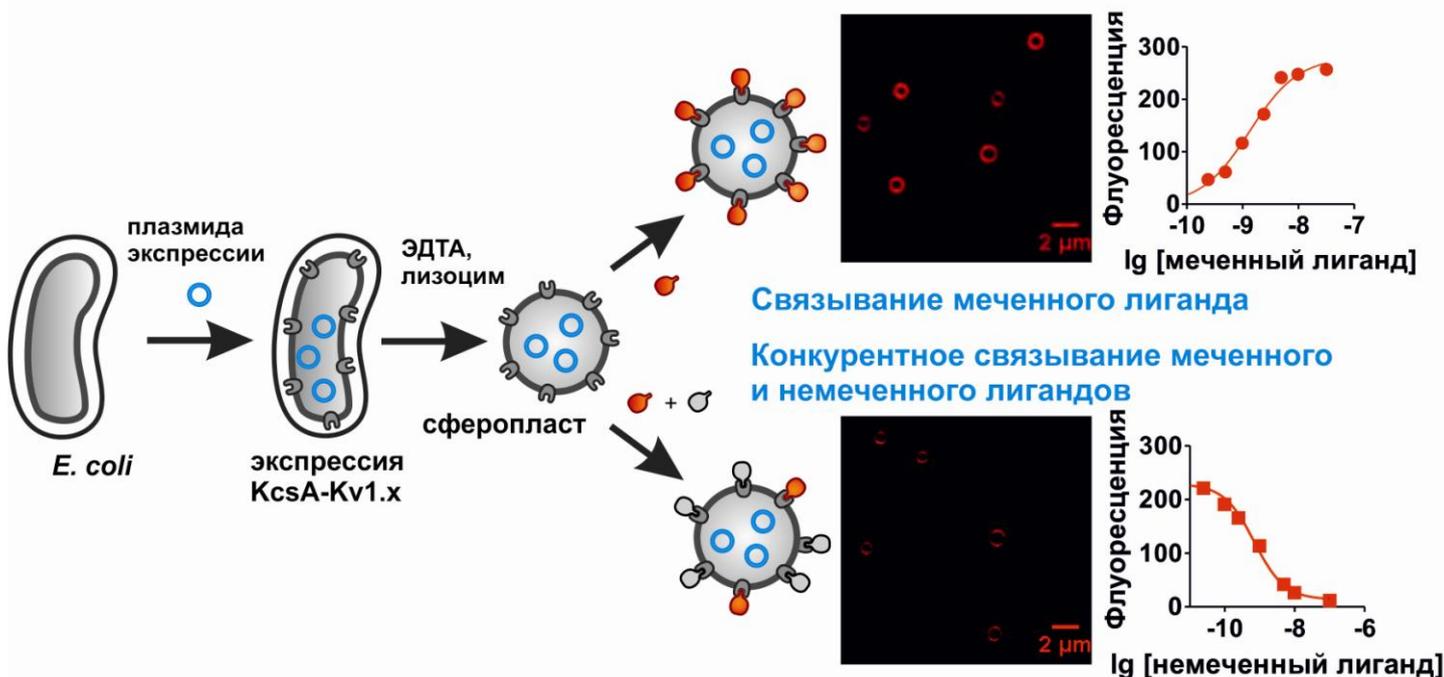


Рис. 1. Общая схема методики анализа взаимодействий лигандов каналов Kv1.x ($x=1,3,6$) с гибридными белками KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$) в составе мембраны сферопластов на примере белка KcsA-Kv1.3.

Разрабатываемые клеточные системы включают в себя: (1) компоненты системы (клетки, экспрессирующие KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), раствор для приготовления сферопластов, буфер для проведения измерений, флуоресцентно-меченный лиганд); (2) протоколы приготовления сферопластов, подготовки клеток к измерениям и проведения измерений; (3) методику измерения и анализа взаимодействий лигандов с KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе клеточной мембраны.

1. Разработка флуоресцентной методики измерения и анализа взаимодействия лигандов с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) на поверхности мембраны сферопластов

Детекция образования комплексов между лигандами и гибридными белками на поверхности сферопластов осуществлялась при помощи метода ЛСКМ. Разработка флуоресцентной методики включала: (1) подбор условий регистрации сигнала от флуоресцентно-меченного лиганда при его связывании с гибридными белками на поверхности сферопластов; (2) создание протокола анализа получаемых изображений для определения количественных характеристик связывания немеченных лигандов по методу конкурентного ингибирования.

1.1. Подбор условий детекции взаимодействия R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в составе мембраны сферопластов методом ЛСКМ

В качестве флуоресцентно-меченного лиганда в работе использовали агитоксин-2 (AgTx2), меченный 5(6)-карбокситетраметилродамином (R-AgTx2). AgTx2 – высокоаффинный блокатор каналов Kv1 из яда скорпиона *L. quinquestriatus*, который связывается с поровой частью канала с наружной стороны мембраны (в соотношении 1:1) и блокирует ионный ток.

В работе показано, что R-AgTx2 эффективно связывается с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) на поверхности сферопластов. При связывании R-AgTx2 с гибридными белками происходит локальное увеличение концентрации R-AgTx2, которое выражается в появлении флуоресценции на поверхности сферопластов (рис. 1). Поверхностная флуоресценция и округлая форма клетки свидетельствуют об интактности мембраны сферопластов и являются контрольным индикатором корректной процедуры их приготовления. При правильной подготовке клеток к измерениям более 96% сферопластов, наблюдаемых в проходящем свете, интенсивно связывают на своей поверхности R-AgTx2. Детектируемого связывания R-AgTx2 со сферопластами, полученными из нетрансформированных клеток *E. coli*, а также из клеток, продуцирующих канал KcsA, не являющийся мишенью действия AgTx2, не обнаружено.

При насыщении связывания распределение сферопластов по интенсивности сигнала флуоресценции R-AgTx2, связанного с гибридными белками на мембране, подчиняется нормальному распределению. Следовательно, популяции сферопластов являются однородными по уровню экспрессии белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) на мембране и средняя по выборке клеток интенсивность флуоресценции R-AgTx2 на мембране клеток I_{cp} пропорциональна среднему количеству комплексов R-AgTx2 с гибридным белком на мембране сферопластов.

Установлено, что интенсивность флуоресценции R-AgTx2 (I_{cp}) в условиях насыщения связывания при одинаковых условиях инкубации и регистрации изображений убывает в ряду KcsA-Kv1.3 ≥ KcsA-Kv1.1 > KcsA-Kv1.6. Величина I_{cp}

отражает количество доступных для связывания гибридных белков на мембране. Представленность гибридных белков на мембране в целом согласуется с общим уровнем экспрессии KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в тотальном клеточном лизате, но эффективность встраивания этих белков в мембрану (доля экспрессированного белка, встроившегося в мембрану клеток) заметно снижается в том же ряду: KcsA-Kv1.3 >> KcsA-Kv1.1 ≥ KcsA-Kv1.6. Этот результат отражает необходимость не только оптимизации общего уровня экспрессии целевых мембранных белков в клетках *E. coli*, но и тщательного подбора условий, усиливающих встраивание этих белков в мембрану.

1.2. Разработка методики измерения констант диссоциации комплексов лигандов с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6)

На первом этапе работы была разработана методика количественной оценки связывания R-AgTx2 с гибридными белками в составе мембраны сферопластов на примере гибридного белка KcsA-Kv1.3.

Для оценки константы диссоциации (K_d) комплексов R-AgTx2 и KcsA-Kv1.3 были измерены зависимости насыщения связывания R-AgTx2 при различных концентрациях сферопластов (и соответственно KcsA-Kv1.3). Результаты представлены в виде зависимости I_{cp} от концентрации R-AgTx2 (рис. 2а).

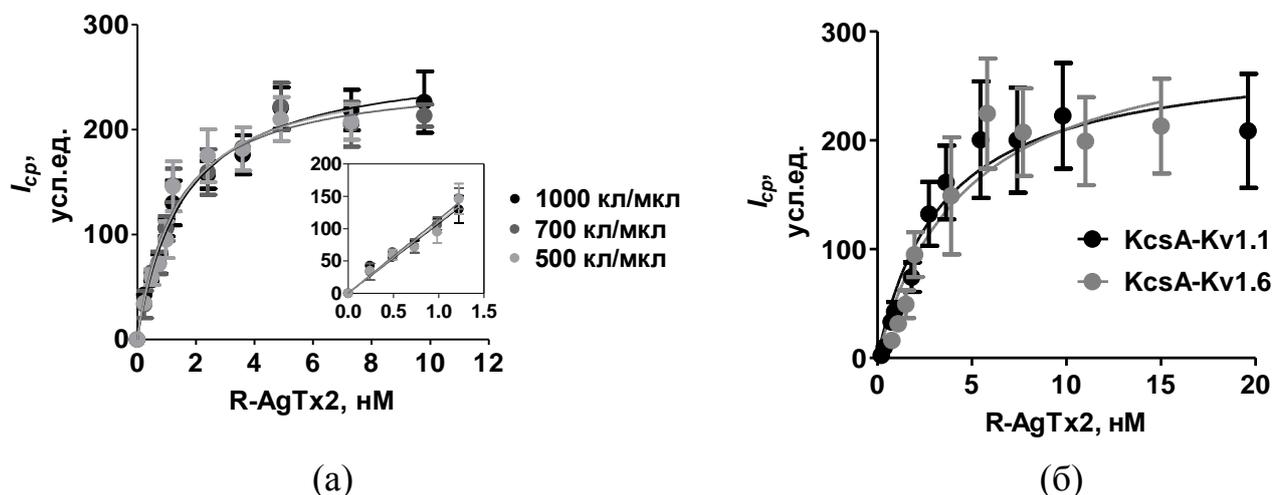


Рис. 2. Зависимости насыщения связывания R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.3 при различной концентрации сферопластов (а), а также с KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.6 (б). На вставке приведены результаты, полученные в диапазоне низких концентраций R-AgTx2 (0-1,5 нМ) (а).

Установлено, что экспериментально измеренные зависимости с высокой точностью могут быть описаны в приближении одного центра связывания функцией Хилла при помощи алгоритма нелинейной регрессии по формуле:

$$I_{cp}([L]) = (I_{max} \times [L]) / (K_d + [L]) \quad (1),$$

где I_{max} – значение параметра I_{cp} при насыщении связывания, $[L]$ – концентрация R-AgTx2, K_d – концентрация R-AgTx2, при которой интенсивность сигнала I_{cp} составляет 50% от I_{max} .

Применимость формулы (1) для описания экспериментальных данных означает, что взаимодействие между R-AgTx2 и KcsA-Kv1.3 может быть описано выражением:



и

$$K_d = ([L] - [L_b])([R] - [R_b])/[LR] \quad (3),$$

где $[L]$ и $[L_b]$ концентрации добавленного и связавшегося R-AgTx2, $[R]$ и $[R_b]$ концентрации добавленного и связавшегося KcsA-Kv1.3 соответственно, $[LR]$ концентрация образовавшихся комплексов.

Выражение (3) может быть преобразовано в (1) при соблюдении условия, что $[L] \gg [R]$ и $[LR]/[R] = I_{cp}([L])/I_{max}$. Как было показано ранее на один сферопласт приходится порядка 10^5 копий KcsA-Kv1.3. Таким образом, условия эксперимента, при котором $[L]$ варьирует в диапазоне 0,25–10 нМ, а концентрация $[R]$ равна 0,08, 0,12 или 0,17 нМ не противоречат условию $[L] \gg [R]$. Совпадение измеренных зависимостей (рис. 2а) при разных концентрациях сферопластов (500-1000 кл/мкл) подтверждает, что титрование проводилось при $[L] \gg [R]$ и поэтому не зависело от $[R]$.

Важно отметить, что даже при высокой плотности гибридных белков KcsA-Kv1.3 на мембране сферопластов не наблюдается эффекта кооперативности связывания (положительного или отрицательного), что говорит о том, что образование комплексов не влияет на способность соседних гибридных белков связывать лиганды.

В результате проведенных экспериментов была определена константа диссоциации (K_d) комплексов R-AgTx2 и KcsA-Kv1.3 равная $1,4 \pm 0,2$ нМ. Были измерены зависимости насыщения связывания R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x ($x=1,6$) и аппроксимированы согласно протоколу, разработанному на примере KcsA-Kv1.3 (рис. 2б). Значения K_d для комплексов R-AgTx2 с KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.6 составили соответственно $3,4 \pm 0,9$ нМ и $4,7 \pm 1,9$ нМ.

На втором этапе была разработана методика оценки аффинности немеченных Kv1-лигандов при измерениях методом конкурентного ингибирования связывания. Были измерены зависимости конкурентного связывания AgTx2 и R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$) (рис. 3).

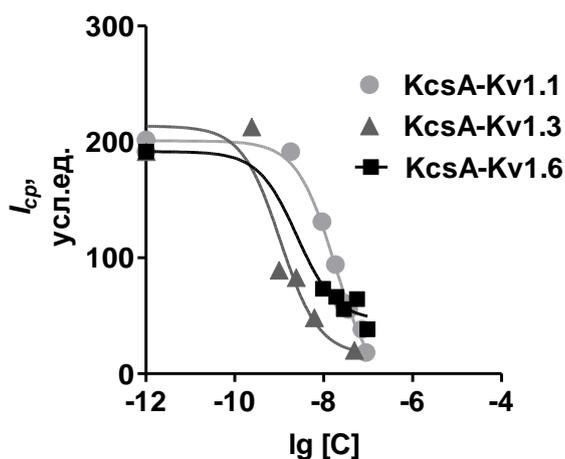


Рис. 3. Концентрационные зависимости вытеснения R-AgTx2 из комплексов с гибридными белками KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$) немеченым лигандом AgTx2. Концентрация R-AgTx2 – 9,1 нМ (KcsA-Kv1.1), 4,9 нМ (KcsA-Kv1.3) и 5,5 нМ (KcsA-Kv1.6). [C] – концентрация AgTx2, М.

Для определения концентрации AgTx2, которая приводит к вытеснению 50% R-AgTx2 из комплексов с гибридными белками (IC_{50}) экспериментальные данные аппроксимировали в приближении одного центра связывания с помощью алгоритма нелинейной регрессии по формуле:

$$I_{cp} = I_m / (1 + 10^{(\lg[C] - \lg IC_{50})}) \quad (4),$$

где C – концентрация добавленного лиганда, а I_m численно равна I_{cp} при $[C]=0$.

Для расчета кажущейся константы диссоциации (K_{ap}) конкурирующих (немеченых) лигандов использовали уравнение Ченга-Прусова:

$$K_{ap} = IC_{50} / (1 + [L^*] / K_d) \quad (5),$$

где IC_{50} – концентрация исследуемого лиганда, которая приводит к вытеснению 50% R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.3, $[L^*]$ – равновесная концентрация свободного R-AgTx2, которая при выполнении условия $[L_b] \ll [L^*]$ принимается равной концентрации добавленного R-AgTx2 ($[L]$).

По сравнению с флуоресцентно-меченым аналогом AgTx2 связывается с гибридными белками KcsA-Kv1.x ($x=3,6$) лучше соответственно в 6,7 и 3,9 раз, а с KcsA-Kv1.1 хуже в 1,3 раза; сродство к поровой части каналов убывает в ряду KcsA-Kv1.3 > KcsA-Kv1.6 > KcsA-Kv1.1. Отличия аффинности R-AgTx2 к KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$) по сравнению с AgTx2 объясняются влиянием введенной флуоресцентной метки.

2. Разработка состава и оптимизация свойств компонентов клеточных систем. Разработка протоколов подготовки компонентов к измерениям

Разработанный метод флуоресцентного анализа взаимодействия лигандов калиевых каналов Kv1 с гибридными белками в составе мембраны сферопластов был использован при создании бактериальных клеточных систем поиска и изучения лигандов Kv1-каналов. Преимуществами клеточных систем на основе сферопластов являются: простота культивирования бактериальных клеток, высокая скорость и эффективность наработки целевого белка, отсутствие необходимости выделения рецептора и за счет этого сохранение его нативной структурной организации в мембране.

2.1. Оптимизация экспрессии гибридных белков KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$) в составе мембраны *E. coli*

В основе разрабатываемых клеточных систем лежит высокоэффективная экспрессия в мембране бактерий *E. coli* гибридных белков KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$). Впервые гибридные белки KcsA-Kv1.x ($x=1-6$) были получены группой немецких ученых в 2000 году путем встраивания участка внеклеточной петли S5-S6 калиевых каналов человека Kv1.x ($x=1-6$) в гомологичный участок бактериального канала KcsA. Участок S5-S6 поровой петли калиевых каналов принимает активное участие в связывании пептидных блокаторов и отвечает за избирательность взаимодействия пептид-канал. Показано, что гибридные белки сохраняют способность связывать поровые блокаторы Kv1-каналов в составе мицелл детергента. В нашей работе мы использовали гибридные белки для создания методами биоинженерии бактериальных

линий клеток, экспрессирующих эти белки в плазматической мембране в тетрамерной форме, способной связывать лиганды Kv1-каналов. Схема конструирования гибридных конструкций и первичная последовательность пересаженных участков эукариотических каналов Kv1.x (x=1,3,6) приведены на рис. 4.

KcsA AERGAPGAQLITYPRALWWSVETATTVGYGDLYP
 KcsA-Kv1.1 AEAEAAESHFSSIPDALWWSVETATTVGYGDLYP
 KcsA-Kv1.3 AEADDPTSGFSSIPDALWWSVETATTVGYGDLYP
 KcsA-Kv1.3 AEADDDDSLFPSPDALWWSVETATTVGYGDLYP

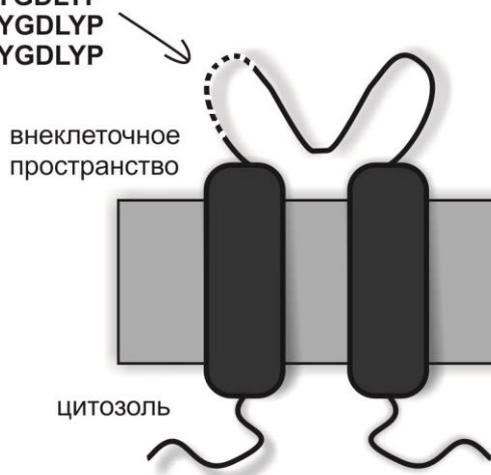


Рис. 4. Схема переноса участка Р-петли калиевых каналов человека Kv1.x (1,3,6) в гомологичный участок бактериального канала KcsA. Приведены аминокислотные последовательности участка Р-петли каналов KcsA и гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). Серым цветом выделена аминокислотная последовательность пересаженного участка, который является сайтом связывания лигандов эукариотических каналов Kv1.x (x=1,3,6).

Для экспрессии гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) полученные гены клонировали в вектор pET28a и трансформировали культуру клеток *E. coli* штамма BL21(DE3). Проведен отбор клонов с максимальным уровнем экспрессии целевых белков. Отбор клонов выполняли на основе анализа уровня биосинтеза гибридного белка методом денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле. Дополнительно для этих клонов контролировали встраивание гибридных белков в мембрану клеток по способности связывать R-AgTx2. Для этого из бактериальных клеток готовили сферопласты. Процедура включала стадии обработки исходных клеток ЭДТА и лизоцимом. Однородность приготовленных сферопластов оценивали методами оптической микроскопии. Протокол приготовления сферопластов был разработан ранее для клеток, экспрессирующих KcsA-Kv1.3. Проведенные исследования подтвердили эффективность этого протокола для клеток, экспрессирующих KcsA-Kv1.x (x=1, 6)

На основе отобранных клонов были получены штаммы продуценты со стабильным уровнем биосинтеза гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) и высокой представленностью этих белков на мембране клеток, а также определены оптимальные условия выращивания штаммов.

2.2. Изучение влияния компонентов буфера на результаты измерений связывания лигандов с гибридными белками Kv1.x (x=1,3,6)

Взаимодействия лигандов с ионными каналами модулируется множеством факторов. Мы изучили влияние компонентов клеточного буфера на связывание R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) на поверхности сферопластов.

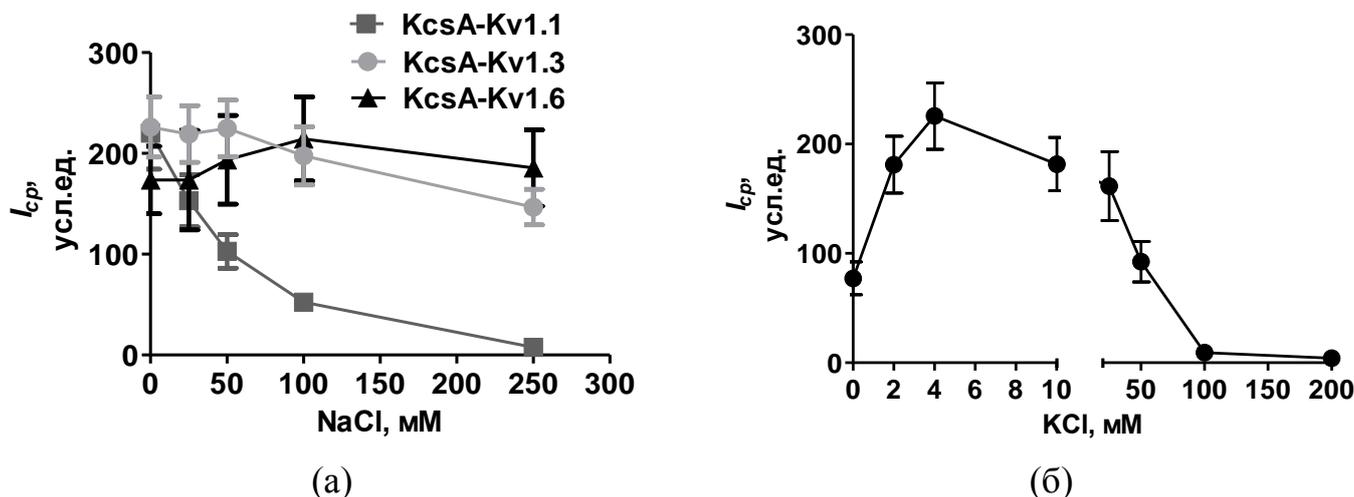


Рис. 5. Связывание R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.3 при разной концентрации NaCl (а) и KCl (б) в буфере. Измерения выполнены в условиях насыщения связывания R-AgTx2 с гибридными белками. Состав буфера: 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,25 М сахароза, 0,3 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1% БСА.

Показано, что повышение концентрации NaCl в буфере ведет к монотонному снижению максимального числа комплексов, которые могут быть образованы между R-AgTx2 и гибридными белками (рис. 5а). Эта зависимость, связанная с повышением общей ионной силы раствора, наиболее заметно проявляется в случае гибридного белка KcsA-Kv1.1 и менее существенна в случае KcsA-Kv1.3 и KcsA-Kv1.6.

Обнаружено, что зависимость сигнала флуоресценции R-AgTx2 от концентрации KCl в буфере имеет колоколообразный характер с максимумом при 4 мМ (рис. 5б). Мы предполагаем, что ионы калия в среде необходимы для поддержания нормальной структурной организации порового участка каналов. Присутствие небольшой концентрации ионов калия (< 4 мМ) увеличивает связывание R-AgTx2, в то время как высокие концентрации KCl (> 25 мМ) оказывают негативный эффект, повышая ионную силу.

Установлено, что ионная сила буфера оказывает влияние не только на максимальное число комплексов между R-AgTx2 и гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,6), но также и на константу диссоциации R-AgTx2 (рис. 6). Аффинность R-AgTx2 к гибридным белкам KcsA-Kv1.x (x=1,6) при возрастании ионной силы буфера снижается соответственно в 2,3 и 1,6 раза. Аффинность R-AgTx2 к гибриднему белку KcsA-Kv1.3 не меняется. Это свидетельствует о значительной роли электростатических взаимодействий в процессе связывания блокаторов с каналами Kv1.1 и Kv1.6.

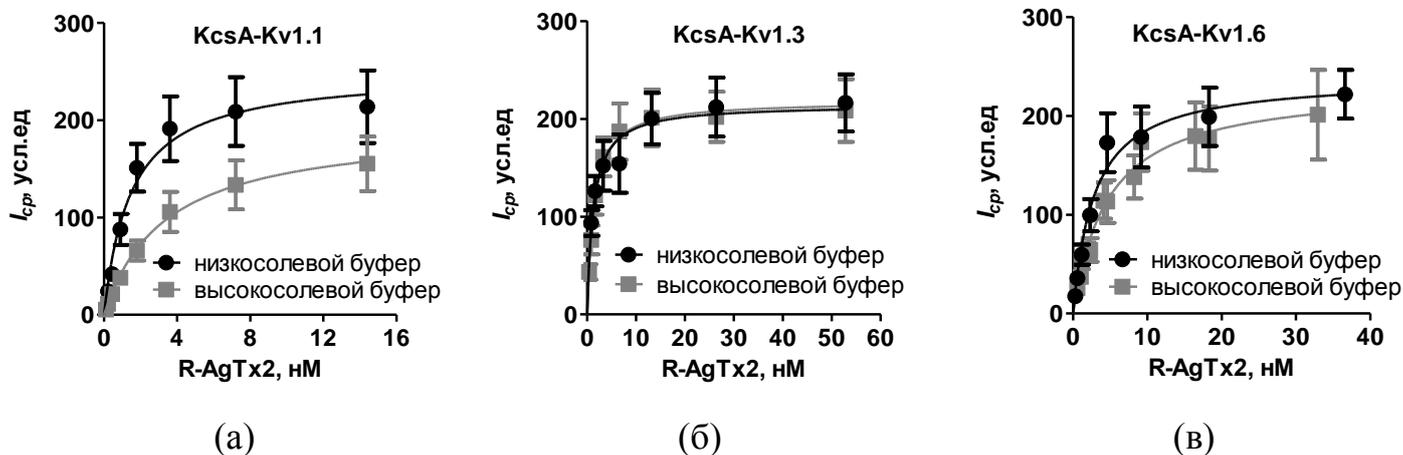


Рис. 6. Связывание R-AgTx2 с гибридными белками KcsA-Kv1.1 (а), KcsA-Kv1.3 (б), KcsA-Kv1.6 (в) в буферах разного состава. Высокосолевой буфер: 50 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,25 М сахараза, 0,3 мМ ЭДТА, 50 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1% БСА. Низкосолевой буфер: 20 мМ Трис-НСl, рН 7,5, 0,25 М сахараза, 0,3 мМ ЭДТА, 4 мМ KCl, 10 мМ MgCl₂, 0,1% БСА.

В работе также показано, что присутствие высокой концентрации сахаразы (0,1-0,5 М) и ионов магния (5-10 мМ MgCl₂) в буфере стабилизирует сферопласты, препятствуя их агрегации, но не влияет на сигнал флуоресценции R-AgTx2.

3. Характеристика специфичности взаимодействия клеточных систем с известными лигандами Kv1-каналов

Разработанные клеточные системы были охарактеризованы по специфичности связывания лигандов каналов Kv1.x (x=1,3,6). Был исследован набор известных лигандов Kv1 каналов, включающий низкомолекулярные соединения тетраэтиламмоний (ТЭА) и 4-аминопиридин (4-АП), а также высокоаффинные пептидные блокаторы из ядов скорпионов AgTx2, КТХ и OSK1. Обнаружено, что КТХ, AgTx2 и OSK1 конкурируют с R-AgTx2 за связывание с KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) в наномолярном диапазоне концентраций, ТЭА – в миллимолярном диапазоне, а 4-АП не влияет на образование комплексов между R-AgTx2 и KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) даже при высоких концентрациях (50 мМ) (рис. 7).

4-АП не конкурирует с R-AgTx2 за связывание с внеклеточным участком линкера S5-S6 гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), поскольку область связывания этой молекулы расположена с внутриклеточной стороны поры канала. Для ТЭА существует два сайта связывания, расположенных на внешней и внутренней стороне порового отверстия Kv1-каналов. Поскольку области связывания R-AgTx2 и ТЭА частично перекрываются, разработанные клеточные системы с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) подходят для обнаружения ТЭА и измерения его аффинности к внешнему сайту связывания.

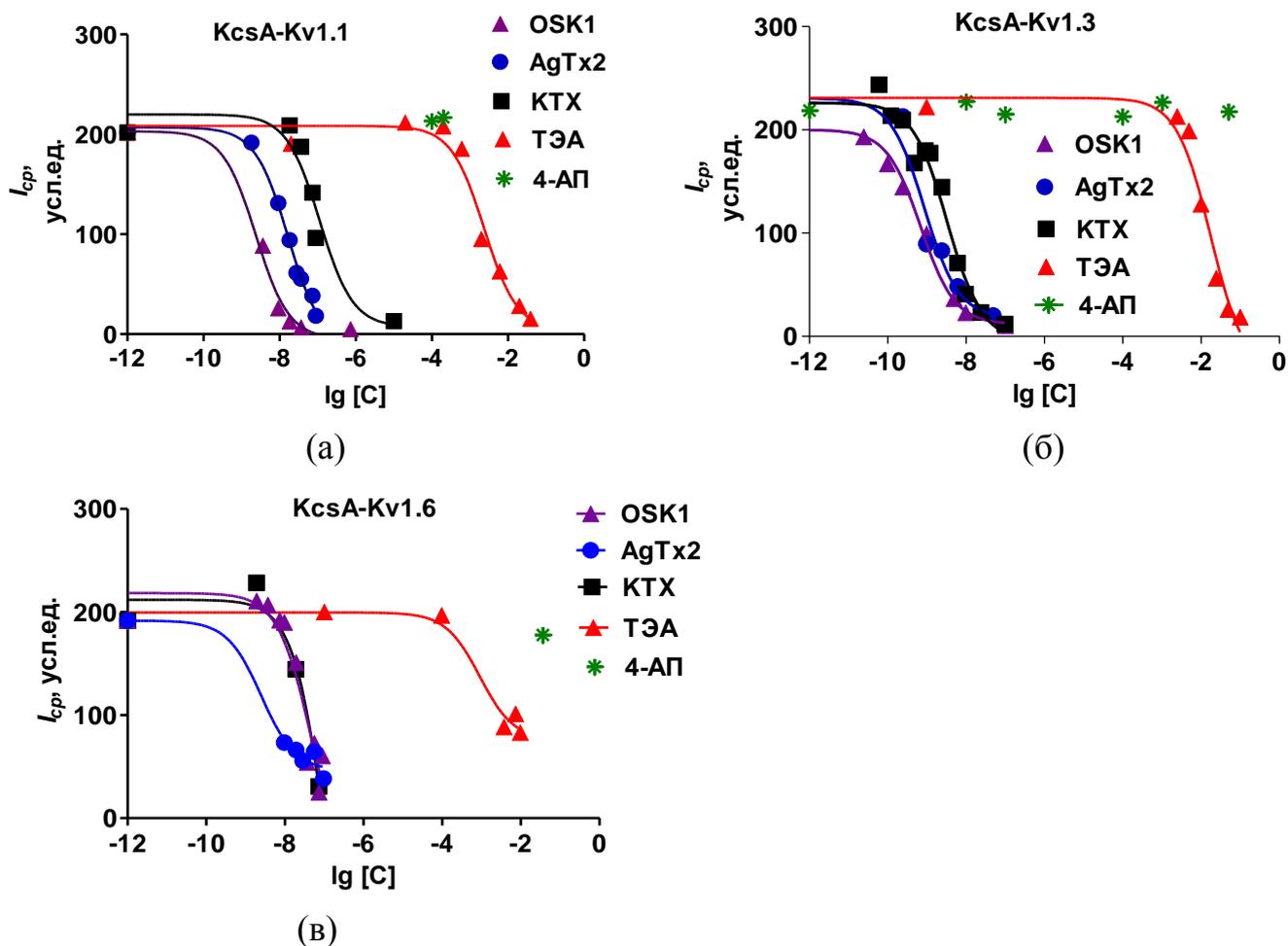


Рис. 7. Вытеснение R-AgTx2 Kv1-лигандами из комплексов с гибридными белками KcsA-Kv1.1 (а), KcsA-Kv1.3 (б) и KcsA-Kv1.6 (в). [C] – концентрация лигандов, М.

Аффинность пептидных блокаторов OSK1 и KTX к гибриднему белку KcsA-Kv1.3 соотносится с опубликованными значениями для канала Kv1.3. Аффинность всех протестированных лигандов, за исключением ТЭА, при связывании с KcsA-Kv1.1 была равна или ниже аффинности к KcsA-Kv1.3, что также соответствует опубликованным данным. Полученные результаты подтверждают, что в отношении гибридных белков KcsA-Kv1.x ($x=1,3$) в составе мембраны сферопластов сохраняется профиль специфичности связывания лигандов, характерный для каналов Kv1.x ($x=1,3$).

В отличие от каналов Kv1.1 и Kv1.3 профиль специфичности лигандов канала Kv1.6 исследован мало. Существуют данные об аффинности ТЭА и AgTx2 к Kv1.6. Наличие аффинности токсинов скорпионов OSK1 и KTX к поровому участку канала Kv1.6 была продемонстрирована в данной работе впервые.

4. Анализ структурных особенностей взаимодействия пептидов AgTx2, KTX и OSK1 с гибридными белками KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$).

Гибридные белки KcsA-Kv1.x ($x=1,3,6$), различающиеся всего по шести аминокислотным остаткам в участке S5-P-линкера, но сохраняющие профиль специфичности связывания лигандов каналов Kv1.x ($x=1,3,6$) человека, – удобный инструмент для изучения структурных особенностей, определяющих функционально

важную избирательность высокоаффинного взаимодействия пептидных лигандов с поровой частью каналов Kv1.x (x=1,3,6).

Значительное совпадение профилей специфичности связывания пептидных лигандов с белками Kv1.x (x=1,3,6) и соответствующими гибридными белками Kv1.x (x=1,3,6) доказывает важную роль гибкого S5-P-линкера этих белков во взаимодействии с поровыми блокаторами Kv1.x-каналов. При этом способность гибридных белков связывать токсины группы α -КТх3 (AgTx2, КТХ, OSK1) в значительной мере определяется аминокислотными остатками D64 и S61, которые отсутствуют у исходного бактериального канала KcsA. Мы предполагаем, что аффинитет к α -КТх3-токсинам модулируется у KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) заменами в положении 58. Объемные боковые цепи 58-го аминокислотного остатка снижают аффинность KcsA-Kv1.x к α -КТх3-токсинам в ряду KcsA-Kv1.3 (G58) > KcsA-Kv1.1 (H58) > KcsA-Kv1.6 (L58).

В работе проведен анализ элементов структуры, которые могут определять избирательность взаимодействия пептидных блокаторов группы α -КТх3 с гибридными белками. Общая структура α -КТх3 токсинов включает короткую α -спираль, связанную двумя дисульфидными связями с двумя антипараллельными β -листами (β 2 и β 3), а также расположенную на N-концевом участке токсина область β -структуры (β 1), соединенную третьей дисульфидной связью с β 3-листом. Анализ показал, что β 2-лист пептидов важен для высокоаффинного связывания, но консервативен по аминокислотному составу и поэтому не влияет на избирательность взаимодействия с KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). Более высокая аффинность к KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) пептида OSK1 по сравнению с AgTx2 и КТХ может быть объяснена присутствием нетипичных для группы α -КТх3 аминокислотных остатков: R12, E16 и K20, которые локализованы в α -спиральном домене пептида.

5. Поиск высокоаффинных пептидных лигандов Kv1-каналов в ядах животных при помощи разработанных клеточных систем

С помощью разработанных в данной работе систем осуществлен поиск активных лигандов поровой части каналов Kv1.x (x=1,3,6) в составе цельных ядов пауков (19 видов), скорпионов (7 видов), змей (7 видов) и секрета жабы (1 вид).

Фактором, затрудняющим использование разработанных систем при тестировании цельных ядов животных, является присутствие в их составе мембранолитических компонентов. Как было продемонстрировано на примере мембранолитического пептида из яда пчелы мелиттина, повреждение мембраны приводит к перераспределению сигнала R-AgTx2, который теперь обнаруживается по всему объему клетки, что затрудняет анализ (рис. 8). Однако, только яды двух видов пауков и двух видов змей вызывали существенный лизис мембраны, остальные яды не вызывали видимого повреждения структуры сферопластов в концентрациях, выбранных для исследования Kv1-лигандов.

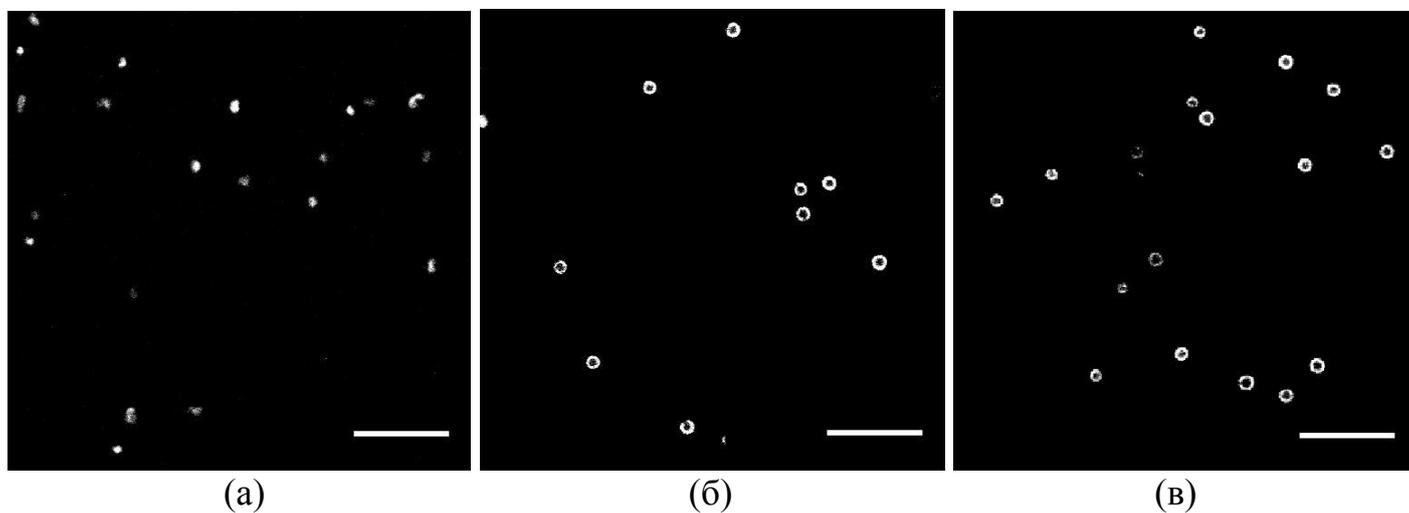


Рис. 8. Типичные конфокальные флуоресцентные изображения связывания R-AgTx2 (5 нМ) с гибридным белком KcsA-Kv1.3 на поверхности сферопластов *E.coli* при добавлении в реакционную смесь 10 мкМ мелиттина (а), цельного яда *Thanatus sp.* (98 мг/л) (б), без добавления (в). Метка масштаба 10 мкм.

В результате проведенной работы обнаружено, что секрет жабы, а также все протестированные яды пауков не содержат компонентов, способных конкурировать с R-AgTx2 за связывание с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). Все протестированные яды скорпионов (*B. arenicola*, *A. amoreuxi*, *L. quinquestriatus quinquestriatus*, *M. martensii* Karsch, *H. laoticus*, *M. eupeus*, *O. scrobiculosus*), а также яды змей 4 видов (*D. angusticeps*, *B. multicinctus*, *V. nikolskii*, *W. aegyptia*) обладали активностью хотя бы к одному из гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6).

5.1. Анализ констант связывания токсинов из ядов змей

Способность вытеснять R-AgTx2 из комплексов хотя бы с одним из гибридных белков KcsA-Kv1.x (x=1,3,6) показали яды змей 4 видов (*D. angusticeps*, *B. multicinctus*, *V. nikolskii*, *W. aegyptia*). При этом обнаружена избирательность действия ядов змей на каналы семейства Kv1.

Активность яда *D. angusticeps* и *B. multicinctus* на каналах Kv1.1 и Kv1.3, выявленная в нашей работе, объясняется присутствием в составе ядов дендротоксинов (δ -DTX, α -DTX, DaE1/DaE2), β -бунгаротоксина или других неописанных ранее Kv1-блокаторов. Присутствие блокаторов Kv1-каналов в составе ядов змей *V. nikolskii* и *W. aegyptia* обнаружено нами впервые. Планируется продолжение исследований этих ядов для выделения и идентификации индивидуальных активных компонентов с целью получения новых высокоафинных блокаторов каналов Kv1 человека для научных исследований и прикладного использования в фармакологии.

Разработанные клеточные системы подходят для поиска лигандов в составе ядов змей, а проблемы, связанные с присутствием в составе ядов активных фосфолипаз, во многих случаях могут быть успешно преодолены, что было показано в данной работе.

5.2. Анализ констант связывания токсинов из яда скорпиона *H. laoticus*

Одним из ядов скорпионов, показавшим способность вытеснять R-AgTx2 из центров связывания с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3) был яд скорпиона *H. laoticus*. Данный яд обладает сравнительно невысокой токсичностью, но проявляет противоболевую и противовоспалительную активность. Эти свойства свидетельствуют

о возможном наличии в его составе соединений, воздействующих на иммунную систему. Сотрудники лаборатории молекулярной токсикологии ИБХ РАН совместно с вьетнамскими коллегами провели серию экспериментов по идентификации в составе яда *H. laoticus* таких соединений, используя в качестве теста биологической активности токсичность для мышей.

Цельный яд скорпиона и очищенные соединения, показавшие целевую активность на мышах, были подвергнуты анализу при помощи разработанных в данной работе клеточных систем поиска лигандов каналов Kv1.x (x=1,3). Нами было обнаружено, что яд скорпиона *H. laoticus* конкурирует с R-AgTx2 за связывание с поровой частью каналов Kv1.x (x=1,3). Дальнейший анализ очищенных фракций яда выявил, что среди фракций с токсичностью на мышах только одна способна вытеснять R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.x (x=1,3) и, следовательно, содержащийся в ней полипептид является блокатором поровой части каналов Kv1.x (x=1,3). Этот пептид с молекулярной массой 3669,2 Да получил название хетлаксин (hetlaxin от HETerometrus LAoticus toXIN).

Была определена эффективность взаимодействия нового токсина с поровой частью каналов Kv1.1 и Kv1.3. Установлено, что хетлаксин связывается с обоими каналами, а величина K_{ap} для каналов Kv1.1 и Kv1.3 составляет соответственно $0,8 \pm 0,3$ мкМ и 59 ± 6 нМ.

Таким образом, впервые из яда скорпиона *H. laoticus* выделен токсин, обладающий сродством к Kv1.3 в наномолярном диапазоне. Обнаружение этого блокатора подтверждает предположение, что иммуномодулирующий эффект яда *H. laoticus* опосредован воздействием через канал Kv1.3, локализованный в клетках иммунной системы человека.

5.3. Анализ констант связывания токсинов из яда скорпиона *O. scrobiculosus*

Известно, что в яде скорпиона *O. scrobiculosus* содержится два высокоаффинных лиганда каналов семейства Kv1: OSK1 – блокатор каналов Kv1.1-Kv1.3 и OSK2 – специфический блокатор канала Kv1.2. Мы провели комплексное исследование яда скорпиона *O. scrobiculosus* на предмет обнаружения новых поровых блокаторов каналов Kv1.1 и Kv1.3. Целью исследования также было изучение возможности использования разработанных клеточных систем для поиска лигандов на разных этапах фракционирования ядов.

Цельный яд *O. scrobiculosus* был разделен на 4 фракции при помощи гель-фильтрации нашими коллегами из Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН. Фракции III и IV показали способность конкурировать с R-AgTx2 за связывание с KcsA-Kv1.x (x=1,3). Далее фракции III и IV были разделены при помощи обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ) соответственно на 43 и 19 субфракций нашими коллегами из Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН. Каждая субфракция содержала один основной компонент и не более двух минорных, как было подтверждено при помощи MALDI масс-спектрометрии и аналитической хроматографии. В результате детального анализа субфракций яда с использованием разработанных клеточных систем тестирования удалось показать, что активность фракций III и IV объясняется присутствием одного и тот же индивидуального компонента. Измеренные молекулярные массы компонента исходного и алкилированного по восстановленным SH-группам пептида составили 4205,2 и 4842,0 кДа, что говорит о присутствии 6

цистеиновых остатков. Этот активный пептид был описан ранее и имеет название OSK1.

Таким образом, мы применили разработанные в данной работе системы поиска лигандов каналов Kv1.x (x=1,3) для исследования яда скорпиона *O. scrobiculosus*. Проведение тестирования после каждого этапа разделения яда позволило избежать фракционирования заведомо неактивных фракций, что в конечном итоге значительно сократило объемы работы. Единственный обнаруженный специфический поровый лиганд каналов Kv1.x (x=1,3) в яде *O. scrobiculosus* – это уже описанный ранее пептид OSK1.

5.4. Анализ констант связывания токсинов из яда скорпиона *M. eureus*

Яд скорпиона *M. eureus* показал способность вытеснять R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), поэтому мы провели дальнейший анализ его компонентов. На первом этапе фракционирования яд *M. eureus* был разделен на фракции I-III при помощи гель-фильтрации нашими коллегами из Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН. Все три фракции были изучены нами по их способности связываться с гибридными белками KcsA-Kv1.x (x=1,3,6). Целевая активность обнаружена во фракции II. Отсутствие активности в двух других фракциях I и III означало, что в них не содержится высокоаффинных поровых блокаторов каналов Kv1.x (x=1,3,6), либо их массовая доля минимальна.

Для выявления компонентов, ответственных за активность фракции II, данная фракция была разделена при помощи ОФ-ВЭЖХ на 40 субфракций нашими коллегами из Лаборатории нейрорецепторов и нейрорегуляторов ИБХ РАН. Среди 40 субфракций способность вытеснять R-AgTx2 из комплексов с KcsA-Kv1.x (x=1,3) показали несколько субфракций, которые были разделены на индивидуальные соединения и повторно проанализированы при помощи разработанных клеточных систем KcsA-Kv1.x (x=1,3). В результате, из яда *M. eureus* было выделено 9 активных компонентов блокаторов каналов Kv1.

Согласно опубликованным данным в яде *M. eureus* до настоящего момента было известно три токсина группы α -КТХ, способных связываться с каналами Kv1: MeuКТХ-1, MeuКТХ-3 и MeuТх3В. Благодаря комбинации разработанных в данной работе клеточных систем поиска лигандов Kv1-каналов, а также методов ОФ-ВЭЖХ и масс-спектрометрии, нам удалось найти все три известных лиганда, а также идентифицировать 6 новых токсинов.

Для пептида MeuКТХ-1, выделенного в достаточных количествах из яда *M. eureus*, мы исследовали аффинность к поровой части каналов Kv1.1 и Kv1.3. Было исследовано конкурентное связывание R-AgTx2 и MeuКТХ-1 с KcsA-Kv1.x (x=1,3) и определены константы K_{ap} . Полученные значения констант K_{ap} (MeuКТХ-1) для KcsA-Kv1.1 и KcsA-Kv1.3 составили соответственно 180 ± 30 нМ и 22 ± 3 нМ. Наномолярная аффинность MeuКТХ-1 к каналу Kv1.3 и многократное снижение аффинности к каналу Kv1.1 согласуются с данными, полученными ранее методом patch-clamp (IC_{50} для Kv1.3 = 2,36 нМ).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований были созданы новые клеточные системы для поиска и исследования взаимодействий блокаторов с калиевыми потенциал-чувствительными каналами семейства Kv1. Создание этих систем было поддержано разработкой специализированных биофизических методик на основе флуоресцентной конфокальной микроскопии и оригинальных алгоритмов обработки данных. Флуоресцентный метод значительно безопаснее и проще более традиционного радиолигандного анализа. Он универсален и, в перспективе, может быть легко адаптирован для автоматизированных измерений с применением проточного цитометра или планшетного флуориметра.

Одно из назначений клеточных систем – поиск новых блокаторов каналов Kv1 в составе многокомпонентных смесей и выяснения связи структура-активность в системе пептидный токсин-калиевый канал. На примере ядов скорпионов, продемонстрировано, что клеточные системы обеспечивают быстрое и прицельное обнаружение новых высокоаффинных пептидных лигандов Kv1-каналов в ядах животных.

Исследования показали, что гибридные белки KcsA-Kv1.x в составе бактериальных клеточных систем связывают лиганды каналов Kv1.x человека с характерными для них константами взаимодействия и, таким образом, являются новым инструментом для изучения структурных основ высокоаффинного взаимодействия поровых блокаторов с ионными каналами Kv1.x и их термодинамических аспектов. Возможность сравнительного анализа комплексообразования различных по структуре лигандов с близкородственными каналами Kv1.x (x=1,3,6) расширяет применимость клеточных систем для исследования структурных детерминант, обеспечивающих избирательность лиганд-рецепторных взаимодействий калиевых каналов.

ВЫВОДЫ

1) На основе биофизических представлений о связи пространственной структуры и функции белков и белковых комплексов с использованием биоинженерных подходов разработаны бактериальные клеточные системы, обеспечивающие поиск и изучение высокоаффинных лигандов к потенциал-чувствительным калиевым каналам Kv1.x (x=1,3,6).

2) С использованием разработанных клеточных систем обнаружены 7 новых высокоаффинных пептидных лигандов каналов Kv1.x (x=1,3) в ядах скорпионов.

3) Показано, что близкородственные пептидные лиганды каналов Kv1.x (x=1,3,6) с точечными различиями в области β 1-листа и α -спирального домена связываются с разработанными клеточными системами с характерными для них константами диссоциации в наномолярном диапазоне концентраций.

4) Определены ключевые структурные детерминанты, модулирующие аффинность и избирательность связывания пептидных лигандов с гибридными биоинженерными конструкциями KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), которые соответствуют природным каналам.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК:

1) Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A., Ignatova A.A., Korolkova Y.V., Grishin E.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Fluorescent system based on bacterial expression of hybrid KcsA channels designed for Kv1.3 ligand screening and study// *Anal Bioanal Chem.*, 2013, 405(7):2379-2389.

2) Х.Н.Ань, В.Д.М. Хоанг, К.С. Кудряшова, О.В. Некрасова, А.В. Феофанов, Т.В.Андреева, В.И. Цетлин, Ю.Н. Уткин. Новый токсин хетлаксин из яда скорпиона *Heterometrus laoticus* взаимодействует с потенциал-зависимым калиевым каналом Kv1.3// Доклады Академии наук, 2013, 449 (5):606-609.

3) Hoang AN, Vo HD, Vo NP, Kudryashova KS, Nekrasova OV, Feofanov AV, Kirpichnikov MP, Andreeva TV, Serebryakova MV, Tsetlin VI, Utkin YN. Vietnamese *Heterometrus laoticus* scorpion venom: Evidence for analgesic and anti-inflammatory activity and isolation of new polypeptide toxin acting on Kv1.3 potassium channel// *Toxicon*, 2014, 77:40-48.

Тезисы конференций:

1) Некрасова О.В., Кудряшова К.С., Игнатова А.А., Королькова Ю.В., Феофанов А.В. Анализ взаимодействия лигандов с гибридным калиевым каналом KcsA-Kv1.3 в составе мембраны бактерий. I международная научно-практическая конференция «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине», 17-19 ноября 2010, г. Москва: материалы конф./[гл.ред.- Уйба В.В.]. –М.:Парк-медиа, 2010, С.180

2) Кудряшова К.С., Кузьменков А.И., Василевский А.А., Некрасова О.В., Феофанов А.В. Новая система поиска лигандов калиевого канала Kv1.3. Научная конференция по биоорганической химии и биотехнологии “X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова” 14 – 17 ноября 2011 г. Москва-Пушино, Сборник тезисов Т.1, С. 37.

3) Кудряшова К.С., Некрасова О.В., Кузьменков А.И., Василевский А.А., Ю.В. Королькова, Феофанов А.В., Гришин Е.В., Кирпичников М.П. Новая флуоресцентная система для поиска блокаторов калиевых каналов Kv1.1 и Kv1.3. IV Съезд биофизиков России. Симпозиум IV «Новые тенденции и методы в биофизике»: Материалы докладов/[отв.ред.- Рубин А.Б.]. – Нижний Новгород, ННГУ им. Н.И. Лобачевского, 2012, Т.4, С.53.

4) Некрасова О.В., Кудряшова К.С., Василевский А.А., Королькова Ю.В., Кузьменков А.И., Уткин Ю.Н., Гришин Е.В., Феофанов А.В., Кирпичников М.П. Новая биоинженерная система для поиска и изучения пептидных блокаторов калиевых каналов Kv1.3 и Kv1.1. VI Российский симпозиум «Белки и пептиды»: Материалы симпозиума. – Уфа: ИСЭИ УНЦ РАН, 2013, С. 121. ISBN 978-5-904122-71-3.

5) Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A., Feofanov A.V. A novel fluorescence system for potassium channel Kv1.1 and Kv1.3 ligand screening. “9th EBSA European Biophysics Congress”, 13-17 July 2013, Lisbon, Portugal. *Eur. Biophys. J.*, 42 (suppl 1):81.

6) Nekrasova O.V., Kudryashova K.S., Vassilevski A.A., Kuzmenkov A.I., Korolkova Y.V., Grishin E.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Functional expression of ligand-

binding domains of eukaryotic proteins in E.coli membrane: exercises with Kv1.3 channel. "FEBS Congress 2013", 6-11 June 2013, St. Petersburg, Russia. FEBS J. 2013, v. 280 (suppl. 1), p. 610.

7) Кудряшова К.С., Некрасова О.В., Ю.В. Королькова, Феофанов А.В. Исследование блокаторов каналов Kv1 с применением новых биоинженерных клеточных систем. Международная конференция по биоорганической химии, биотехнологии и бионанотехнологии, посвященная 55-летию Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и 80-летию со дня рождения академика Ю.А. Овчинникова (Москва, 15-19 сентября 2014 г.), Acta Naturae, специальный выпуск, с. 32.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

ТЭА – тетраэтиламмоний

4-АП – 4-аминопиридин

DTX – дендротоксин

MgTx – маргатоксин из яда скорпиона *Centruroides margaritatus*

OSK1 – токсин из скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*

КТХ – калиотоксин из скорпиона *Androctonus mauretanicus mauretanicus*

AgTx2 – агитоксин 2 из скорпиона *Leiurus quinquestriatus*

R-AgTx2 – агитоксин 2, флуоресцентно-меченный 5 (6) карбокситетраметил-родамином

ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография

ИПТГ – изопропил-β-D-тиогалактопиранозид

БСА – бычий сывороточный альбумин

K_d – константа диссоциации лигандов

K_{ap} – кажущаяся константа диссоциации для конкурирующих (немеченных) лигандов