

УДК 577.322

Моделирование структуры комплексов потенциал-управляемых калиевых каналов с пептидными блокаторами: методы и результаты

В. Н. Новоселецкий^{1*}, А. Д. Волынцева¹, К. В. Шайтан¹, М. П. Кирпичников^{1,2},
А. В. Феофанов^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: valeryns@gmail.com

Поступила в редакцию 06.07.2015

Принята к печати 02.12.2015

РЕФЕРАТ Моделирование структуры комплексов потенциал-управляемых калиевых (K_v) каналов с пептидными блокаторами призвано выявить ключевые для формирования высокоаффинных комплексов аминокислотные остатки и расшифровать систему их взаимодействий. Эти работы открывают возможность конструирования *in silico* селективных блокаторов, новых молекулярных инструментов для изучения распределения и функциональной роли калиевых каналов. Предполагается, что оптимизированные блокаторы могут стать основой для разработки лекарств, снижающих гиперактивность калиевых каналов и корректирующих патологические процессы, связанные с этой активностью. В обзоре рассмотрены современные методы компьютерного моделирования комплексов пептидных блокаторов поры с K_v -каналами, алгоритмы анализа межмолекулярных взаимодействий и результаты их применения для описания структурных особенностей этих комплексов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА блокаторы, калиевые каналы, молекулярное моделирование, структура комплексов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БД – броуновская динамика; МД – молекулярная динамика; ПСС – потенциал средней силы (англ. potential of mean force, PMF); РСА – рентгеноструктурный анализ; СФ – селективный фильтр; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; K_v -каналы – потенциал-управляемые калиевые каналы; α -КТх – семейство пептидных блокаторов калиевых каналов; ММ-РБСА – метод расчета свободной энергии, сочетающий использование молекулярной механики и решение уравнения Пуассона–Больцмана (molecular mechanics/Poisson–Boltzmann surface area); VSD – потенциал-чувствительный домен (voltage-sensor domain).

ВВЕДЕНИЕ

Калиевые (K^+) каналы – это порообразующие трансмембранные белки, регулирующие различные биологические процессы за счет контроля потоков ионов калия через клеточную мембрану. Калиевые каналы экспрессируются во многих тканях и принимают участие в разнообразных биологических функциях, таких, как поддержание потенциала покоя мембраны, контроль сердечного и нервного возбуждения, высвобождение нейротрансмиттеров, мышечное сокращение и секреция гормонов [1, 2]. Калиевые каналы играют важную роль в диагностике и лечении различных заболеваний [3–6].

Калиевые каналы человека включают в себя Ca^{2+} -активируемые (K_{Ca}), каналы входящего вы-

прямления (K_{IR}), двухпоровые каналы утечки (K_{2p}), а также потенциал-управляемые (K_v) калиевые каналы. Наибольшее семейство формируют K_v -каналы, включающие в себя 12 подсемейств: Shaker/ K_v1 (KCNA), Shab/ K_v2 (KCNB), Shaw/ K_v3 (KCNC) и др. Они обладают сходным строением и являются (за исключением подсемейств K_v4 – K_v9) гомотетрамерами с осью симметрии 4-го порядка. Механизмы активации K_v -каналов рассмотрены в обзоре [7].

Развитие ряда заболеваний сопровождается нарушением нормального функционирования K_v -каналов определенного типа, а в их терапии используют коррекцию активности данных каналов. Например, к таким патологиям относятся нарушения мембранной возбудимости и функционирования нейронов

и сердечно-сосудистой системы [8]. Эпизодическая атаксия-1, аутосомно-доминантное неврологическое расстройство человека, связано с мутациями остатка V408 потенциал-зависимого калиевого канала $K_v1.1$ (*KCNA1*) [9]. С мутациями генов *KCNQ2* и *KCNQ3*, кодирующих потенциал-управляемые каналы $K_v7.2$ и $K_v7.3$, связано такое генетическое заболевание, как доброкачественные семейные неонатальные судороги [10]. Анализ экспрессии генов на разных стадиях развития болезни Альцгеймера показывает, что усиление экспрессии $K_v3.4$ (*KCNC4*) и нарушение регуляции $K_v3.1$ (*KCNC1*) изменяет потоки ионов калия в нейронах, что приводит к изменению синаптической активности и может лежать в основе нейродегенерации [11]. С нарушениями функций потенциал-управляемых калиевых каналов ($K_v7.1$ (*KCNQ1*), $K_v11.1$ (*KCNH2*), *KCNE1*, *KCNE2*) связывают возникновение такого сердечно-сосудистого заболевания, как синдром удлиненного интервала QT [12]. Возникновение синдрома Бругада связывают с мутациями гена *KCND3*, кодирующего канал $K_v4.3$ [13]. Исследование экспрессии калиевых каналов у пациентов с острым коронарным синдромом выявило роль канала $K_v1.3$ [14]. Ингибиторы $K_v1.3$ подавляют пролиферацию Т-лимфоцитов (а именно, эффекторных клеток памяти T_{EM}), что способствует улучшению состояния больных рассеянным склерозом, сахарным диабетом типа 1, ревматоидным артритом, псориазом и бронхиальной астмой [15]. Блокирование канала $K_v2.1$ оказывает терапевтическое действие при сахарном диабете типа 2 [16]. Токсины из ядов скорпионов, пауков, змей, конусов и морских анемонов являются природными пептидами-блокаторами, обладающими высоким терапевтическим потенциалом. Эти пептиды классифицируют по механизму действия:

- блокаторы поры, которые связываются с внеклеточной стороны в области поры канала и препятствуют прохождению через нее ионов калия (пептиды из яда скорпионов и анемонов);
- пептиды, которые взаимодействуют с VSD-доменом, стабилизируют конформацию с закрытой порой и препятствуют открыванию канала (пептиды из яда тарантулов).

В настоящее время установлены структуры лишь нескольких комплексов K_v -каналов с блокаторами [17, 18], а недостаток экспериментальных данных об особенностях строения таких комплексов активно восполняется за счет разработки и применения методов молекулярного моделирования.

Пептидные блокаторы обладают высоким сродством (пико- и наномолярные константы диссоциации комплексов), но часто сразу к нескольким близкородственным K_v -каналам. Поэтому работы в области

фармацевтического использования токсинов направлены на повышение их селективности путем оптимизации структуры. Одним из примеров является разработка синтетического производного пептида актинии ShK-186, блокирующего потенциал-управляемый калиевый канал $K_v1.3$ при пикомолярных концентрациях и проходящего в настоящее время стадию 1В клинических исследований в качестве средства против аутоиммунных заболеваний [19]. Другое преимущество селективных токсинов – возможность их применения для идентификации каналов, изучения распределения каналов в клетках и тканях, а также для выяснения роли каналов в развитии различных патологий. Большую роль в направленной разработке селективных блокаторов призваны сыграть методы молекулярного моделирования.

В данном обзоре рассмотрено современное состояние проблемы изучения комплексов K_v -каналов с блокаторами поры методами компьютерного моделирования, включая предсказание структур этих комплексов, расчет интерфейсов взаимодействия и энергии связывания. Общий обзор теории и методов расчета, применимых к моделированию различных ионных каналов, а также примеры использования методов молекулярного моделирования для ряда ионных каналов, отличных от семейства K_v , выходят за рамки данного обзора, а их рассмотрение может быть найдено в недавно опубликованной работе [20].

СТРУКТУРЫ K_v -КАНАЛОВ, ПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРОВ ПОРЫ И ИХ КОМПЛЕКСОВ

Анализ взаимодействий между калиевыми каналами и токсинами с помощью компьютерного моделирования значительно облегчается благодаря установлению их пространственной структуры методами рентгеноструктурного анализа (РСА), спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и электронной микроскопии. В настоящее время известны структуры большого числа пептидных блокаторов поры, 12 калиевых каналов [21] и двух комплексов калиевых каналов с блокатором харибдотоксином. Экспериментальные данные о структурах калиевых каналов и их комплексов существенно ограничены из-за известных сложностей в выделении, очистке и кристаллизации мембранных белков. Эти сложности придают дополнительную ценность каждой расшифрованной структуре, проливающей свет на механизмы активации каналов, их функционирование и особенности взаимодействия с блокаторами [22].

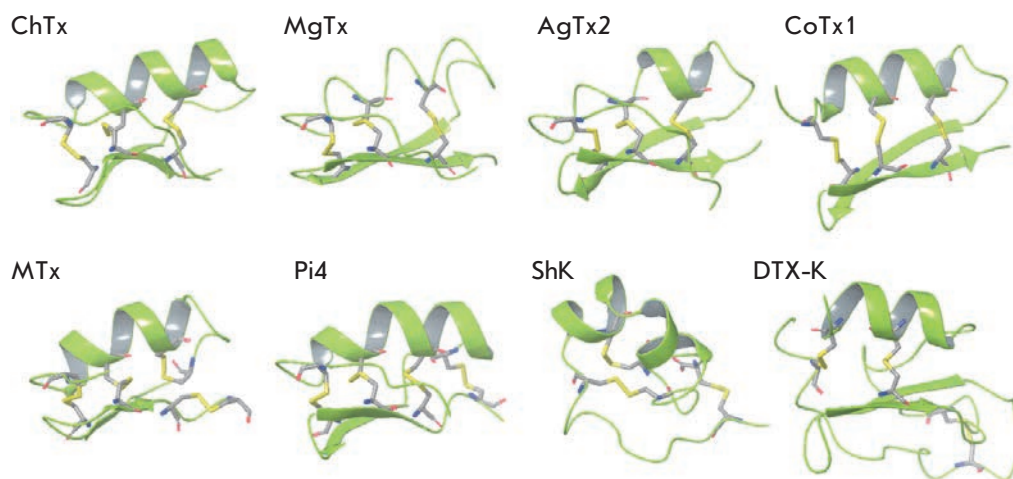
Структуры пептидных блокаторов калиевых каналов

Большинство пептидных блокаторов K_v -каналов найдено в ядах скорпионов и отнесено к семейству

Таблица 1. Активно исследуемые пептидные блокаторы K_v -каналов с известной структурой

Название	Обозначение	Подсемейство	Код PDB (ссылка)	Блокируемые каналы
Харибдотоксин	ChTx	α -КТх 1.1	2CRD [23]	K_v 1.1, 1.2, 1.3, 1.6, K_{Ca} 1.1, 3.1
	Lq2	α -КТх 1.2	1LIR [24]	K_v , K_{Ca} , K_{IR}
Ноксиустоксин	NTx	α -КТх 2.1	1SXM [25]	K_v 1.2, 1.3
Маргатоксин	MgTx	α -КТх 2.2	1MTX [26]	K_v 1.1, 1.2, 1.3
Хонготоксин	HgTx	α -КТх 2.5	1HLY [27]	K_v 1.2, 1.3
Калиотоксин	КТх	α -КТх 3.1	1XSW [28]	K_v 1.1, 1.2, 1.3, 1.6, K_{Ca} 3.1
Аджитоксин	AgTx2	α -КТх 3.2	1AGT [29]	K_v 1.1, 1.2, 1.3, 1.6
	BmKTx	α -КТх 3.6	1BKT [30]	K_v 1.3
	OSK1	α -КТх 3.7	1SCO [31]	K_v 1.1, 1.2, 1.3, K_{Ca} 3.1
Мауротоксин	Pi1	α -КТх 6.1	1WZ5 [32]	K_v 1.2
	MTx	α -КТх 6.2	1TXM [33]	K_v 1.1, 1.2, 1.3, K_{Ca} 3.1
	HsTx1	α -КТх 6.3	1QUZ [34]	K_v 1.1, 1.3, K_{Ca} 3.1
	Pi4	α -КТх 6.4	1N8M [35]	K_v 1.2
	BmP01	α -КТх 7.2	1WM7 [36]	K_v 1.3
Кобатоксин	CoTx1	α -КТх 10.1	1PJV [37]	K_v 1.2
	Vm24	α -КТх 23.1	2K9O [38]	K_v 1.3
	ShK		1ROO [39]	K_v 1.1, 1.3, 1.6, 3.2, K_{Ca} 3.1
Дендротоксин-К	DTX-K		1DTK [40]	K_v 1.1

Рис. 1. Структуры харибдотоксина (ChTx), маргатоксина (MgTx), аджитоксина-2 (AgTx2), кобатоксина-1 (CoTx1), мауротоксина (MTx), токсина Pi4, токсина ShK и дендротоксина DTX-K в ленточном представлении. В стержневом представлении показаны остатки цистеина, образующие дисульфидные мостики



α -КТх. Эффективными блокаторами K_v -каналов являются также пептид ShK из морского анемона и дендротоксины (α -DTX, DTX-I, DTX-K, δ -DTX) из яда мамбы. Отдельные пептиды способны блокировать не только K_v -, но и K_{Ca} -каналы (табл. 1). Методом ЯМР или реже с помощью РСА получена пространственная структура многих блокаторов (табл. 1), что создает основу для моделирования их комплексов с калиевыми каналами.

Блокаторы семейства α -КТх (известно более 50 структур) обладают сходным α/β -типом укладки (рис. 1, 2), включающим α -спираль, а также два или три β -тяжа. Отличия в структурах связаны

с различающейся длиной полипептидной цепи (29–40 остатков) и конкретным аминокислотным составом (рис. 2), который влияет на размер α -спиральных и β -структурированных участков.

Пептиды α -КТх содержат три или четыре дисульфидных связи, делающих их структуру конформационно жесткой. Система дисульфидных связей постоянно внутри каждого подсемейства за исключением подсемейства α -КТх6. Для пептидов α -КТх6 предпочтительно образование дисульфидных связей между остатками цистеина 1 и 5, 2 и 6, 3 и 7, 4 и 8, как, например, в токсине Pi4 (рис. 1, 2). Однако в мауротоксине (рис. 1, 2) и спинотоксине (α -КТх6.13) свя-

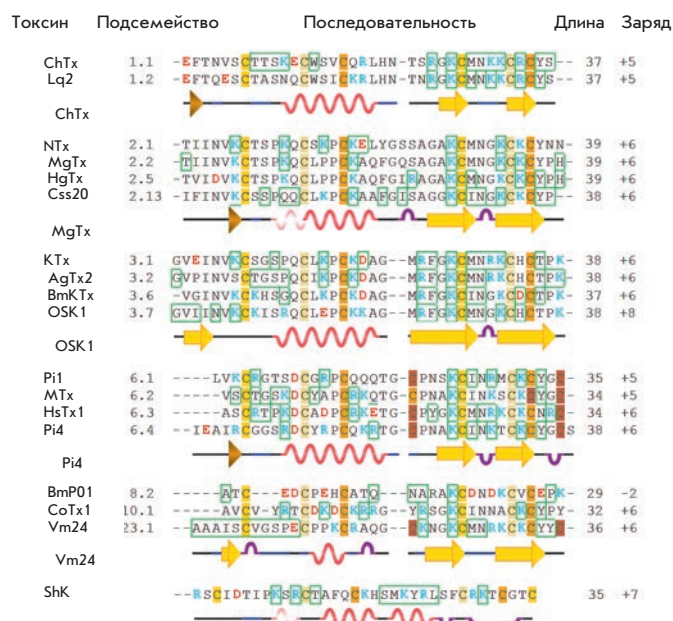


Рис. 2. Выравнивание аминокислотных последовательностей токсинов – блокаторов K_v -каналов. Зелеными рамками отмечены все аминокислотные остатки, которые по данным моделирования образуют контакты с различными каналами. Желтым и оттенками коричневого выделены остатки Cys (одним цветом обозначены остатки, образующие дисульфидную связь), синим — положительно заряженные остатки, красным — отрицательно. Показана вторичная структура некоторых токсинов (по данным PDB, табл. 1). Желтые стрелки — β -тяжи, яркие волнистые линии — α -спирали, неяркие волнистые линии — 3/10-спирали, фиолетовые дуги — повороты, синие линии — изгибы, черные линии — неструктурированные участки

зи образуются между остатками цистеина 1 и 5, 2 и 6, 3 и 4, 7 и 8. Предполагается, что в этих пептидах возможно переключение дисульфидных связей без заметного изменения структуры, так как атомы серы в остатках 3, 4, 7 и 8 находятся близко друг к другу [41].

При pH 7 токсины α -КТх имеют суммарный положительный заряд, который варьирует от +2 до +8, а отрицательно заряженные остатки встречаются преимущественно в N-концевой половине пептида (рис. 2). Исключение составляют токсины подсемейства α -КТх8, в частности VmP01 [41] с суммарным зарядом -2 (табл. 1, рис. 2), активный в отношении канала $K_v1.3$ [42].

Токсин ShK и дендротоксин DTX-K по размеру и наличию дисульфидных мостиков схожи с токсинами из яда скорпиона, но существенно отличаются структурой (рис. 1, 2).

Экспериментальные структуры калиевых каналов

Бактериальный канал KcsA — первый калиевый канал, структура которого была определена методом РСА (табл. 2). Канал имеет форму конуса, образованного четырьмя α -субъединицами, состоящими из двух трансмембранных α -спиралей M1 и M2 и поровой области P, которая, в свою очередь, содержит три различающихся фрагмента: P-петлю, P-спираль и селективный фильтр (СФ, рис. 3). СФ образован атомами кислорода главной цепи аминокислотных остатков, входящих в характерный для всех калиевых каналов мотив TVGYG (в некоторых каналах TIGYG или SVGFG), имеет протяженность всего 12 Å и диаметр, точно соответствующий ионам калия. Хотя канал KcsA не является потенциал-управляе-

Таблица 2. Структуры потенциал-управляемых калиевых каналов и их комплексов с пептидом харибдотоксином, используемые для моделирования по гомологии

Описание	pdb-код (разрешение, Å) (ссылка)	Примеры моделирования
Канал KcsA	1BL8 (3.20 Å) [54]	[55]
Канал K_vAP	1ORQ (3.20 Å) [56]	[57]
Канал $K_v1.2$	2A79 (2.90 Å) [43]	[58, 59]
	3LUT (2.90 Å) [44]	[60–62]
Химерный канал $K_v1.2$ -2.1	2R9R (2.40 Å) [45]	[63–68]
Канал KcsA с мутациями в комплексе с ChTx	2A9H# [17]	[69, 70]
Канал $K_v1.2$ -2.1 в комплексе с ChTx	4JTA (2.50 Å) [18]	[71]

#Структура получена методом ЯМР, в отличие от остальных структур, установленных методом РСА.

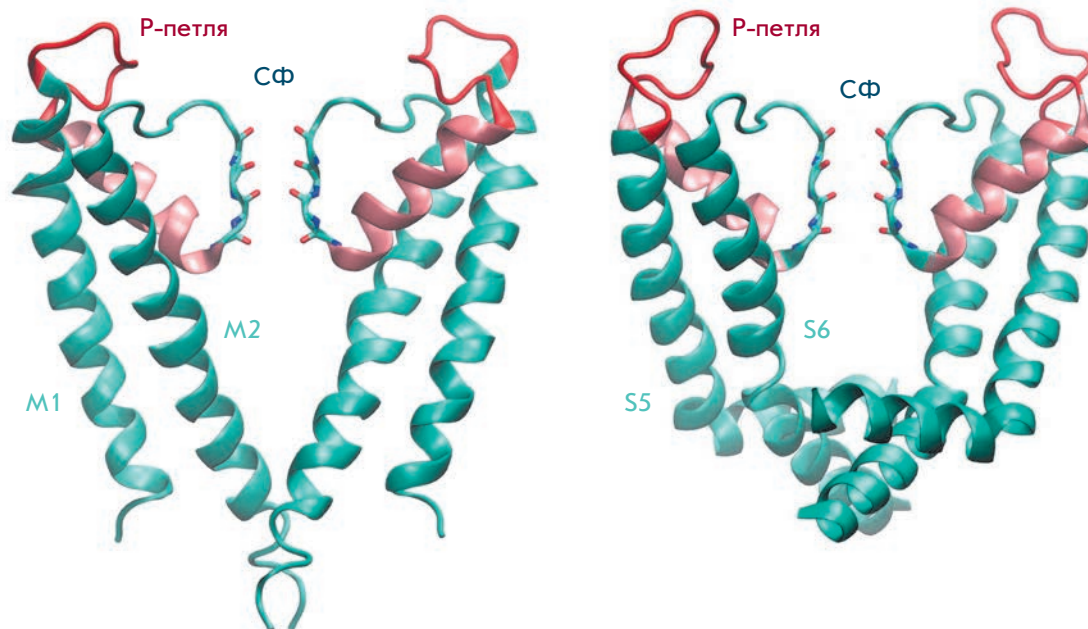


Рис. 3. Кристаллографические структуры канала KcsA (pdb-код 1BL8) (слева) и порового домена канала Kv1.2 (pdb-код 2A79) (справа) в ленточном представлении. Для наглядности показаны только две α -субъединицы из четырех. Р-петля показана красным, Р-спираль розовым. Показаны атомы кислорода главной цепи остатков, образующих СФ. Ионы калия не показаны

мым, в поровой области он обладает высокой гомологией с Kv-каналами эукариот (рис. 4).

Известно около 60 различных структур канала KcsA, отличающихся друг от друга состоянием (открытая или закрытая конформация), связанными с каналом низкомолекулярными лигандами, ионами в селективном фильтре (K^+ , Cs^+ , Rb^+ , Tl^+), а также мутациями и гибридными вставками, призванными имитировать поровые домены эукариотических калиевых каналов. Во всех этих структурах конформация Р-петель и строение интерфейса потенциального взаимодействия с блокаторами поры остаются практически неизменными.

Еще один прокариотический калиевый канал, кристаллографическую структуру которого удалось получить, – потенциал-управляемый канал KvAP архей (табл. 2). Главное отличие этого канала от KcsA состоит в более сложной структуре α -субъединиц, которые содержат шесть спиралей (S1–S6). Спираль S5 и S6 четырех субъединиц, подобно спиральям M1 и M2 канала KcsA, собраны в конусообразную структуру и образуют пору канала, а спираль S1–S4 формируют потенциал-чувствительный домен (VSD-домен).

В настоящее время известно лишь несколько структур эукариотических калиевых каналов (табл. 2), первой из которых стала структура Kv1.2 [43], улучшенная позднее [44]. Как и в случае канала

KvAP, α -субъединицы Kv1.2 имеют в своем составе шесть спиралей (S1–S6), образующих пору канала (спираль S5–S6), и VSD-домен (S1–S4). В улучшенной структуре Kv1.2 дополнительно различимы петли S1–S2, S2–S3 и S3–S4, соединяющие спираль VSD-домена, а также боковые цепи ряда остатков спиралей S2, S4 и петли S5–P. Анализ структуры Kv1.2 выявил значительное сходство в строении порового домена этого канала и KvAP, и KcsA (рис. 4). Так, структура СФ и примыкающих к нему остатков характеризуется удивительной консервативностью (среднеквадратичное отклонение положения α -атомов остатков 65–85 KcsA от положения соответствующих им остатков Kv1.2 составляет менее 0.8 Å) при сходстве последовательностей, составляющем 65%. В то же время поровые домены Kv1.2 и KcsA немного отличаются по длине и конформации Р-петель (рис. 3), а также по конформации трансмембранных спиралей ближе к цитоплазматической стороне мембраны. Сравнительный анализ кристаллографических структур канала Kv1.2 показал, что конформация Р-петель определена неоднозначно: наиболее часто реализуется конформация, характерная для структур с pdb-кодами 2A79 и 3LNM, а конформация, наблюдаемая в структуре с pdb-кодом 3LUT, уникальна.

При высоком сходстве поровых доменов Kv1.2 и KvAP структура их VSD-доменов значительно от-

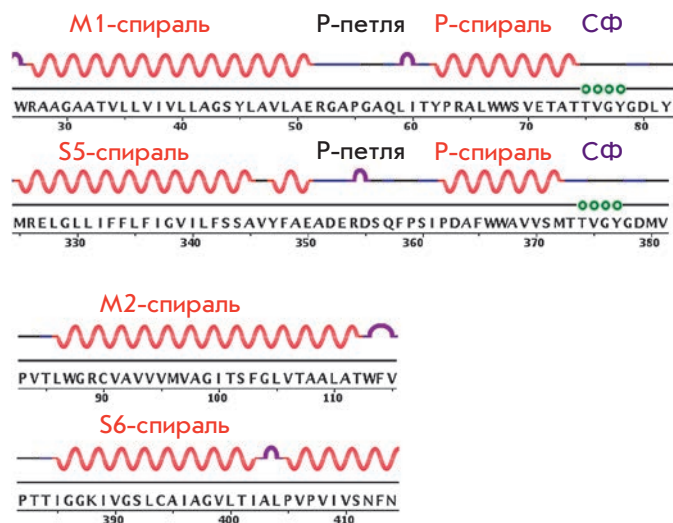


Рис. 4. Сопоставление первичной и вторичной структуры канала KcsA (pdb-код 1BL8) и порового домена канала K_v1.2 (pdb-код 2A79). Кружками показаны остатки, контактирующие с ионами K⁺ в СФ (фрагмент мотива TVGYG). Обозначения вторичной структуры как на рис. 2.

личается. Предполагается, что эти отличия связаны с искажением структуры, возникающим при выделении и кристаллизации канала K_vAP [43].

Структуры других эукариотических K_v-каналов пока не определены, но на основании высокой гомологии предполагается, что структура их поровых доменов сходна с каналом K_v1.2.

Экспериментальные структуры комплексов калиевых каналов с пептидными блокаторами

Первая структура комплекса калиевого канала с пептидным блокатором была определена методом ЯМР для модифицированного KcsA и харибдотоксина (табл. 2) благодаря использованию уже известных индивидуальных структур канала и блокатора [17]. В структуру природного KcsA, не связывающего известные пептидные блокаторы эукариотических калиевых каналов, были введены три мутации (Q58A, T61S, R64D), повысившие сродство KcsA к харибдотоксину и усилившие тем самым его сходство с эукариотическими каналами семейства Shaker. Еще три мутации (F103Y, T107F, L110V) были введены в центральную полость для придания сходства с каналом K_v11.1 человека. Анализ спектров ЯМР показал, что связывание харибдотоксина приводит к структурным перестройкам участков канала, ответственных за взаимодействие, а расположение спиралей М1 и М2 остается неизменным. Главная цепь токсина не претерпевает существенных изме-

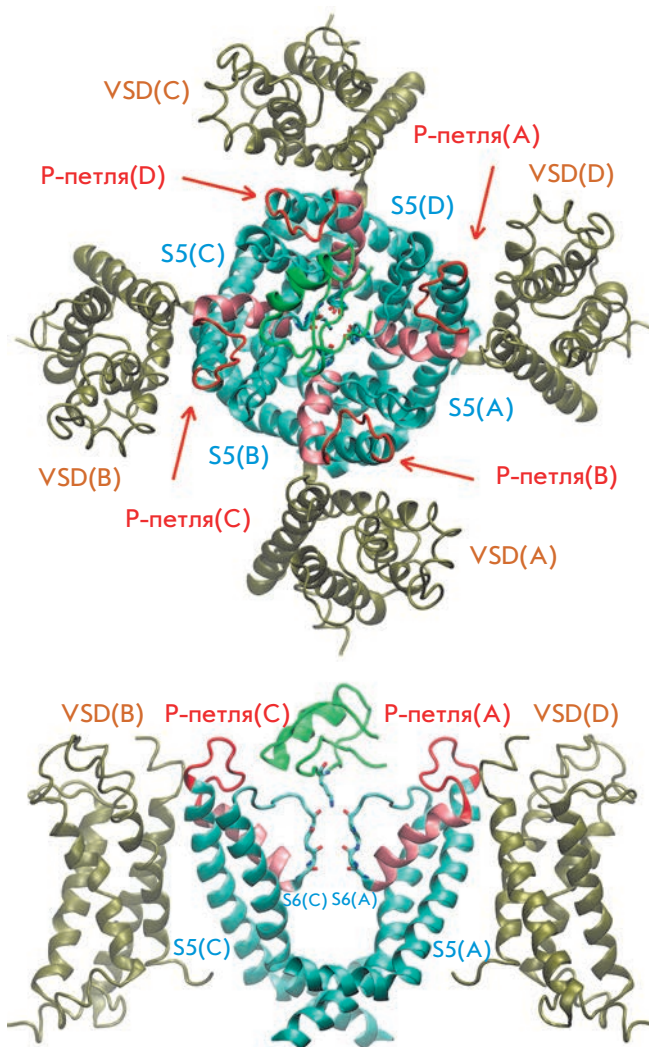


Рис. 5. Кристаллографическая структура комплекса харибдотоксина с гибридным каналом K_v1.2-2.1 (pdb-код 4JTA) в ленточном представлении (вид сверху и сбоку). Для наглядности показаны только две α-субъединицы. Оливковый цвет – потенциал-чувствительный домен (VSD). Токсин — ярко-зеленый, а его остаток K27, направленный в пору канала, показан в стержневом представлении. Остальные обозначения, как на рис. 3. А, В, С, D – субъединицы канала

нений в процессе связывания. Доказано связывание K27 харибдотоксина с порой канала, а также описан интерфейс взаимодействия.

Недавно методом PCA получили структуру комплекса гибридного канала K_v1.2-2.1 с харибдотоксином (табл. 2, рис. 5). Гибридизация затронула VSD-домен: в канале K_v1.2 «лопасть» сенсора потенциала (voltage-sensor paddle; участок S3b–S4 спирали) была заменена на аналогичную от канала K_v2.1, как уже опробовано ранее [45]. Анализ структуры

комплекса показал, что ни канал, ни токсин не претерпели заметных изменений структуры при связывании [18].

Рассмотрение структур комплексов харибдотоксина с каналами (модифицированным KcsA и гибридным $K_v1.2-2.1$) показывает, что значительное число взаимодействий реализуется между аминокислотными остатками токсина и петлями каналов. Заметим, что Р-петли являются наиболее варибельным фрагментом K_v -каналов и, возможно, что именно этой варибельностью обусловлены отличия в силе взаимодействий блокатора с различными каналами.

МОДЕЛИРОВАНИЕ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ ПО ГОМОЛОГИИ

В ситуации, когда известна трехмерная структура лишь нескольких калиевых каналов и их комплексов с пептидными блокаторами, методы молекулярного моделирования важны и востребованы для анализа структурных особенностей всего многообразия K_v -каналов и комплексов. Основным вычислительным подходом здесь является моделирование по гомологии [46], которое состоит в построении трехмерной модели белка с неизвестной структурой на основе данных о структуре гомологичного белка. Моделирование по гомологии включает в себя несколько этапов [47]:

- поиск потенциальных шаблонов – белков с известной структурой, максимально гомологичных моделируемому белку, например, с помощью веб-сервисов BLAST [48] или FASTA [49];

- выравнивание последовательностей шаблона и моделируемого белка, например, с помощью веб-сервиса CLUSTALW [50];

- построение структурной модели неизвестно-го белка по шаблону путем сохранения одинаковых остатков, замены различающихся и достройки фрагментов, отсутствующих в шаблоне, например, с помощью программы Modeller [51].

Отметим, что использование веб-сервиса Swiss-model [52] позволяет выполнить все эти три этапа автоматически.

Необходимое условие применимости моделирования по гомологии – значительное (не ниже 20–30%) сходство последовательностей моделируемого белка и шаблона [53]. Поровые домены калиевых каналов идеально соответствуют этому условию: сходство K_v -каналов в этом домене достигает 80% и более, а основные различия локализованы в небольшой по размеру поровой петле. Расшифровка структуры канала $K_v1.2-2.1$ в комплексе с харибдотоксином [18] подтвердила данные других экспериментальных методов о том, что VSD-домен не участвует в связывании блокаторов поры. Поэтому при моделировании

комплексов блокаторов с K_v -каналами ограничиваются рассмотрением только поровых доменов.

Сходство последовательностей поровых доменов K_v -каналов и бактериального канала KcsA достигает 30%, поэтому структура последнего также используется в качестве шаблона для моделирования поровых доменов K_v -каналов и их комплексов с блокаторами [55, 69, 70, 72] наряду с некоторыми другими структурами (табл. 2). Обоснованием такого подхода к моделированию служат, в том числе, экспериментальные данные, показывающие, что гибридные каналы KcsA- $K_v1.x$ (KcsA, в котором Р-петля заменена гомологичной петлей канала $K_v1.x$, $x = 1, 2, 3, 6$) сохраняют специфический профиль высокоаффинного связывания блокаторов, характерный для каналов $K_v1.x$ [73–75].

Моделирование по гомологии, как правило, сопровождается дальнейшим изучением структуры получаемых моделей с помощью методов броуновской динамики (БД), молекулярного докинга или молекулярной динамики (МД).

БРОУНОВСКАЯ ДИНАМИКА

Метод БД – это разновидность метода стохастической динамики, рассматривающий движение молекул как твердых тел под действием внешних сил, сил трения, имитирующих взаимодействие с молекулами растворителя, и случайных сил. БД широко применяется для анализа ионного транспорта [76, 77] и ограничено – для моделирования взаимодействий токсинов с каналами [78, 79]. При этом используют приближение, в котором каналы и блокаторы полагают жесткими структурами, растворитель – неявным, а мембрану – идеализированным диэлектрическим слоем [20]. Расчеты БД в данном приближении позволяют значительно снизить требования к вычислительным ресурсам и достичь таких времен расчета, на которых проявляются макроскопические эффекты [80].

Расчет методом БД связывания токсина Lq2 (табл. 1) с модифицированным каналом KcsA позволил построить модель комплекса, выявить взаимодействующие с каналом аминокислотные остатки пептида и описать характер их взаимодействий [78]. Поскольку в методе БД структуры блокатора и канала считаются жесткими, то для учета конформационной подвижности блокатора использовали все 22 варианта структуры Lq2, представленные в pdb-файле. Один из этих вариантов обеспечил получение модели комплекса, хорошо соответствующей экспериментальным данным. Подвижность канала в расчетах не учитывали.

Более совершенный способ учета конформационной подвижности в расчетах БД – их сочетание с рас-

четами МД, как это сделано при анализе комплексов канала $K_v1.3$ с аджитоксином, харибдоксином, калиотоксином, маргатоксином и ноксиустоксином [79]. Сравнение расчетных значений энергии электростатического взаимодействия в комплексах и логарифмов констант диссоциации комплексов выявило их высокую корреляцию ($R^2 = 0.60$). Отметим, что в случае калиотоксина обнаружено несоответствие этой корреляции, которое можно объяснить использованием некорректной структуры пептида (pdb-код 1КТХ), значительно отличавшейся от структур гомологичных пептидов аджитоксина и OSK1. Уточненные структуры калиотоксина (pdb-коды 1XSW, 3ODV), полученные позже, не имеют такого отличия.

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДОКИНГ

Молекулярный докинг — метод, цель которого состоит в поиске наиболее достоверной ориентации и конформации лиганда в сайте связывания белка-мишени, широко используется для моделирования комплексов блокаторов с калиевыми каналами [38, 62, 80].

При выполнении расчетов белок-белкового докинга одна из молекул фиксируется в пространстве, а вторая пристыковывается к ней с разных сторон и в разных ориентациях. Для каждой конфигурации полученного комплекса производят расчеты оценочной функции, основанной на комплементарности свойств поверхности, электростатических взаимодействиях, ван-дер-ваальсовском отталкивании, энергии десольватации, энергии внутренних напряжений (деформации валентных связей), водородных связей и взаимодействия ароматических групп.

Для молекулярного докинга необходимо применение одной из специализированных программ, таких, как AutoDock (<http://autodock.scripps.edu/>) [81], RosettaDock [82], BiGGER [83], HADDOCK (<http://haddock.science.uu.nl/>) [84] или ZDOCK (<http://zdock.umassmed.edu/>) [85]. Наиболее часто и успешно структуры комплексов канал-блокатор предсказывают с использованием трех последних программ [37, 86, 87].

Особенностью программы HADDOCK является ее ориентация на моделирование взаимодействия больших и гибких пептидных лигандов. Эту программу применяли при создании универсального протокола докинга для предсказания профилей селективности токсинов семейства α -КТх [87] и добились существенных успехов при моделировании структуры комплексов, но традиционная проблема всех задач молекулярного докинга — выбор наиболее правильной из предсказываемых конформаций — была решена не полностью, что указывает на несовершенство используемых оценочных функций.

Молекулярный докинг может использоваться и для учета конформационной подвижности токсинов. Так, в работе по улучшению селективности связывания аналогов токсина C_{ss}20 [58] проанализировали более миллиона решений молекулярного докинга, выполнив визуальное рассмотрение 2000 лучших решений. Недостатком такого подхода, помимо очевидной трудоемкости, является отмеченное выше несовершенство используемых оценочных функций: методы молекулярного докинга позволяют получить сотню лучших решений, среди которых гарантированно есть правильное, но не позволяют однозначно распознать его. Более оптимально проводить молекулярный докинг не столь масштабно, но сопровождать его оптимизацией получаемых решений с помощью МД, а константы связывания вычислять с помощью расчетов свободной энергии [20].

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДИНАМИКА

В расчетах молекулярной динамики временная эволюция системы взаимодействующих атомов или частиц отслеживается интегрированием их уравнений движения. Точность расчетов МД зависит от выбора так называемого силового поля, т.е. математических функций и их параметров, используемых для описания потенциальной энергии системы частиц. Функции силового поля и наборы параметров получают из экспериментальных работ и квантово-механических расчетов. При правильном использовании существующие в настоящее время силовые поля позволяют получать удивительно точные результаты [88]. Полноатомные силовые поля, такие, как OPLS-AA и различные варианты CHARMM, учитывают все типы атомов в системе. Альтернативно, силовые поля с объединенными атомами, такие, как GROMOS и OPLS-UA, рассматривают тяжелые неполярные атомы (углерод, сера) и связанные с ними атомы водорода в качестве единых центров взаимодействия [89].

При моделировании K_v -каналов наиболее часто используют программный пакет NAMD [90] в сочетании с силовым полем CHARMM [91], включая его варианты CHARMM22, CHARMM27 и CHARMM36 (табл. 3). Отметим, что поле CHARMM27 оптимизировано для расчетов ДНК, РНК и липидов, а в комбинации с полем CHARMM22 — для исследования ДНК-белковых взаимодействий. Хотя применение CHARMM27 для анализа белок-белковых взаимодействий представляется не совсем оптимальным, результаты расчета свободной энергии связывания, выполненные с его применением [60, 66, 92], хорошо согласуются с экспериментальными значениями (табл. 3). В CHARMM36 по сравнению с CHARMM22 введены изменения, улучшающие исследование кон-

Таблица 3. Сравнение расчетных (ΔG_{calc}) и экспериментальных (ΔG_{exp}) значений свободной энергии взаимодействия некоторых K_v -каналов с пептидными блокаторами поры

Канал (pdb-код шаблона)	Токсин (pdb-код структуры или шаблона)	Силовое поле метода МД	ΔG_{calc} , ккал/моль	ΔG_{exp} , ккал/моль	Ссылка
$K_v1.1$ (2R9R)	HsTx1 (1QUZ)	NAMD, CHARMM36	-10.1 ± 0.6	-11.1 ± 0.1	[68]
	ShK (1ROO)	NAMD, CHARMM22	-14.3 ± 1.1	-14.7 ± 0.1	[63]
	ShK-K-amide (1ROO)	NAMD, CHARMM22	-11.8 ± 1	-12.3 ± 0.1	[64]
	ShK-K18A (1ROO)	NAMD, CHARMM27	-11.7 ± 0.7	-11.3 ± 0.1	[66]
$K_v1.2$ (2R9R)	HsTx1 (1QUZ)	NAMD, CHARMM36	-8.9 ± 0.6	-9.5 ± 0.1	[68]
	ShK (1ROO)	NAMD, CHARMM22	-10.1 ± 1.1	-11 ± 0.1	[63]
	MTx (1TXM)	NAMD, CHARMM36	-12.6	-12.6	[92]
$K_v1.3$ (3LUT)	ChTx (2A9H)	NAMD, CHARMM27	-10.4	-12.5	[60]
	MgTx (1MTX)	NAMD, CHARMM36	-11.5	-13.9	[62]
$K_v1.3$ (2A79)	ChTx (2CRD)	GROMACS, OPLS-AA	-26 ± 1	-11.4 ± 0.2	[59]
$K_v1.3$ (2R9R)	HsTx1 (1QUZ)	NAMD, CHARMM36	-14.0 ± 0.6	-14.9 ± 0.2	[68]

формационного пространства при сворачивании белков, их сборке в комплексы и функционально значимых конформационных изменениях [93].

Современные МД-расчеты комплексов каналов с токсинами позволяют учитывать взаимодействия с липидами мембраны. При этом расчетная структура комплекса токсинов, связывающихся с VSD-доменом каналов, зависит от липидного состава мембраны [94]. При моделировании комплексов с пептидными блокаторами поры не обязательно учитывать липидный бислой в явном виде [55]. Это подтверждается хорошим согласием между экспериментальными данными и результатами расчетов свободной энергии образования таких комплексов, оптимизированных методом МД [95, 96]. Обоснованный отказ от учета липид-белковых взаимодействий при моделировании комплексов значительно уменьшает требования к вычислительным ресурсам, позволяя увеличить длину рассчитываемых МД траекторий и полноту исследования конформационного пространства. Еще один прием, позволяющий снизить ресурсоемкость расчетов, – применение модели неявного растворителя, в частности обобщенной борновской модели (generalized Born solvation model). Вне зависимости от используемой модели растворителя расчеты МД в настоящее время проводят с длиной траектории от 15–20 нс [68, 92] до 40–50 нс [62, 97].

В ряде случаев для расчета и анализа комплексов токсинов с каналами используют метод направленной МД. Метод заключается в расчете МД при постепенном уменьшении расстояния между одной или несколькими парами остатков, взаимодействие которых при образовании комплекса представляется наиболее существенным. Достоинство этого метода состоит в учете экспериментальных данных о вза-

имодействующих остатках, что позволяет считать образуемые контакты более точными. Метод направленной МД хорошо зарекомендовал себя при анализе связывания мауротоксина с каналом $K_v1.2$ [92], а также маргатоксина и хонготоксина с $K_v1.3$ [62].

РАСЧЕТ ЭНЕРГИИ КОМПЛЕКСА КАНАЛ–ТОКСИН

Для оценки достоверности структуры комплексов, полученных в результате моделирования, применяют расчеты свободной энергии связывания ΔG . Такие расчеты имеют фундаментальное значение для теоретической оценки возможности осуществления многих важных биологических процессов, в том числе формирования прочных комплексов лигандов с рецепторами и конформационных изменений в них [98].

Свободную энергию взаимодействия калиевых каналов с токсинами чаще всего оценивают с использованием метода расчета потенциала средней силы (ПСС), включающего получение набора конформаций методом зонтичной выборки [99]. Во многих случаях этот метод позволяет получить значения ΔG , которые согласуются с экспериментальными данными (табл. 3), что свидетельствует о хорошей точности численного моделирования и применимости такого анализа для конструирования пептидных блокаторов с заданными свойствами. В работе [59], где рассчитанное значение ΔG превышало измеренное более чем в 2 раза, это расхождение объяснено различиями в ионной силе растворов, использованных для расчетов и в эксперименте. Альтернативно причина расхождения может быть связана с меньшей точностью расчетов на основе силового поля OPLS-AA по сравнению с вариантами поля CHARMM (табл. 3).

Менее распространенный метод расчета свободной энергии – ММ-PBSA (molecular mechanics/Poisson-Boltzmann surface area), сочетает использование мо-

лекулярной механики для расчета потенциальной энергии молекул в вакууме и решение уравнения Пуассона–Больцмана для расчета свободной энергии сольватации. Метод реализован в программных пакетах AMBER [100] и GROMACS [101] и применительно к комплексам калиевых каналов с блокаторами качественно согласуется с экспериментальными данными [102].

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

Моделирование комплексов K_v -каналов с природными и модифицированными пептидными блокаторами позволяет глубже понять структурные особенности и ключевые принципы межмолекулярных взаимодействий в них, детально описать интерфейсы взаимодействий, объяснить наблюдаемые интенсивность и спектр активностей блокаторов.

Моделирование по гомологии с использованием шаблонов мауротоксина (*табл. 1*) и KcsA позволило объяснить экспериментальные результаты по связыванию токсина P11 и его мутантов с каналом K_v 1.2 [86]. Выполнив молекулярный докинг, обнаружили важную роль основных остатков R5, R12, R28 и K31 пептида в стабилизации комплекса.

Аналогичный подход использован для определения интерфейса взаимодействия канала K_v 1.2 с кобатооксином (*табл. 1*) и его искусственным аналогом ACoTx1, отличающимся заменами T7P и D9Q [37]. Установили, что направление дипольного момента токсина не является определяющим для объяснения его селективности, и заключили, что молекулярное моделирование облегчает разработку более аффинных и/или селективных аналогов существующих блокаторов.

Сравнительный анализ результатов молекулярного докинга токсина Vm24 и ряда других токсинов позволил найти объяснение высокой селективности Vm24 в отношении канала K_v 1.3 [38]. Эта селективность, как полагают, связана с образованием плотных контактов N-конца Vm24 с каналом, что нехарактерно для других токсинов семейства α -КТх (*рис. 2*).

С использованием молекулярного докинга для предсказания структуры комплекса ShK с каналом K_v 1.3 и молекулярной динамики для оптимизации этой структуры обнаружены два вероятных положения блокатора в комплексе [55]. В первом случае СФ канала закрывался остатком K22 токсина, во втором – остатком R24. На основе расчета методом ММ-РBSA изменения ΔG при замене некоторых остатков в молекуле токсина на аланин и сопоставления расчетов с экспериментальными данными о константах диссоциации комплексов предпочтение было отдано второму варианту с участием R24.

Для исследования образования комплексов каналов с токсинами предложен метод анализа цикла мутаций (mutant cycle analysis), разработанный при картировании взаимодействий канала Shaker с аджитоксином [103]. Интуитивно понятно, что влияние одновременной замены остатка токсина и остатка канала на константу диссоциации комплекса зависит от того, взаимодействуют ли эти аминокислотные остатки, и может быть описано коэффициентом взаимосвязи. Учет экспериментальных данных о взаимодействующих остатках позволяет смоделировать структуру комплекса с помощью молекулярного докинга. По мере развития алгоритмов расчета ΔG метод анализа цикла мутаций находит все более широкое применение в молекулярном моделировании комплексов блокаторов с калиевыми каналами [55, 57, 95, 102, 104].

В ходе изучения взаимодействия мауротоксина с каналом K_v 1.2 [105] методами молекулярного докинга и МД были рассмотрены несколько возможных ориентаций токсина в комплексе. Расчеты методом ММ-РBSA изменений ΔG при введении аланиновых замен в сопоставлении с экспериментальными данными позволили установить наиболее вероятную ориентацию токсина и идентифицировать важные для формирования комплекса аминокислотные остатки токсина (K23, I25, Y32) и канала (R254, F359, R360, D379, V381, T383).

Изучение связывания блокатора ADWX-1 с каналами K_v 1.1 и K_v 1.3, поддержанное молекулярным моделированием структуры их комплексов [106], позволило предложить три варианта расположения поровых петель при взаимодействии с блокаторами: открытое, полуоткрытое (полузакрытое) и закрытое. В первом случае токсин взаимодействует лишь с остатками, окружающими СФ, и петли не влияют на связывание. Именно так, согласно [105], формируется комплекс мауротоксина с K_v 1.2. Во втором случае петли оказывают небольшое влияние на связывание, как, например, в комплексах ADWX-1 с каналами K_v 1.1 и K_v 1.3. В третьем случае и петли, и область вокруг СФ определяют интенсивность и селективность взаимодействия с токсином.

Показано [60], что электростатические взаимодействия в комплексах харибдотоксина, OSK1 и ShK с каналом K_v 1.3 преобладают над ван-дер-ваальсовыми, а ключевыми аминокислотными остатками токсинов в этих взаимодействиях являются лизин и аргинин: K27 и R25 у харибдотоксина, K27 и R24 – у OSK1, а также K22 и R11 – у ShK (*рис. 2*). Анализ энергии связывания, выполненный посредством расчета ПСС, дал значения, согласующиеся с экспериментальными данными (*табл. 3*). Высокая ресурсоемкость расчетов, необходимая для обеспе-

чения их точности, сдерживает широкое применение численного анализа энергии связывания и требует разработки более эффективных вычислительных процедур. Отметим, что отличия моделей комплексов ShK с $K_v1.3$, полученных в работах [55, 62], требуют проведения дополнительных исследований.

Применение МД для изучения конформационных изменений в гибридном канале KcsA- $K_v1.3$ при взаимодействии с калиотоксином [72] позволило построить структурную модель комплекса и выдвинуть гипотезу об участии в связывании токсина остатков Y78 и D80 канала, которое сопровождается изменением их ориентации. Эта гипотеза подтверждена данными спектроскопии ЯМР.

На раннем этапе изучения блокаторов калиевых каналов была выдвинута [107] и приобрела популярность гипотеза о том, что способность различных животных токсинов распознавать K_v -каналы связана с эволюционно-консервативной функциональной диадой, состоящей из лизина, взаимодействующего с СФ и отстоящего от него на 6–7 Å гидрофобного остатка (Tyr, Phe или Leu). В дальнейшем, в том числе и с применением методов молекулярного моделирования, показали, что избирательность связывания токсинов с различными K_v -каналами зависит от многих других аминокислотных остатков. Степень, в которой функциональная диада определяет силу взаимодействия, также варьирует у разных токсинов и модулируется вкладом в комплексобразование дополнительных аминокислотных остатков этих пептидов [108]. Результаты молекулярного моделирования позволяют заключить, что интерфейсы взаимодействия токсинов с каналами формируются сразу многими аминокислотами, создающими сложные системы связей. Эти системы существенно отличаются не только для пептидов из разных групп и подсемейств, но и токсинов с высокой гомологией.

Повышение селективности блокаторов K_v -каналов представляет актуальную задачу современной фармакологии, поскольку природные токсины зачастую имеют высокую аффинность сразу к нескольким типам каналов. Выявление достоверных отличий во взаимодействиях исследуемого токсина с родственными K_v -каналами, которое обеспечивают методы молекулярного моделирования, открывает возможность подбора аминокислотных замен, усиливающих или ослабляющих сродство токсина к заданному каналу.

Токсин Css20 характеризуется избирательностью связывания с каналами $K_v1.2$ и $K_v1.3$ по сравнению с $K_v1.1$ и $K_v1.4$ [58]. Моделирование структуры комплексов показало, что аминокислотные остатки каналов $K_v1.2$ и $K_v1.3$, контактирующие с Css20, со-

средоточены в основном вокруг СФ и в Р-петле (семь из восьми остатков, различающихся в рассматриваемых каналах). Установлено, что остаток K28 важен для связывания с $K_v1.2$ и $K_v1.3$, а остатки Q11, I30, K33 и Y37 образуют благоприятные контакты только с каналом $K_v1.2$. Показано, что дополнительные благоприятные контакты с $K_v1.2$ могут возникнуть при замене A19 и A20 токсина на положительно заряженные Arg или Lys. Предполагается, что введение подходящих мутаций позволит повысить селективность аналогов Css20 по отношению к одному из каналов $K_v1.2$ и $K_v1.3$.

Методику, включающую проведение расчетов МД и ПСС, применили к изучению взаимодействия OSK1 с каналами $K_v1.1$, $K_v1.2$, $K_v1.3$ и подбору аминокислотных замен, способствующих увеличению селективности этого блокатора по отношению к $K_v1.3$ [65]. Сделан вывод, что замены K9S и S11R приведут к улучшению связывания с $K_v1.3$ при снижении связывания с $K_v1.1$ и $K_v1.2$. Расчеты констант связывания показали, что данные замены тысячекратно повышают селективность связывания пептида с каналом $K_v1.3$ и в 100 раз усиливают аффинность к этому каналу.

Сайт-направленный мутагенез использовали для создания высокоаффинного по отношению к каналу $K_v1.3$ токсина ADWX-1 путем введения замен G11R, I28T и D33N в токсин VmKTX [102]. Остатки, подлежащие замене, определяли, исходя из анализа пространственной структуры комплекса ADWX-1 с $K_v1.3$, полученной методами молекулярного моделирования. Расчеты энергии связывания ADWX-1 и ряда его мутантов (R23A, F24A, K26A, N29A, T35A) выявили важную роль положительно заряженных остатков в узнавании токсином канала $K_v1.3$. Кроме того, установлено, что замены R23A и F24A мешают взаимодействию ключевого остатка K26 с порой канала. Экспериментально измеренная аффинность ADWX-1 к $K_v1.3$ повысилась почти в 100 раз по сравнению с исходным VmKTx, а избирательность взаимодействия с каналом $K_v1.3$ усилилась в 340 и более чем 10^5 раз по сравнению с каналами $K_v1.1$ и $K_v1.2$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Более 30 масштабных исследований, проведенных с применением компьютерного моделирования, позволили существенно углубить наше понимание особенностей структуры калиевых каналов и их комплексов с токсинами. Вычислительные эксперименты обеспечили изучение механизмов взаимодействия и межмолекулярных контактов в комплексах пептидных блокаторов с K_v -каналами, создали основу для изучения молекулярных основ селективности и сродства токсинов к каналам, заложили базис

для направленной разработки блокаторов с заданными свойствами.

Наиболее распространенный алгоритм моделирования комплексов канал–блокатор включает моделирование структуры блокатора и канала по гомологии с уже существующими структурами, молекулярный докинг для предсказания структуры комплекса, а также проведение МД для релаксации структуры комплекса и расчет свободной энергии связывания методом ММ-PBSA или методом расчета ПСС. Конкретная реализация этого алгоритма, используемое программное обеспечение и параметры расчетов варьируют с учетом конкретных решаемых задач и индивидуальных предпочтений исследователей. Прослеживается общая тенденция в отказе от броуновской динамики при моделировании и переходе от моделей с неявным растворителем к явному учету растворителя, а также от расчета свободной энергии методом ММ-PBSA к расчетам ПСС.

Для успешного и быстрого расширения разработанных методов молекулярного моделирования на различные типы калиевых каналов желательно иметь структуры высокого разрешения представителей этих каналов и (или) их комплексов с блокаторами. В свою очередь, построение правильных моделей комплексов требует совершенствования силовых полей, дальнейшей разработки высокопроизводительных алгоритмов докинга и методов оценки свободной энергии образования комплексов.

С учетом важного биологического и медицинского значения калиевых каналов вычислительные методы будут все более востребованы, поддерживая, дополняя, а во многих случаях облегчая и даже заменяя сложные и дорогостоящие экспериментальные исследования. ●

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 14-14-00239).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wulff H., Zhorov B.S. // *Chem. Rev.* 2008. V. 108. № 5. P. 1744–1773.
- Haddy F.J., Vanhoutte P.M., Feletou M. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2006. V. 290. № 3. P. R546–R552.
- Tian C., Zhu R., Zhu L., Qiu T., Cao Z., Kang T. // *Chem. Biol. Drug Des.* 2014. V. 83. № 1. P. 1–26.
- Maljevic S., Lerche H. // *J. Neurol.* 2013. V. 260. № 9. P. 2201–2211.
- Castle N. // *Expert Opin. Ther. Pat.* 2010. V. 20. № 11. P. 1471–1503.
- Huang X., Jan L.Y. // *J. Cell Biol.* 2014. V. 206. № 2. P. 151–162.
- Grizel A.V., Glukhov G.S., Sokolova O.S. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. № 23. P. 10–26.
- Shieh C.C., Coghlan M., Sullivan J.P., Gopalakrishnan M. // *Pharmacol. Rev.* 2000. V. 52. P. 557–594.
- Jan L.Y., Jan Y.N. // *J. Physiol.* 2012. V. 590(Pt 11). P. 2591–2599.
- Volkers L., Rook M.B., Das J.H., Verbeek N.E., Groenewegen W.A., van Kempen M.J., Lindhout D., Koeleman B.P. // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 462. № 1. P. 24–29.
- Angulo E., Noé V., Casadó V., Mallol J., Gomez-Isla T., Lluís C., Ferrer I., Ciudad C.J., Franco R.J. // *Neurochem.* 2004. V. 91. № 3. P. 547–557.
- Martin C.A., Matthews G.D., Huang C.L. // *Heart.* 2012. V. 98. № 7. P. 536–543.
- Giudicessi J.R., Ye D., Kritzerberger C.J., Nesterenko V.V., Tester D.J., Antzelevitch C., Ackerman M.J. // *Hum. Mutat.* 2012. V. 33. № 6. P. 989–997.
- Xu R., Cao M., Wu X., Wang X., Ruan L., Quan X., Lü C., He W., Zhang C. // *Clin. Immunol.* 2012. V. 142. № 2. P. 209–217.
- Chhabra S., Chang S.C., Nguyen H.M., Huq R., Tanner M.R., Londono L.M., Estrada R., Dhawan V., Chauhan S., Upadhyay S.K., et al. // *FASEB J.* 2014. V. 28. P. 3952–3964.
- Zhuang G.Q., Wu W., Liu F., Ma J.L., Luo Y.X., Xiao Z.X., Liu Y., Wang W., He Y. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 379. № 4. P. 812–816.
- Yu L., Sun C., Song D., Shen J., Xu N., Gunasekera A., Hajduk P.J., Olejniczak E.T. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. № 48. P. 15834–15841.
- Banerjee A., Lee A., Campbell E., Mackinnon R. // *Elife.* 2013. V. 2013. № 2. P. 1–22.
- Chi V., Pennington M.W., Norton R.S., Tarcha E.J., Londono L.M., Sims-Fahey B., Upadhyay S.K., Lakey J.T., Iadonato S., Wulff H., et al. // *Toxicon.* 2012. V. 59. № 4. P. 529–546.
- Gordon D., Chen R., Chung S.-H. // *Physiol. Rev.* 2013. V. 93. № 2. P. 767–802.
- Kuang Q., Purhonen P., Hebert H. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. V. 72. P. 3677–3693.
- MacKinnon R. // *FEBS Lett.* 2003. V. 555. № 1. P. 62–65.
- Bontems F., Gilquin B., Roumestand C., Ménez A., Toma F. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 34. P. 7756–7764.
- Renisio J.G., Lu Z., Blanc E., Jin W., Lewis J.H., Bornet O., Darbon H. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1999. V. 34. № 4. P. 417–426.
- Dauplais M., Gilquin B., Possani L.D., Gurrola-Briones G., Roumestand C., Ménez A. // *Biochemistry.* 1995. V. 34. № 51. P. 16563–16573.
- Johnson B.A., Stevens S.P., Williamson J.M. // *Biochemistry.* 1994. V. 33. № 50. P. 15061–15070.
- Pragl B., Koschak A., Trieb M., Obermair G., Kaufmann W.A., Gerster U., Blanc E., Hahn C., Prinz H., Schütz G., et al. // *Bioconjug. Chem.* 2002. V. 13. № 3. P. 416–425.
- Lange A., Becker S., Seidel K., Giller K., Pongs O., Baldus M. // *Angew. Chem. Int.* 2005. V. 44. № 14. P. 2089–2092.
- Krezel A.M., Kasibhatla C., Hidalgo P., MacKinnon R., Wagner G. // *Protein Sci.* 1995. V. 4. № 8. P. 1478–1489.
- Renisio J.G., Romi-Lebrun R., Blanc E., Bornet O., Nakajima T., Darbon H. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2000. V. 38. № 1. P. 70–78.
- Jaravine V.A., Nolde D.E., Reibarkh M.J., Korolkova Y.V., Kozlov S.A., Pluzhnikov K.A., Grishin E.V., Arseniev A.S. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 6. P. 1223–1232.
- Carrega L., Mosbah A., Ferrat G., Beeton C., Andreotti N., Mansuelle P., Darbon H., De Waard M., Sabatier J.M. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2005. V. 61. № 4. P. 1010–1023.
- Blanc E., Sabatier J.M., Kharrat R., Meunier S., el Ayeub M., Van Rietschoten J., Darbon H. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 1997. V. 29. № 3. P. 321–333.

34. Savarin P., Romi-Lebrun R., Zinn-Justin S., Lebrun B., Nakajima T., Gilquin B., Menez A. // *Protein Sci.* 1999. V. 8. № 12. P. 2672–2685.
35. Guijarro J.I., M'Barek S., Gómez-Lagunas F., Garnier D., Rochat H., Sabatier J.M., Possani L., Delepierre M. // *Protein Sci.* 2003. V. 12. № 9. P. 1844–1854.
36. Wu G., Li Y., Wei D., He F., Jiang S., Hu G., Wu H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000. V. 276. № 3. P. 1148–1154.
37. Jouirou B., Mosbah A., Visan V., Grissmer S., M'Barek S., Fajloun Z., van Rietschoten J., Devaux C., Rochat H., Lippens G., et al. // *Biochem. J.* 2004. V. 377. Pt 1. P. 37–49.
38. Gurrola G.B., Hernández-López R.A., Rodríguez de la Vega R.C., Varga Z., Batista C.V., Salas-Castillo S.P., Panyi G., del Río-Portilla F., Possani L.D. // *Biochemistry.* 2012. V. 51. № 19. P. 4049–4061.
39. Tudor J.E., Pállaghy P.K., Pennington M.W., Norton R.S. // *Nat. Struct. Biol.* 1996. V. 3. № 4. P. 317–320.
40. Berndt K.D., Güntert P., Wüthrich K. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234. № 3. P. 735–750.
41. Romi-Lebrun R., Martin-Eauclaire M.F., Escoubas P., Wu F.Q., Lebrun B., Hisada M., Nakajima T. // *Eur. J. Biochem.* 1997. V. 245. № 2. P. 457–464.
42. Zhu S., Peigneur S., Gao B., Luo L., Jin D., Zhao Y., Tytgat J. // *Mol. Cell. Proteomics.* 2011. V. 10. № 2. P. M110.002832.
43. Long S.B., Campbell E.B., Mackinnon R. // *Science.* 2005. V. 309. № 5736. P. 897–903.
44. Chen X., Wang Q., Ni F., Ma J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 25. P. 11352–11357.
45. Long S.B., Tao X., Campbell E.B., MacKinnon R. // *Nature.* 2007. V. 450. № 7168. P. 376–382.
46. Giorgetti A., Carloni P. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. V. 7. № 1. P. 150–156.
47. Cavasotto C.N., Phatak S.S. // *Drug Discovery Today.* 2009. V. 14. № 13–14. P. 676–683.
48. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 215. № 3. P. 403–410.
49. Pearson W.R. // *Methods Enzymol.* 1990. V. 183. P. 63–98.
50. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., et al. // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. № 21. P. 2947–2948.
51. Sali A., Blundell T.L. // *J. Mol. Biol.* 1993. V. 234. № 3. P. 779–815.
52. Schwede T., Kopp J., Guex N., Peitsch M.C. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 13. P. 3381–3385.
53. Baker D., Sali A. // *Science.* 2001. V. 294. № 5540. P. 93–96.
54. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. // *Science.* 1998. V. 280. № 5360. P. 69–77.
55. Jin L., Wu Y. // *J. Chem. Inf. Model.* 2007. V. 47. № 5. P. 1967–1972.
56. Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. // *Nature.* 2003. V. 423. № 423(6935). P. 33–41.
57. Visan V., Fajloun Z., Sabatier J.M., Grissmer S. // *Mol. Pharmacol.* 2004. V. 66. № 5. P. 1103–1112.
58. Corzo G., Papp F., Varga Z., Barraza O., Espino-Solis P.G., Rodríguez de la Vega R.C., Gaspar R., Panyi G., Possani L.D. // *Biochem. Pharmacol.* 2008. V. 76. № 9. P. 1142–1154.
59. Khabiri M., Nikouee A., Cwiklik L., Grissmer S., Ettrich R. // *J. Phys. Chem. B.* 2011. V. 115. № 39. P. 11490–11500.
60. Chen R., Robinson A., Gordon D., Chung S.H. // *Biophys. J. Biophys. Soc.* 2011. V. 101. № 11. P. 2652–2660.
61. Chen R., Chung S.-H. // *Biophys. J. Biophys. Soc.* 2013. V. 105. № 8. P. 1829–1837.
62. Chen R., Chung S.-H. // *Toxins (Basel).* 2014. V. 6. № 7. P. 2149–2161.
63. Rashid M.H., Kuyucak S. // *J. Phys. Chem. B.* 2012. V. 116. № 16. P. 4812–4822.
64. Pennington M.W., Rashid M.H., Tajhya R.B., Beeton C., Kuyucak S., Norton R.S. // *FEBS Lett.* 2012. V. 586. № 22. P. 3996–4001.
65. Chen R., Chung S.H. // *Biochemistry.* 2012. V. 51. № 9. P. 1976–1982.
66. Rashid M.H., Heinzelmann G., Huq R., Tajhya R.B., Chang S.C., Chhabra S., Pennington M.W., Beeton C., Norton R.S., Kuyucak S. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 11. P. e78712.
67. Rashid M.H., Huq R., Tanner M.R., Chhabra S., Khoo K.K., Estrada R., Dhawan V., Chauhan S., Pennington M.W., Beeton C., et al. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 4509.
68. Rashid M.H., Kuyucak S. // *J. Phys. Chem. B.* 2014. V. 118. № 3. P. 707–716.
69. Chen P.C., Kuyucak S. // *Biophys. J. Biophys. Soc.* 2009. V. 96. № 7. P. 2577–2588.
70. Chen P.C., Kuyucak S. // *Biophys. J. Biophys. Soc.* 2011. V. 100. № 10. P. 2466–2474.
71. Kohl B., Rothenberg I., Ali S.A., Alam M., Seeböhm G., Kalbacher H., Voelter W., Stoll R. // *Toxicon.* 2015. V. 101. P. 70–78.
72. Zachariae U., Schneider R., Velisetty P., Lange A., Seeliger D., Wacker S.J., Karimi-Nejad Y., Vriend G., Becker S., Pongs O., et al. // *Structure.* 2008. V. 16. № 5. P. 747–754.
73. Legros C., Pollmann V., Knaus H.G., Farrell A.M., Darbon H., Bougis P.E., Martin-Eauclaire M.F., Pongs O. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 22. P. 16918–16924.
74. 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. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2013. V. 405. № 7. P. 2379–2389.
75. Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A., Kudryashova K.S., Nekrasova O.V., Peigneur S., Tytgat J., Feofanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 19. P. 12195–12209.
76. Turchenkov D.A., Bystrov V.S. // *J. Phys. Chem. B.* 2014. V. 118. № 31. P. 9119–9127.
77. Kurczynska M., Kotulska M. // *Acta Bioeng. Biomech.* 2014. V. 16. № 4. P. 107–116.
78. Cui M., Shen J., Briggs J.M., Luo X., Tan X., Jiang H., Chen K., Ji R. // *Biophys. J.* 2001. V. 80. № 4. P. 1659–1669.
79. Yu K., Fu W., Liu H., Luo X., Chen K.X., Ding J., Shen J., Jiang H. // *Biophys. J.* 2004. V. 86. № 6. P. 3542–3555.
80. Chung S.-H., Kuyucak S. // *Eur. Biophys. J.* 2002. V. 31. № 4. P. 283–293.
81. Morris G.M., Goodsell D.S., Halliday R.S., Huey R., Hart W.E., Belew R.K., Olson A.J. // *J. Comput. Chem.* 1998. V. 19. № 14. P. 1639–1662.
82. Gray J.J., Moughon S., Wang C., Schueler-Furman O., Kuhlman B., Rohl C.A., Baker D. // *J. Mol. Biol.* 2003. V. 331. № 1. P. 281–299.
83. Palma P.N., Krippahl L., Wampler J.E., Moura J.J. // *Proteins.* 2000. V. 39. № 4. P. 372–384.
84. Dominguez C., Boelens R., Bonvin A.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 7. P. 1731–1737.
85. Pierce B.G., Wiehe K., Hwang H., Kim B.H., Vreven T., Weng Z. // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 12. P. 1771–1773.
86. Mouhat S., Mosbah A., Visan V., Wulff H., Delepierre M., Darbon H., Grissmer S., De Waard M., Sabatier J.M. // *Biochem. J.* 2004. V. 377. Pt 1. P. 25–36.
87. Chen P.C., Kuyucak S. // *Toxins.* 2012. V. 4. № 2. P. 110–138.
88. Orozco M. // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. № 14. P. 5051–5066.
89. Tang X., Koenig P.H., Larson R.G. // *J. Phys. Chem. B.* 2014. V. 118. № 14. P. 3864–3880.

90. Phillips J.C., Braun R., Wang W., Gumbart J., Tajkhorshid E., Villa E., Chipot C., Skeel R.D., Kalé L., Schulten K. // *J. Comput. Chem.* 2005. V. 26. № 16. P. 1781–1802.
91. Brooks B.R., Bruccoleri R.E., Olafson B.D., States D.J., Swaminathan S., Karplus M. // *J. Comput. Chem.* 1983. V. 4. № 2. P. 187–217.
92. Chen R., Chung S.H. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 10. P. 1–8.
93. Best R.B., Zhu X., Shim J., Lopes P.E., Mittal J., Feig M., Mackerell A.D. Jr. // *J. Chem. Theory Comput.* 2012. V. 8. № 9. P. 3257–3273.
94. Bemporad D., Sands Z.A., Wee C.L., Grottesi A., Sansom M.S. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 39. P. 1844–1855.
95. Eriksson M.A.L., Roux B. // *Biophys. J.* 2002. V. 83. № 5. P. 2595–2609.
96. Wu Y., Cao Z., Yi H., Jiang D., Mao X., Liu H., Li W. // *Biophys. J.* 2004. V. 87. № 1. P. 105–112.
97. Almeida D.D., Torres T.M., Barbosa E.G., Lima J.P., de Freitas Fernandes-Pedrosa M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 430. № 1. P. 113–118.
98. Knight J.L., Brooks C.L. // *J. Comput. Chem.* 2009. V. 30. № 11. P. 1692–1700.
99. Torrie G.M., Valleau J.P. // *J. Comput. Phys.* 1977. V. 23. № 2. P. 187–199.
100. Salomon-Ferrer R., Case D.A., Walker R.C. // *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci.* 2013. V. 3. № 2. P. 198–210.
101. Kumari R., Kumar R., Lynn A. // *J. Chem. Inf. Model.* 2014. V. 54. № 7. P. 1951–1962.
102. Han S., Yi H., Yin S.J., Chen Z.Y., Liu H., Cao Z.J., Wu Y.L., Li W.X. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 27. P. 19058–19065.
103. Hidalgo P., Mackinnon R. // *Science.* 1994. V. 268. № 5208. P. 307–310.
104. Jin L., Wu Y. // *J. Mol. Recognit.* 2011. V. 24. № 1. P. 101–107.
105. Yi H., Qiu S., Cao Z., Wu Y., Li W. // *Proteins Struct. Funct. Genet.* 2008. V. 70. № 3. P. 844–854.
106. Yin S.J., Jiang L., Yi H., Han S., Yang D.W., Liu M.L., Liu H., Cao Z.J., Wu Y.L., Li W.X. // *J. Proteome Res.* 2008. V. 7. № 11. P. 4890–4897.
107. Dauplais M., Lecoq A., Song J., Cotton J., Jamin N., Gilquin B., Roumestand C., Vita C., de Medeiros C.L., Rowan E.G., et al. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 7. P. 4302–4309.
108. Mouhat S., De Waard M., Sabatier J.M. // *J. Pept. Sci.* 2005. V. 11. № 2. P. 65–68.