

МЕМБРАННЫЕ ИОНОТРОПНЫЕ СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ИХ ИССЛЕДОВАНИЯ

Е.В.Гришин

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

2 ноября 2009 года



- Как устроены ионотропные мембранные системы?
- Как оценить многообразие подобных систем?
- Г Как научиться управлять их работой?

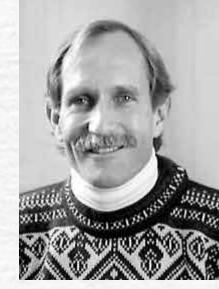


Методы исследования мембранных транспортных систем

- Электрофизиологический
- **г** Биохимический
- **г** Генетический
- Реконструкция
- **с** Структурный







Пол Грингард

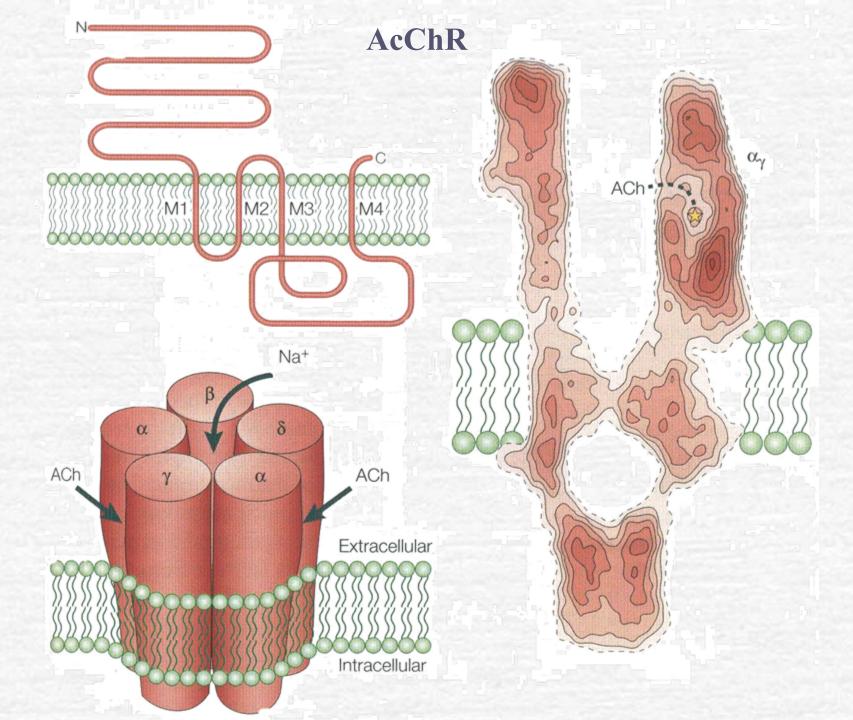
Эрик Кандел

Р. Мак-Киннон

П. Эгр

Нобелевская премия 2000 г. (физиология): Пол Грингард – действие нейромедиаторов Эрик Кандел - работа синапсов. Нобелевская премия 2003 г. (химия): Р.Мак-Киннон – структура ионных каналов П.Эгр - аквапорины.





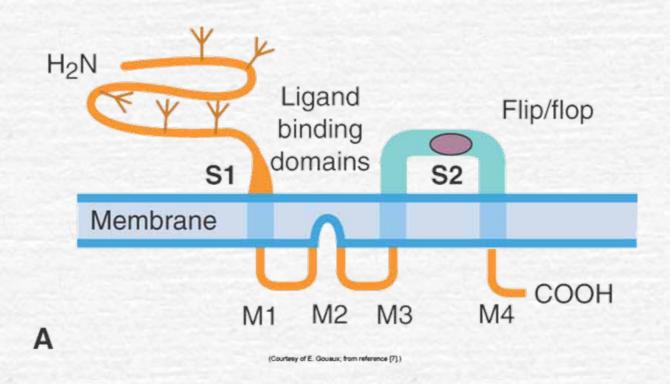


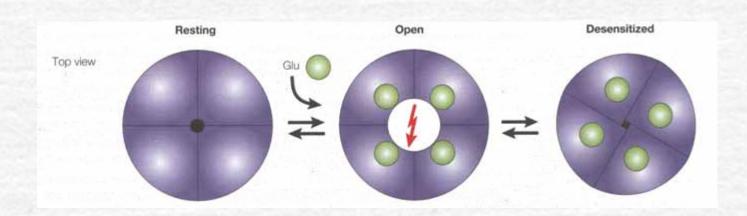
Мышечный и нейрональные типы nAcChR

	Muscle- type					
I	п		III		IV	
		1	2	3	α1. β1.	
α9, α10	α7, α8	$\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, $ $\alpha 6$	β2, β4	β3, α5	α1, β1, δ,γ,ε	



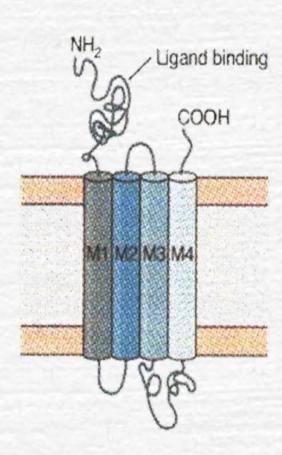
GluR



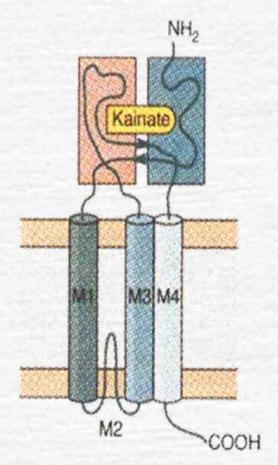




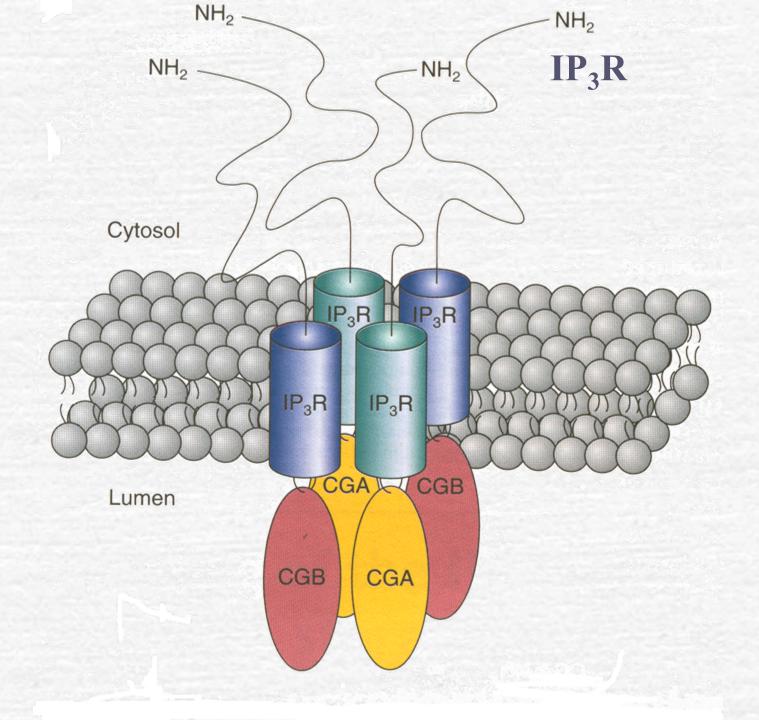
ACh, GABA, and glycine receptor subunit

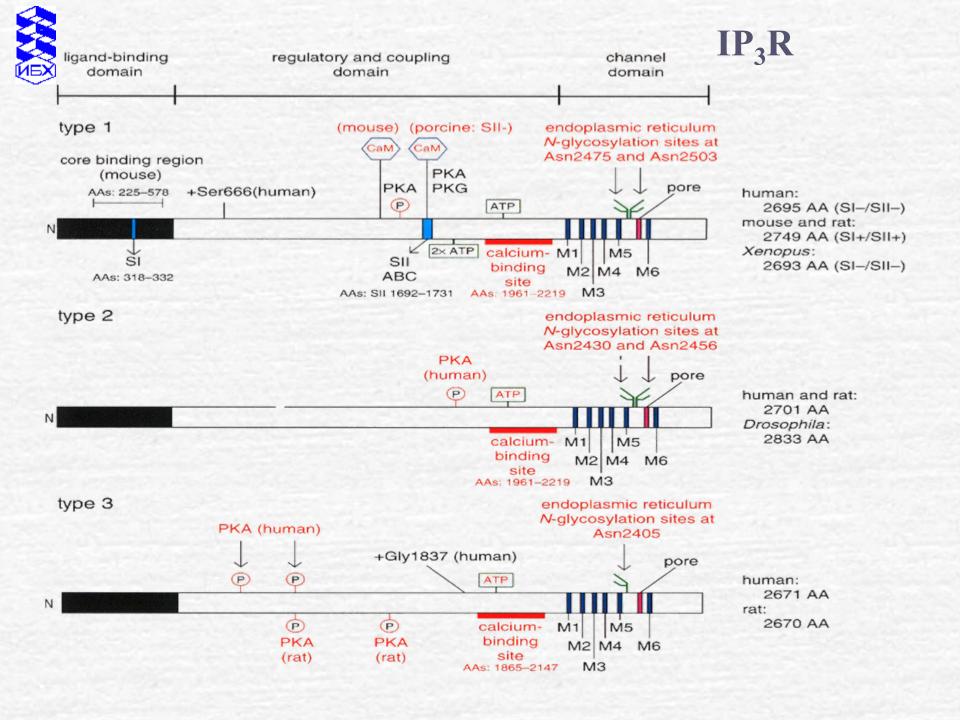


Glutamate receptor subunit



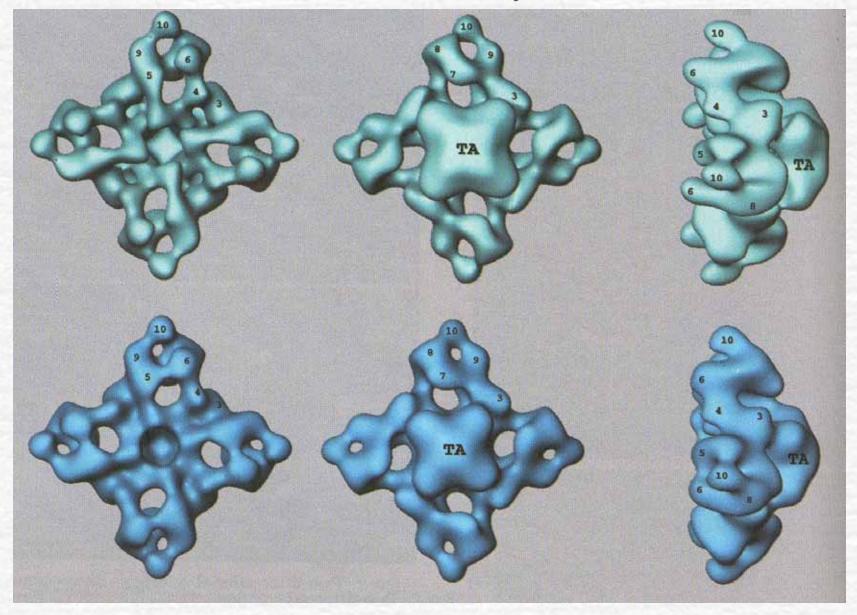






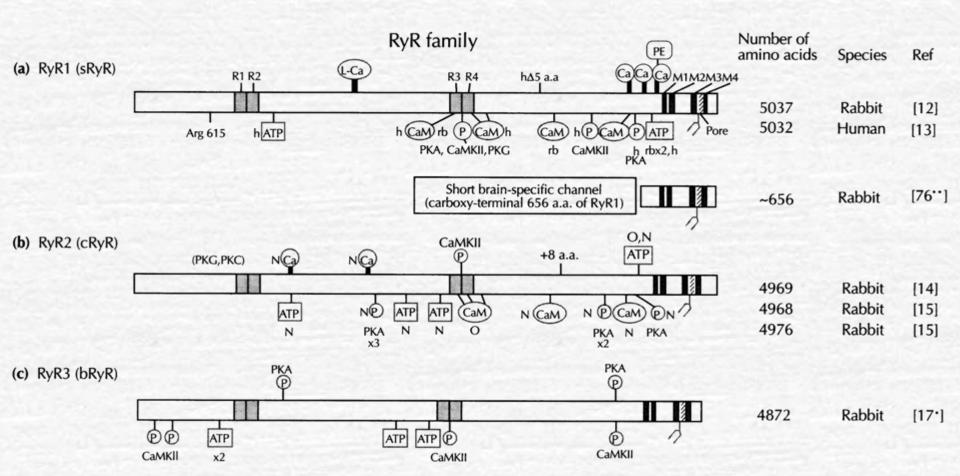


RyR



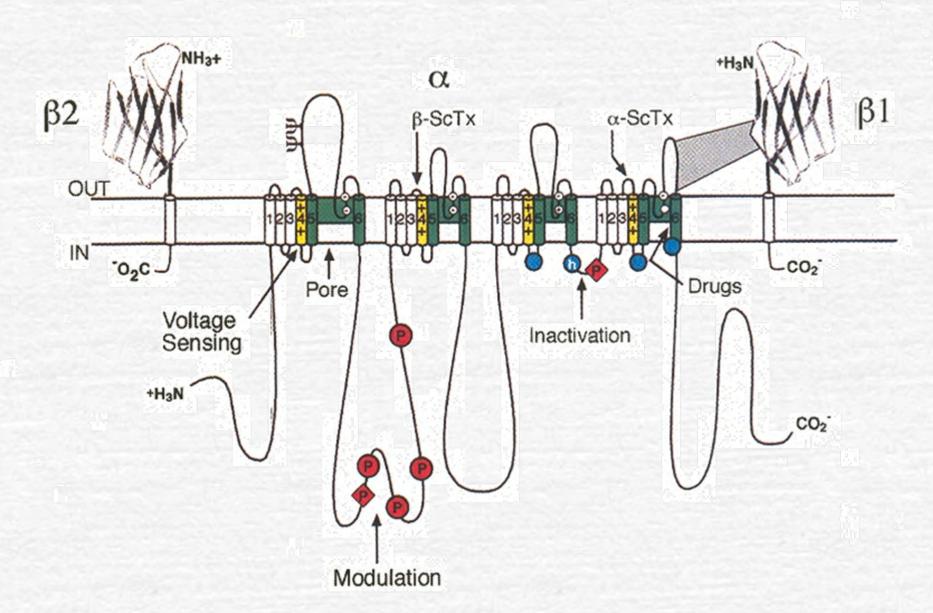


RyR

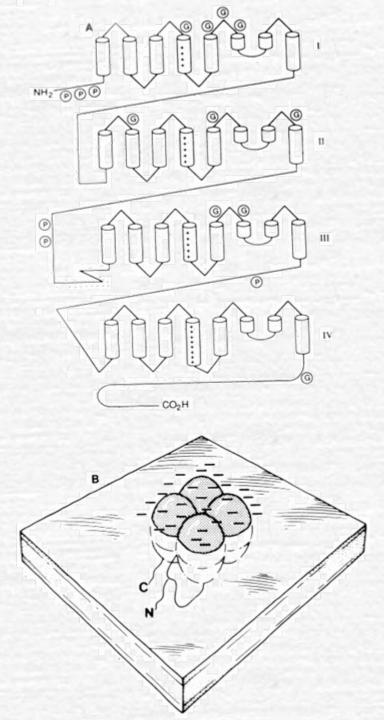




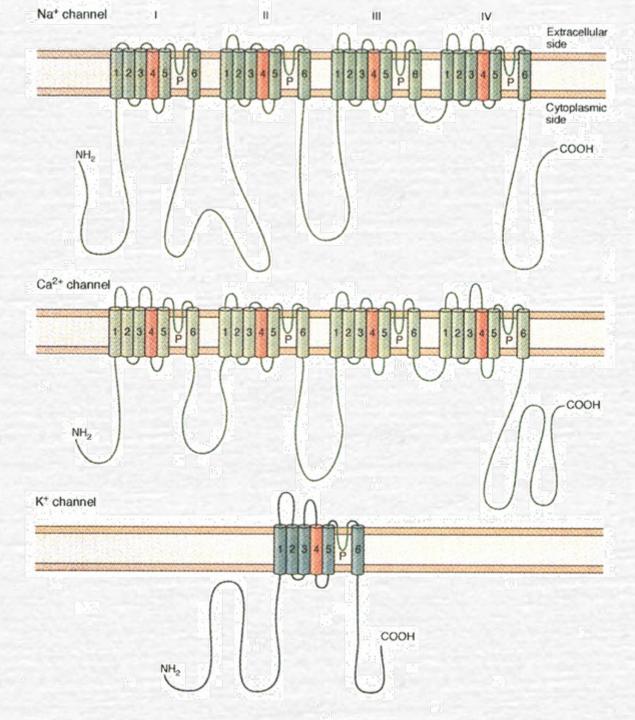
Na+ канал





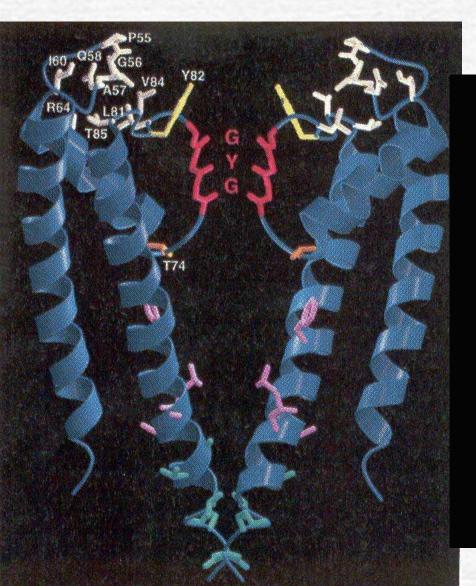


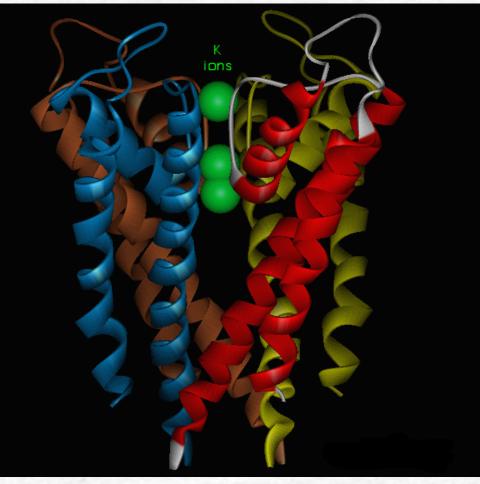




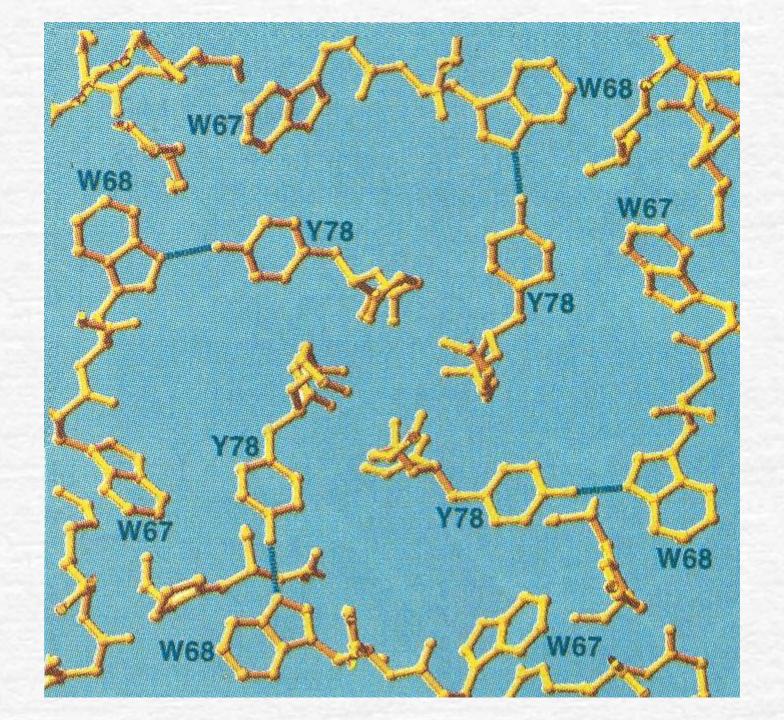


Калиевый канал KcsA из Streptomyces lividans



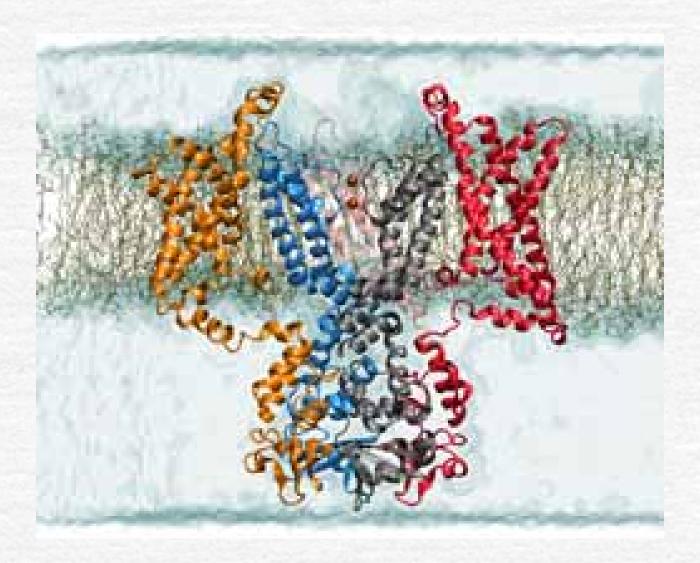




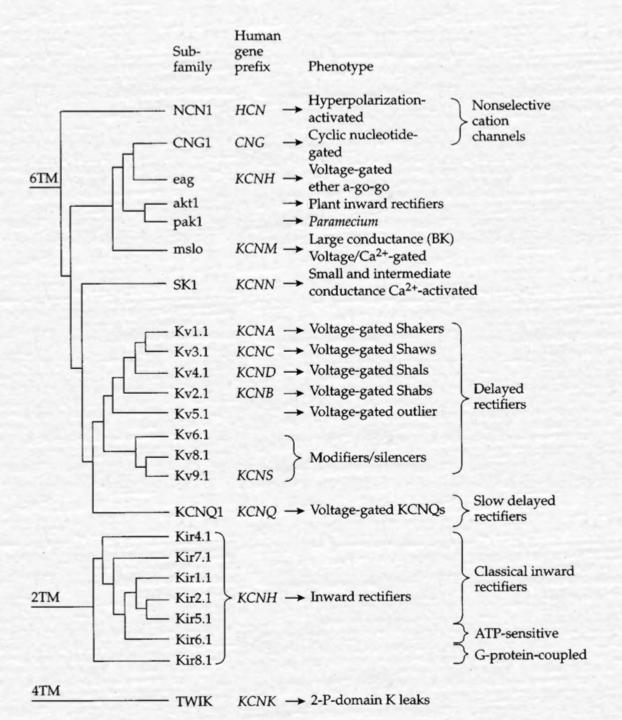




К+ канал

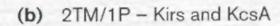


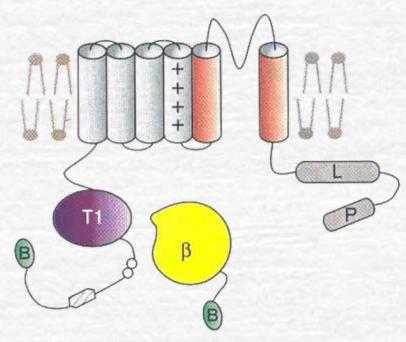


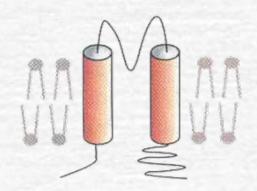




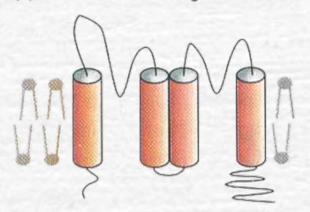
(a) 6TM/1P - Kv and calcium-dependent channels



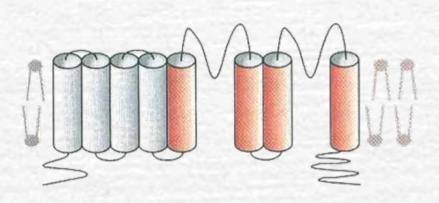




(c) 4TM/2P - leakage channels

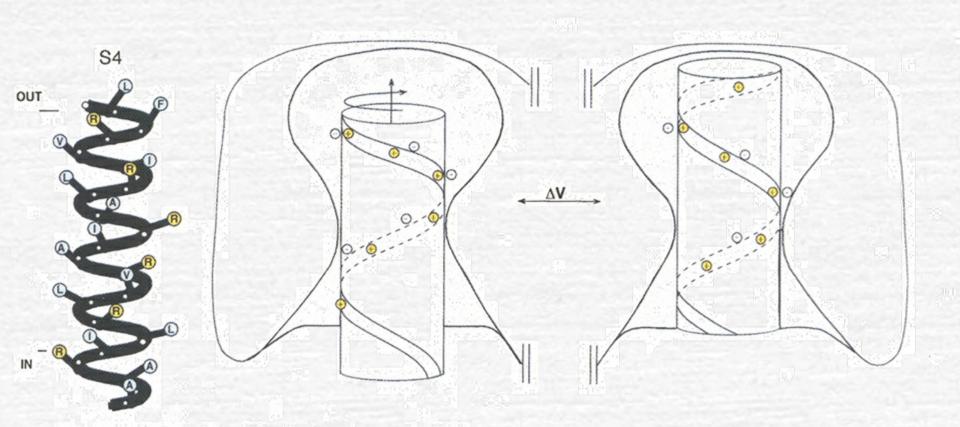


(d) 8TM/2P



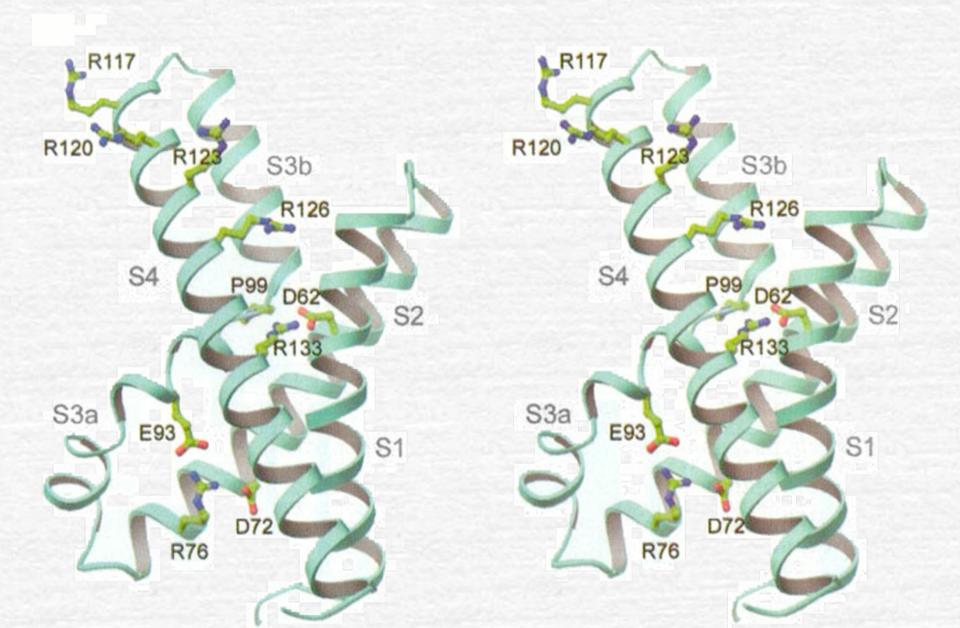


Сенсор напряжения

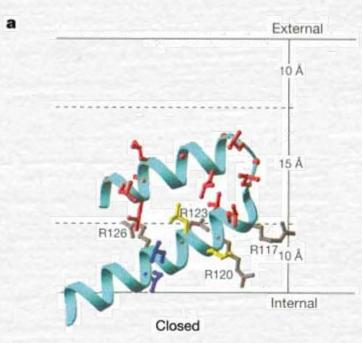


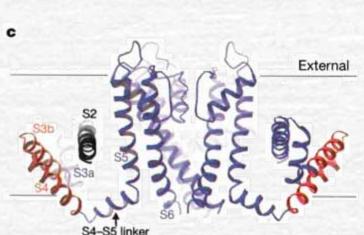


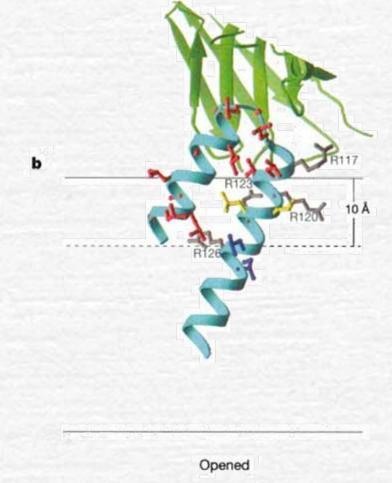
Структура сенсора напряжения S4 KvAP

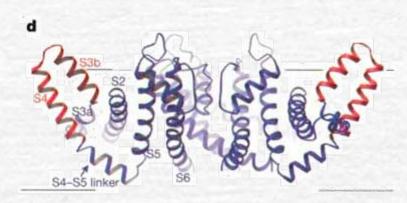








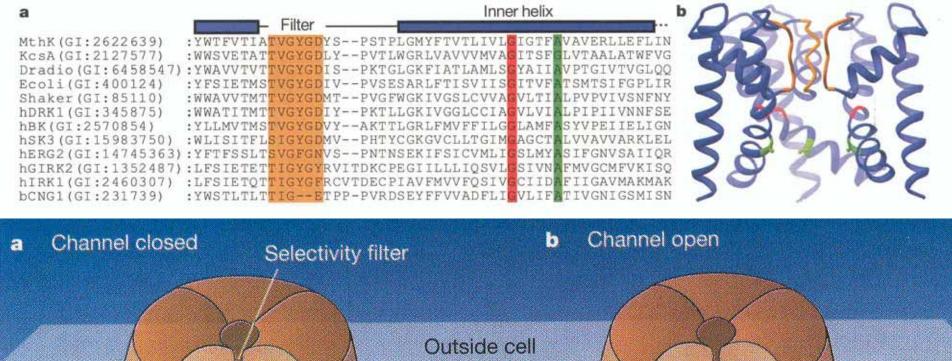


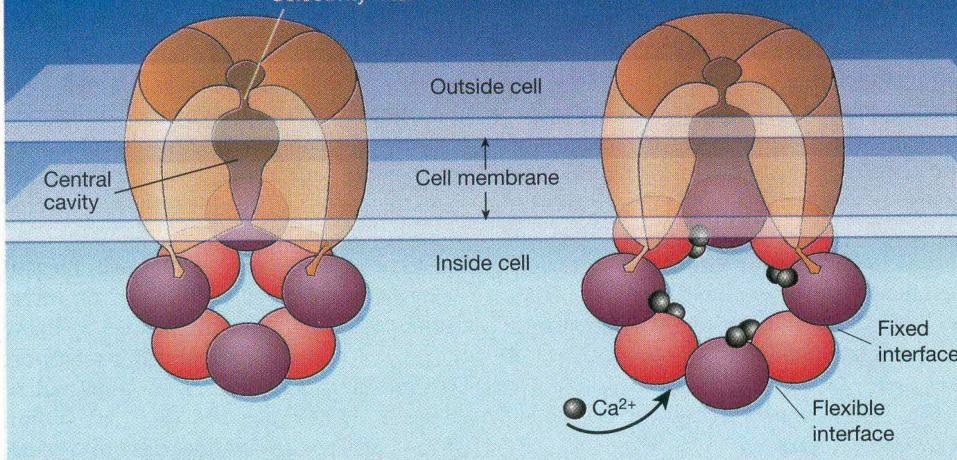


Са-активируемый К канал (MthK) из Methanobacterium thermoautotrophicum.

Кристаллическая структура канала в (кальций связанном) открытом состоянии.

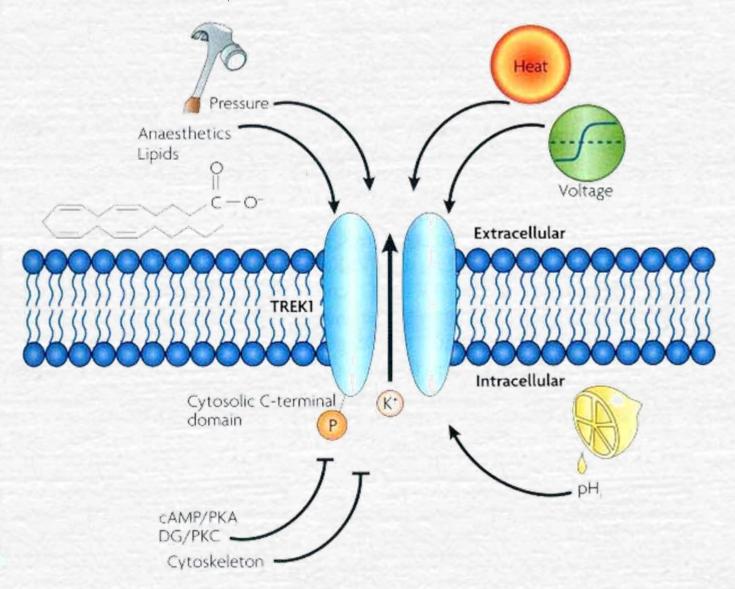
Восемь RCK доменов (регуляторов калиевой проницаемости) образуют воротное кольцо на внутренней поверхности мембраны. Это воротное кольцо использует энергию связывания Са для совершения механической работы и открытия поры.



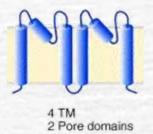




Активация калиевого канала TREK1

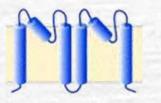




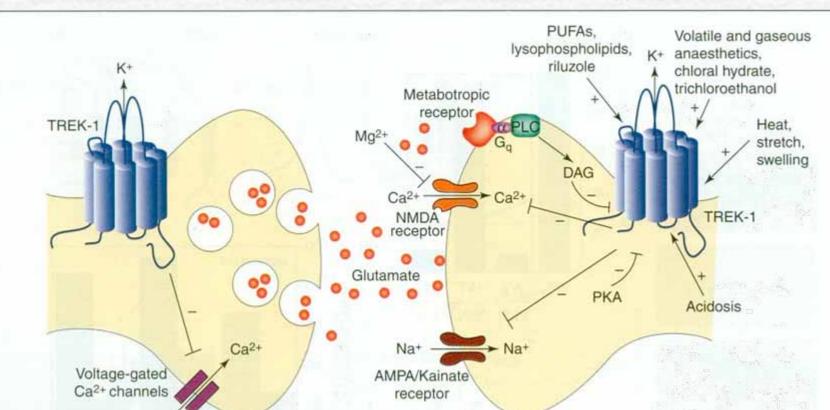


Ca2+

Presynaptic



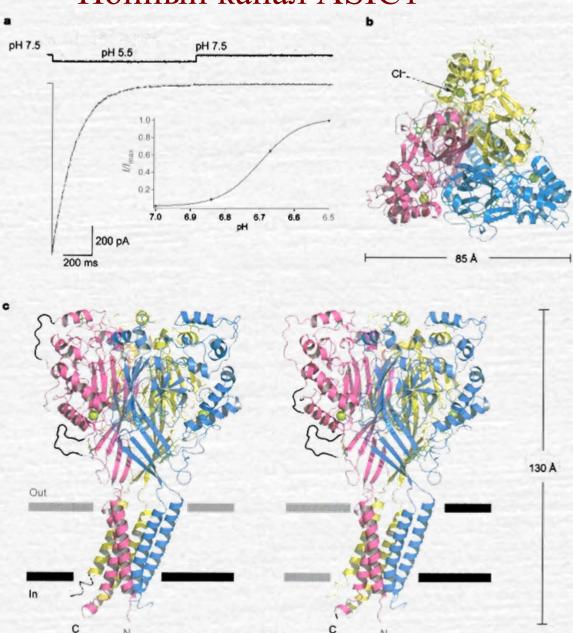
4 TM 2 Pore domains



Postsynaptic

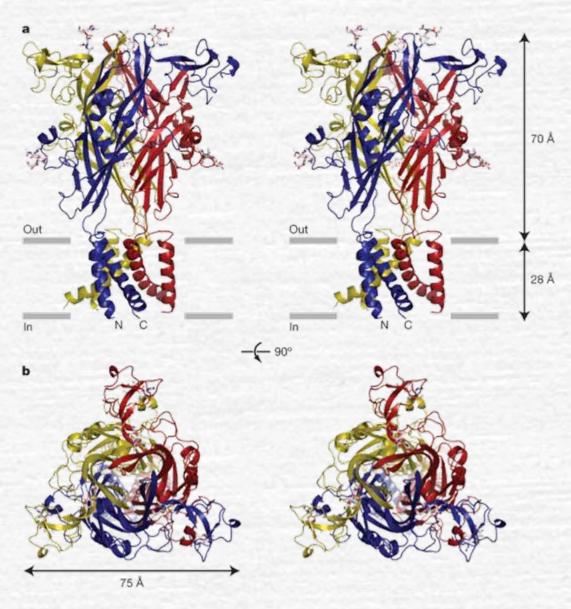


Ионный канал ASIC1





Структура рецептора Р2Х



T Kawate et al. Nature 460, 592-598 (2009)



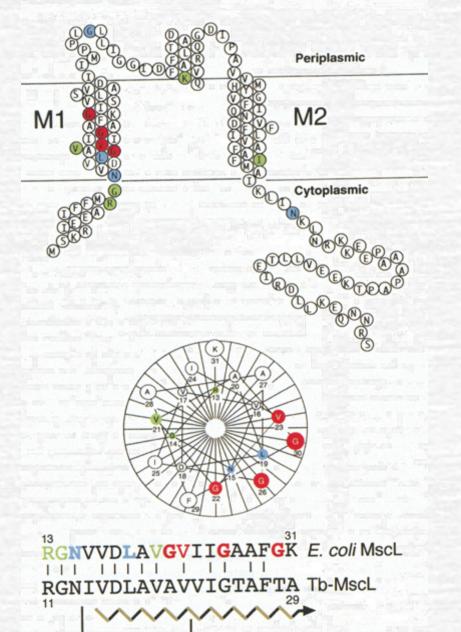
АТФ-активируемые каналы

подтип рецептора	ген	хромосомная локализация
P2X ₁	P2RX1	17p13.3
P2X ₂	P2RX2	12q24.33
P2X ₃	P2RX3	11q12
P2X ₄	P2RX4	12q24.32
P2X ₅	P2RX5	17p13.3
P2X ₆	P2RX6	22p11.21
P2X ₇	P2RX7	12q24



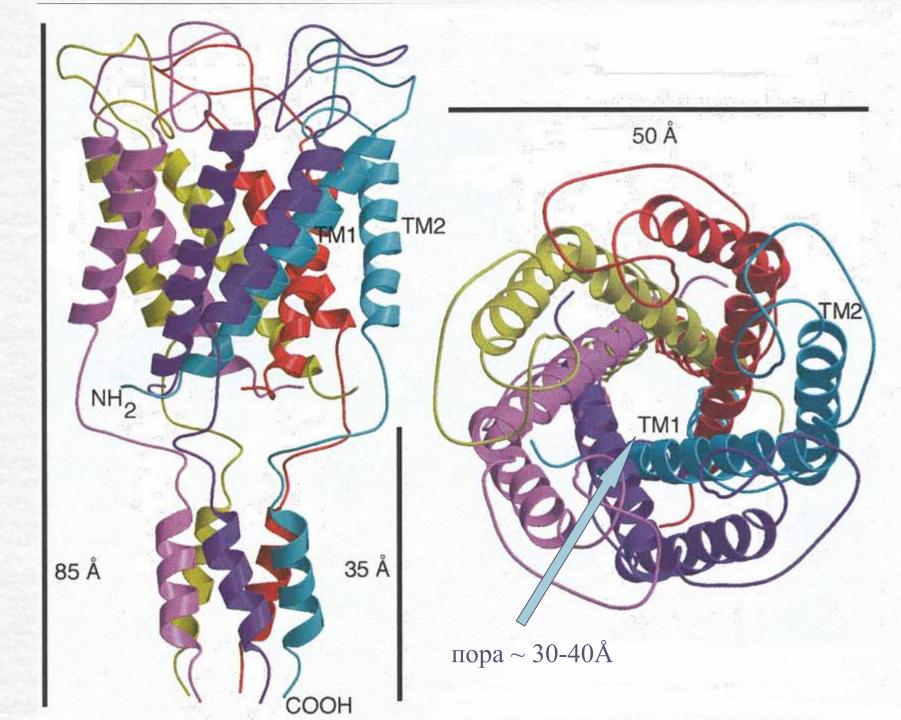
Субъединица механорецептора Tb-MscL

(Mycobacterium tuberculosis)

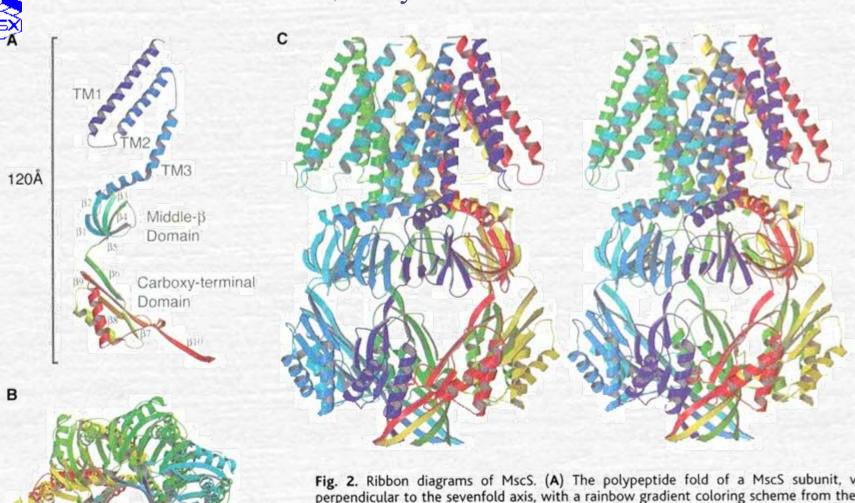


15 kDa 136 a.a.





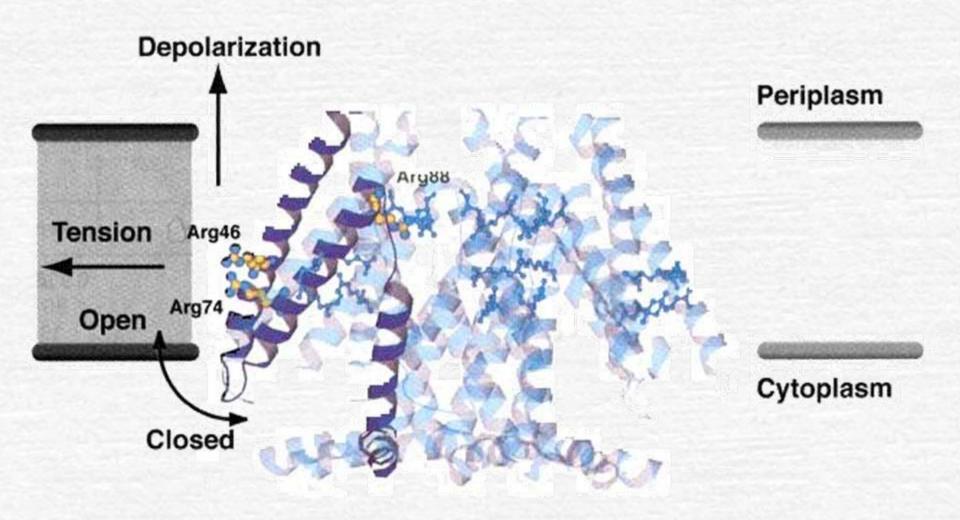
Механо- и потенциалчувствительный канал *E.Coli*

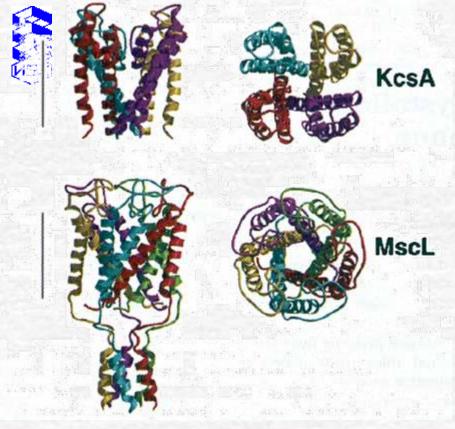


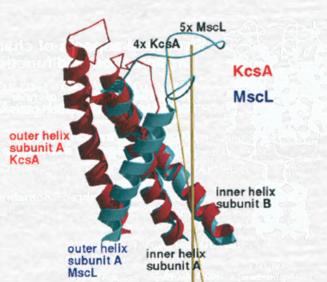
80Å

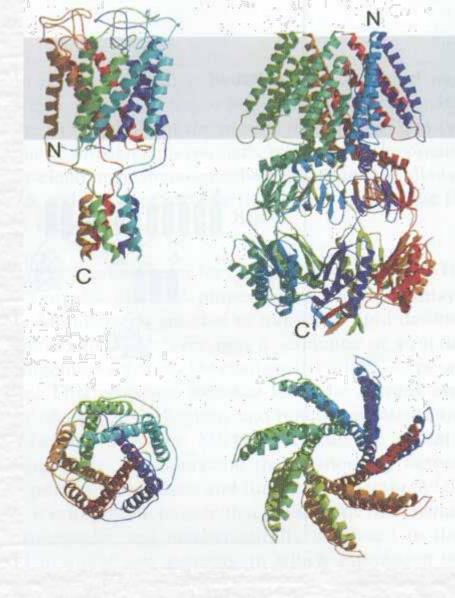
Fig. 2. Ribbon diagrams of MscS. (A) The polypeptide fold of a MscS subunit, viewed perpendicular to the sevenfold axis, with a rainbow gradient coloring scheme from the NH₂-terminus (blue) to the COOH-terminus (red). The membrane-spanning helices in the transmembrane domain are labeled TM1, TM2, and TM3. The two remaining domains of the monomer, located in the cytoplasm, as well as location of the β strands, are also indicated. Brackets denote approximate dimensions of the molecule in both (A) and (B). (B) The MscS heptamer viewed down the sevenfold axis, looking into the permeation pathway from outside the cell. The coloring of the subunits is as in (C). (C) Stereo side view of the MscS heptamer, viewed from the same direction as in (A), with each subunit represented in a separate color. The orientation of this view is such that the periplasm would be at the top, and the cytoplasm would be at the bottom of the figure. This figure was prepared with MOLSCRIPT (52) and RASTER-3D (53).



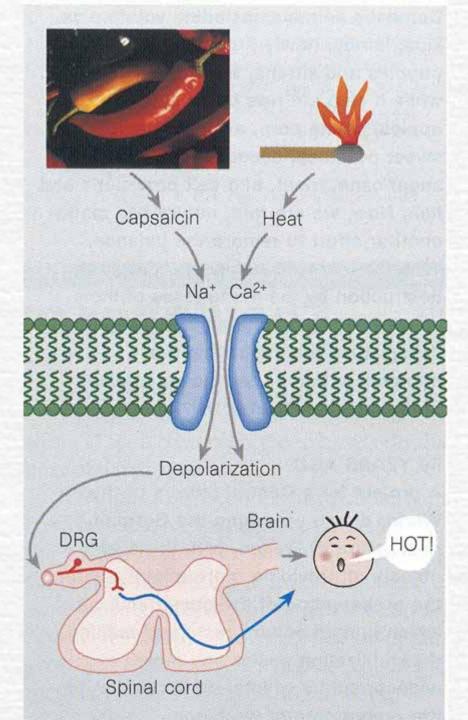




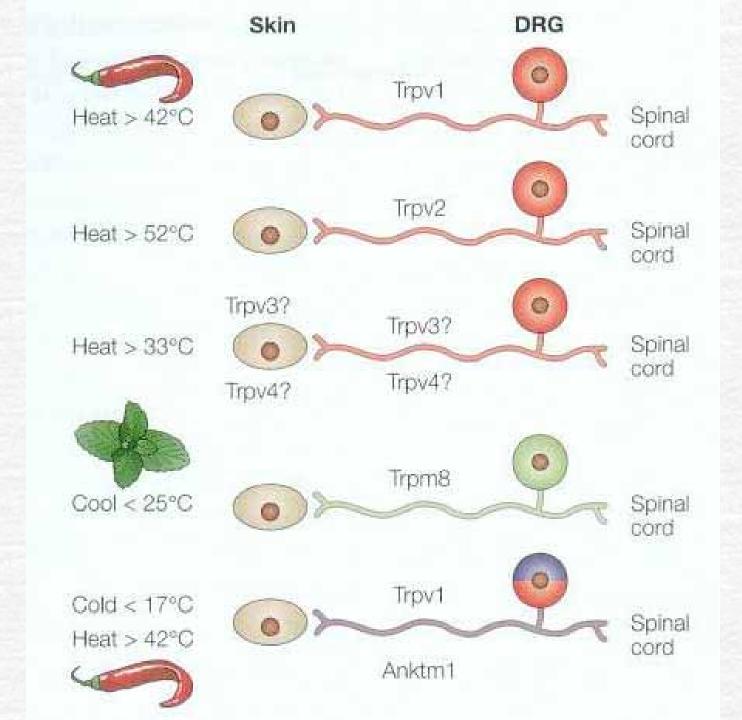




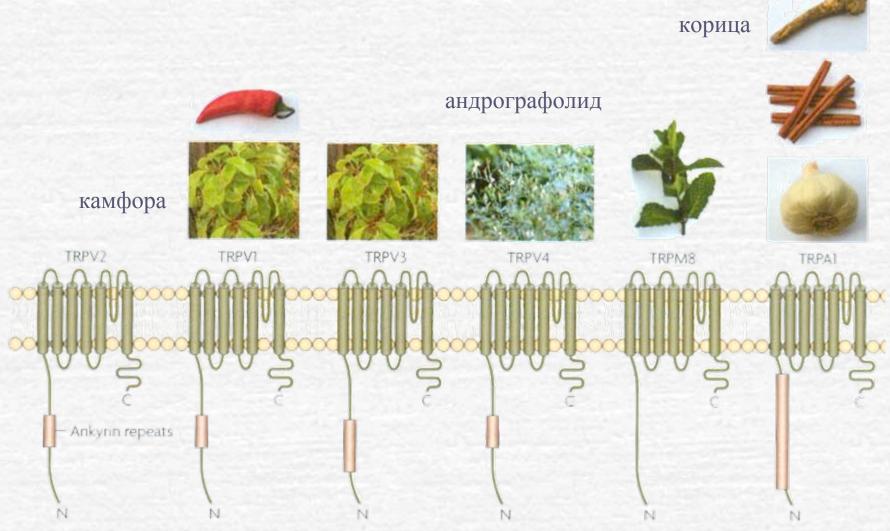








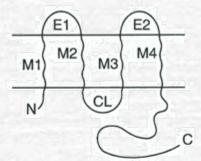




Activation of thermoTRPs by naturally occurring compounds.



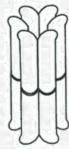
Extracellular



Intracellular





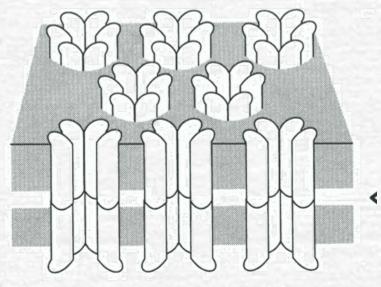


Connexin Connexon Intercellular channel

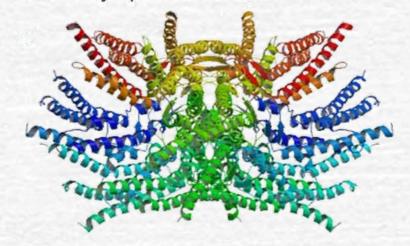
Gap Junctions

(b)

Cytoplasm of cell one

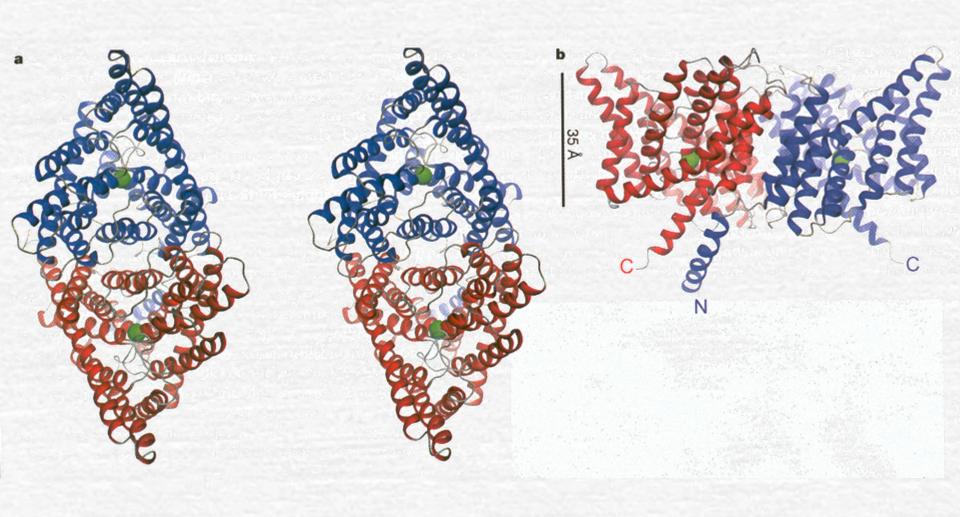


Cytoplasm of cell two



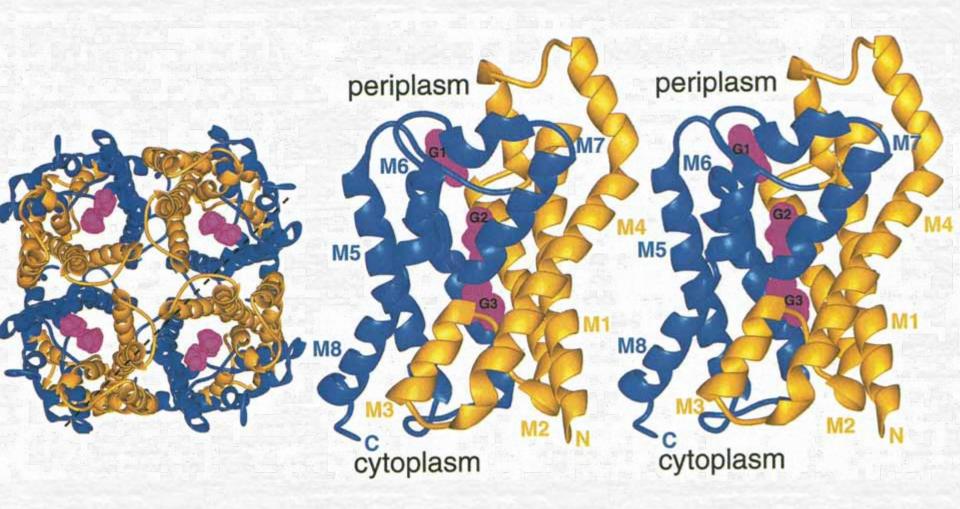


Хлорный канал



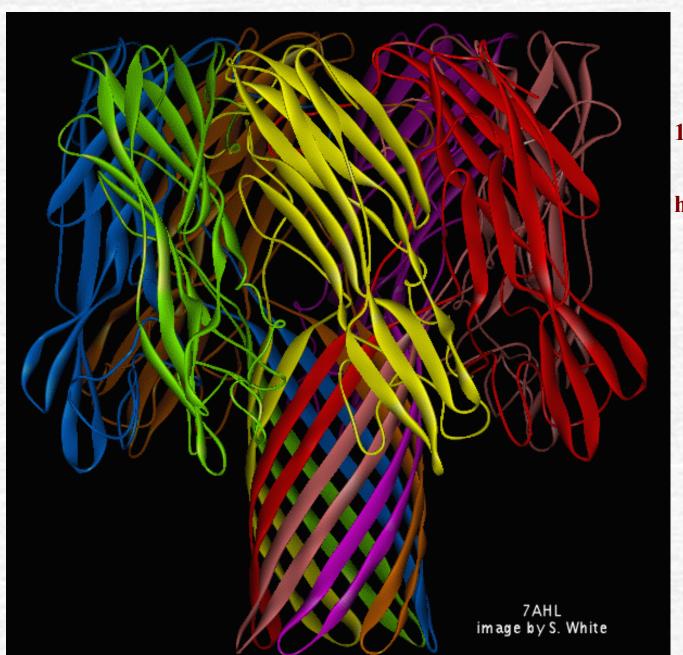


Аквопорин





α-гемолизин (Staphylococcus aureus)



 M_r 33,2 kDa

16 β-strands

heptamer



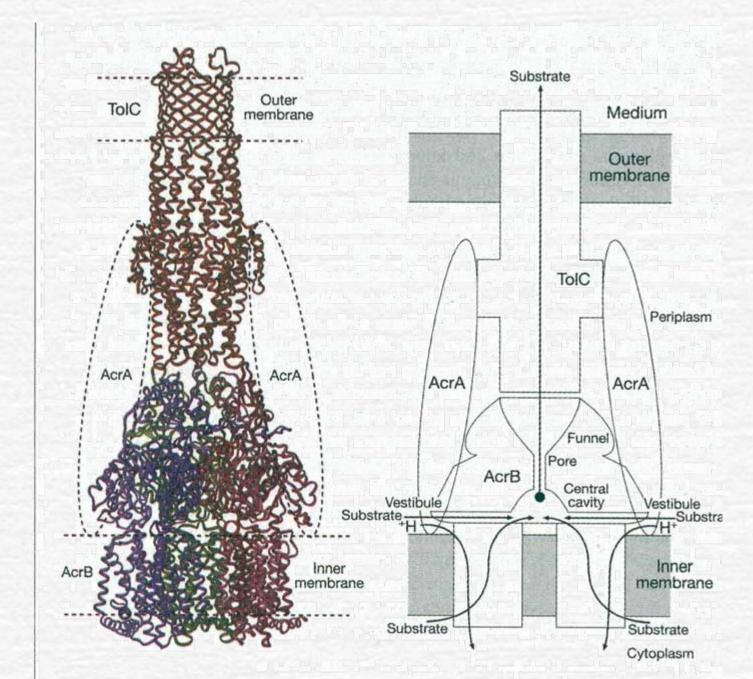
Малтопорин Salmonella typhimurium



image by S. White

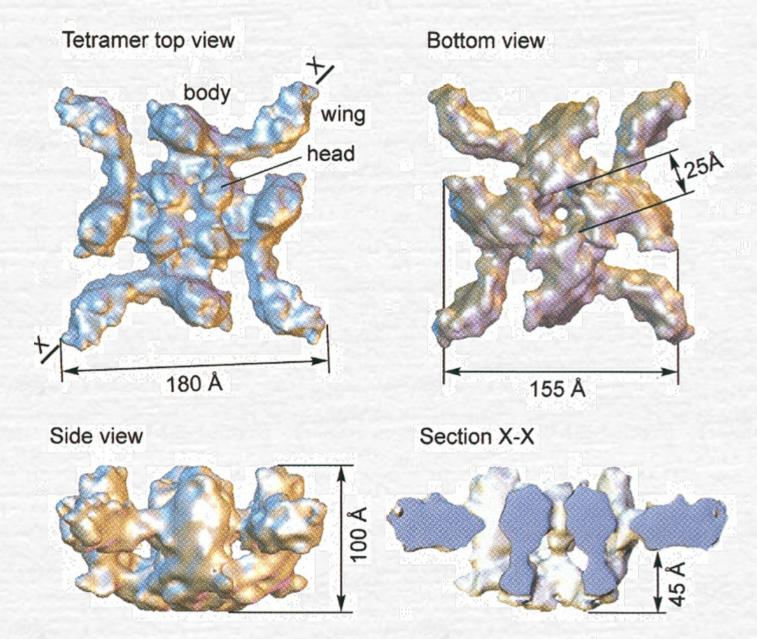


Модель AcrB-AcrA-TolC из E.coli





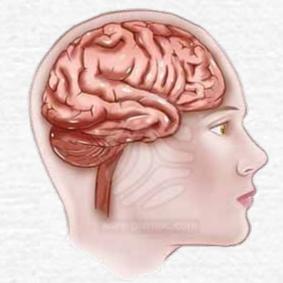
Тетрамер латротоксина





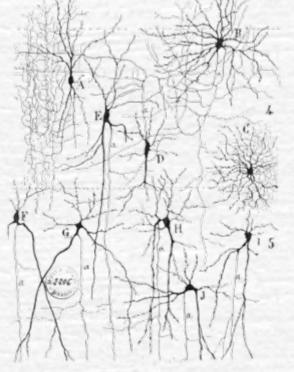


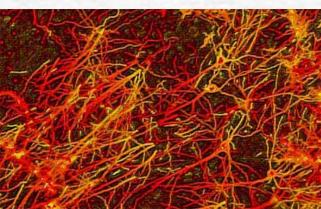
 10^{11} нк

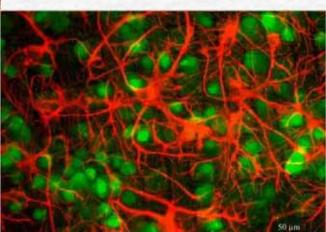


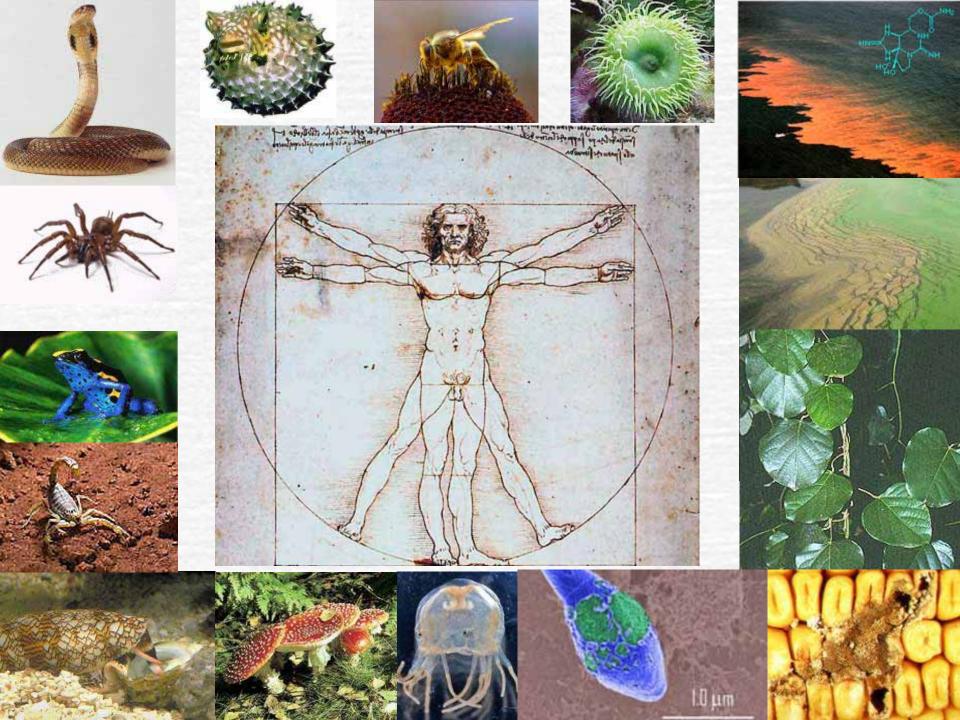
7х10¹⁴ ск

Synapse

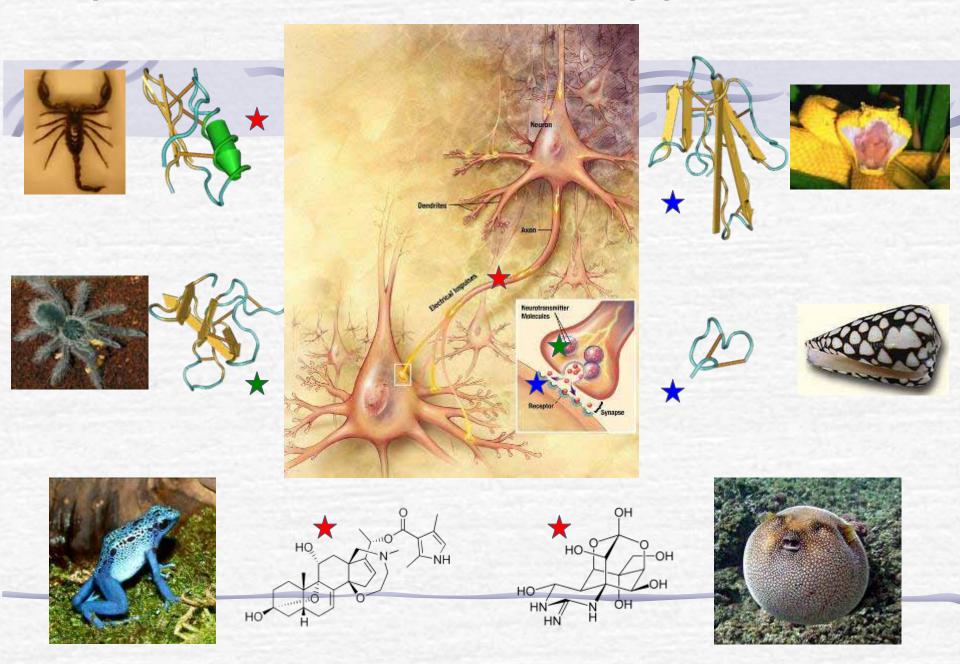








Нервная система как мишень действия природных токсинов











Са²⁺, Nа⁺, К⁺, Сl⁻, протонактивируемые каналы; АСhR, NMDA, адренергический, глукагоновый, нейротензиновый, ангиотензиновый, рианодиновый рецепторы; механорецепторы; транспорт адреналина; система экзоцитоза и др











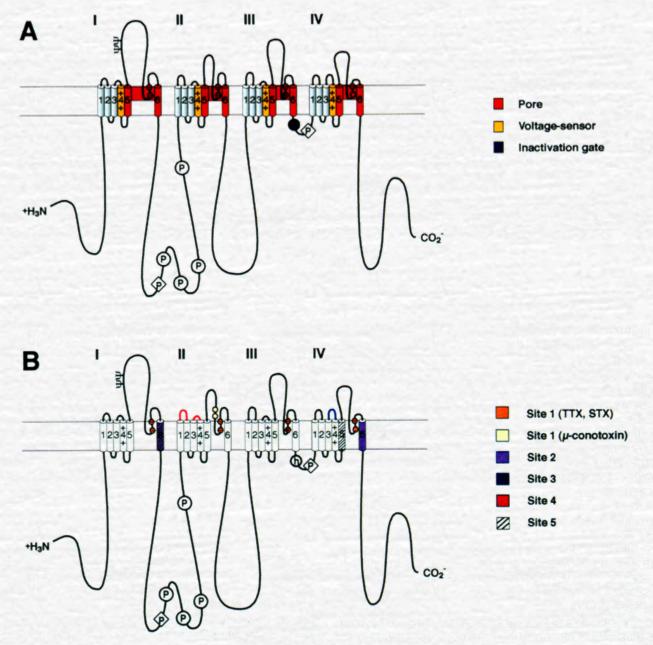
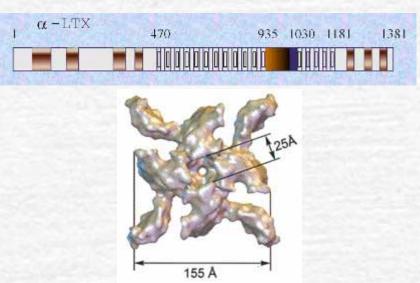
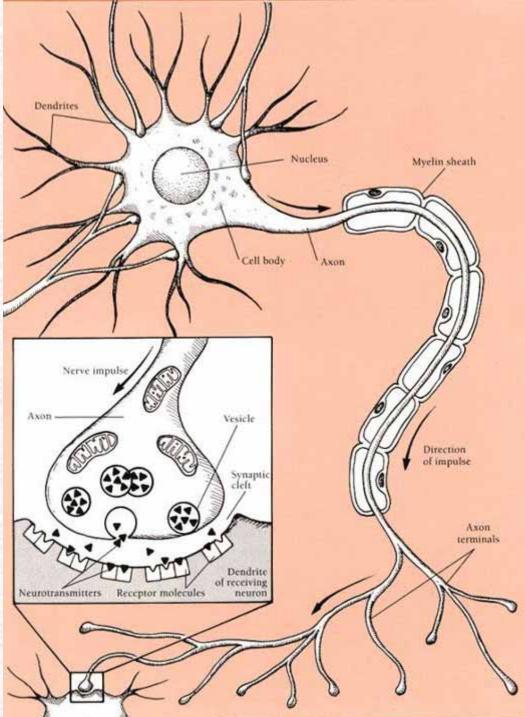


Figure 1. Proposed transmembrane arrangement of the α -subunit of Na⁺ channels. A. Functional mapping of the sodium channel α subunit; the pore is represented in red, the voltage sensors in yellow and the inactivation gate in blue. B. Location of neurotoxin receptor sites on mammalian sodium channels. For receptor sites 3 and 4, only those segments responsible for at least five-fold change in binding affinity are highlighted.



Latrodectus mactans





Латрофилин Ligand NH3+ Lectin-like Stor Stron Stron Stron Stron Stron Olfactomedin-like Mucin-like SH613 SHau **Proteolysis** 983 1002 SH₉₂₂ 1070 Nerve terminal SH₈₉₄ -SH₁₀₉₇ SH₉₄₁ 964 1025 -SH₁₁₁₀ -SH₁₁₁₅ -SH₁₁₁₇ SH1236 Ca** PLC 1471 **COOH** Latrophilin Proline-rich



Компоненты природных ядов — предшественники лекарств

Drug	<u>Origin</u>	Action	Date	Status	References
Captopril	Bradykinin- potentiating peptides from Bothrops jararaca.	Decrease hypertension	1975	A major drug	Ferreira S, 1965, <i>J. Pharm.</i> 24, 163
Batroxobin	Serine protease (Bothrops)	Thrombin-like agent	1980	Drug (Pentapharm)	Stocker et al., 1986, Toxicon 24, 81
Ancrod	Serine protease (Bothrops)	Thrombin-like agent	1980	Drug (Pentapharm)	Illig, 1996, Semin. Vasc. Surg. 9, 315
Tracrium	Curare from plant Chondrodendron tomentosum	Curare-like agent : Paralyses skeletal muscles	1980	Drug	Stenlake et al., 1983, Br. J. Anaesth. 55, 3S
Botulinum toxin	Clostridium botulinum	Block release mediator : antispasms, antiwrinckles	1985	Drug	Bakheit, 2001, Dev. Med. Child. Neurol. 43, 234
Ziconitide	ω-conotoxin MVIIA from Conus magus	Block N-type Ca2+ channels : antipain	2004	Drug	Uchitel, 1997, Toxicon 35, 1161
Conantokins	Cone snail : Conus geographus	Block NMDA receptors : epileptic properties	1990	Potential drug in Phase I	Mena, 1990, Neurosci. Lett. 118, 241
Aggrastat	African saw-scaled viper: Echis carinatus	Inhibits platelet aggregation : prevents clots from growing	1992	Drug	Proimos, 2001, J. Thrombolysis 11, 99
ABT-594	Frog: Epipedobates tricolor	Agonist of neuronal nAchR: analgesic activity	1998	Potential drug in Phase II	Bannon et al., 1998, Science, 279, 77
MiniCD4	Engineered scorpion toxin fold	Block gp120 & unmask neutralizing epitopes: anti-HIV vaccine:	2003	To enter preclinical trials	Martin et al., 2003 Nat. Biotech. 21, 1



















Природные яды — комбинаторные библиотеки полипептидов

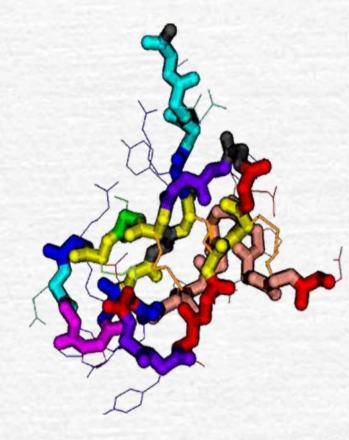
- пауки появились ~ 400 миллионов лет назад
- известно около 40 000 различных видов пауков
- яд паука − природная комбинаторная библиотека ~5х10⁶ полипептидных молекул направленного действия



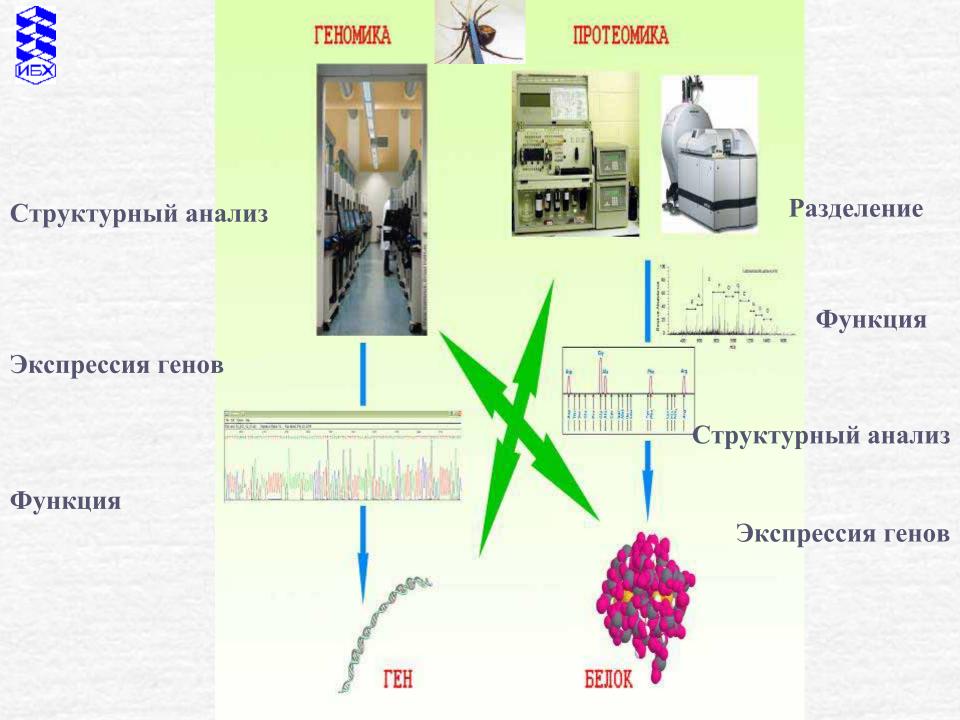






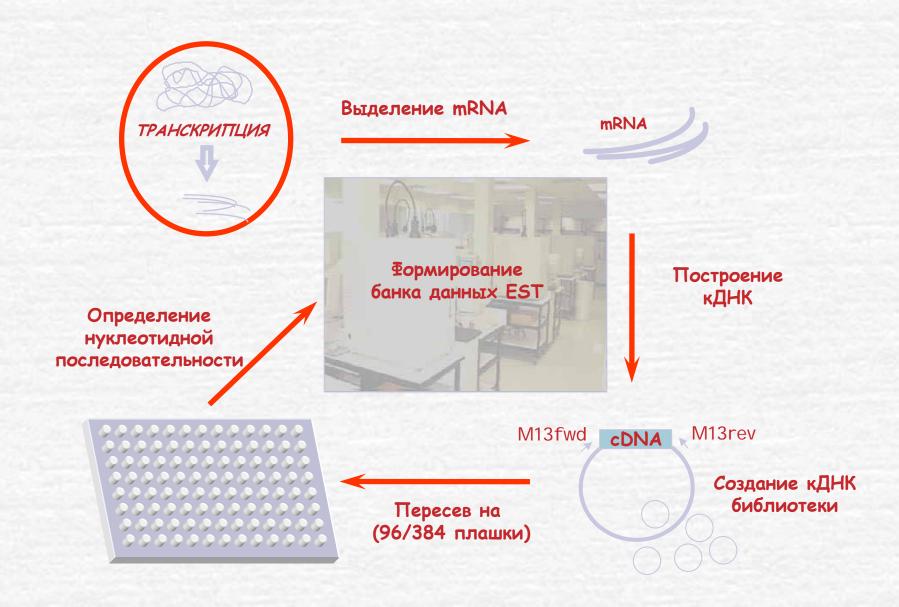








Получение кДНК банков



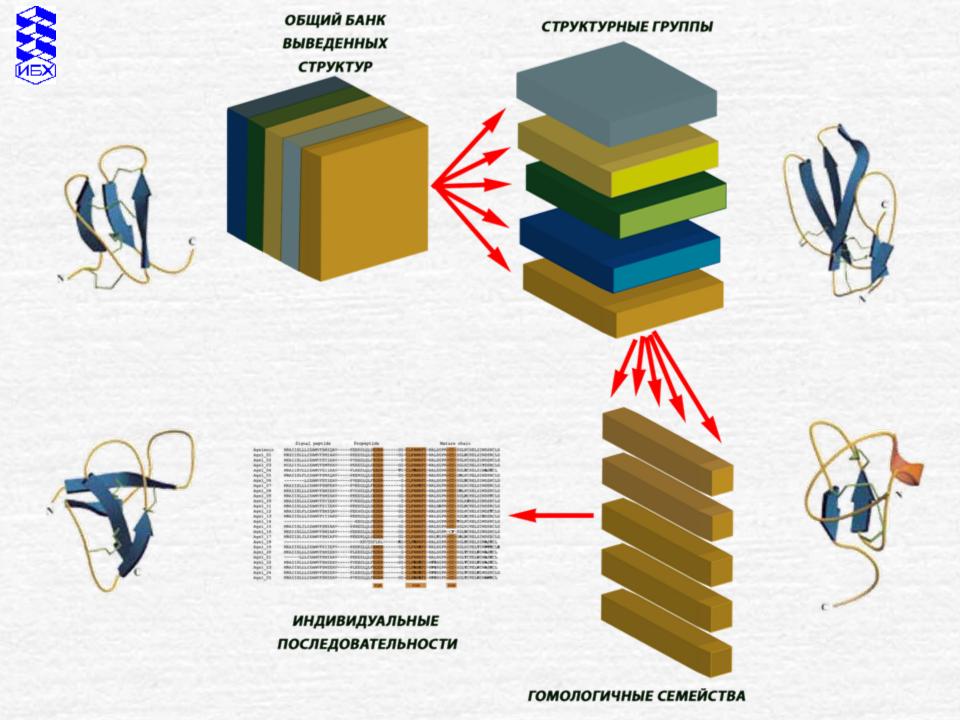


Базы данных (dbEST) для ядовитых желез 11 видов пауков

16433 последовательности кДНК было определено

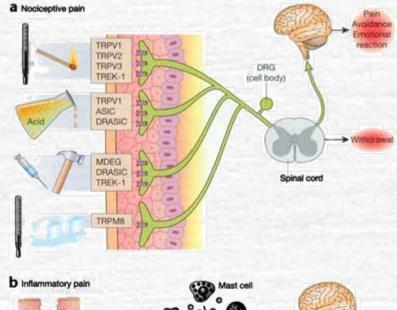
7199 клонов описывают структурные гомологи токсинов пауков, идентифицировано 1562 новых пептида, принадлежащих к 335 структурным группам

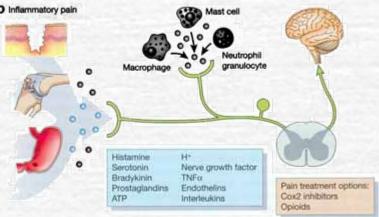
Agelena orientalis, Chiracantium punctorium, Misumena vatia, Tibellus oblongus, Lachesana sp., Lycosa sp.1, Lycosa sp.4, Lycosa sp.5, Heriaeus mllotei, Oxyopes kitabensis, Thomisus onustus

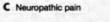


Механизмы боли













Thalamic stroke

Pain treatment options: Tricyclic antidepressants Anticonvulsants Na* channel blockers NMDA receptor antagonists Opioids





- Существуют различные механизмы возникновения боли
- Хронические боли основная причина обращения пациентов за медицинской помощью
- Около одной трети человечества страдает от хронической боли
- 20% пациентов не реагируют на обезболивающие препараты

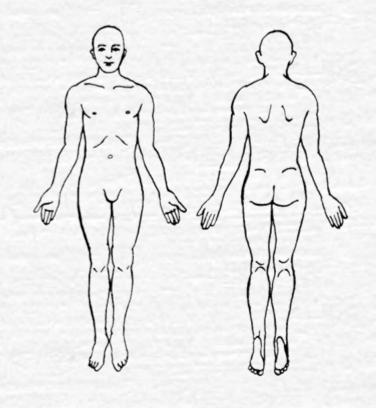


Pain patients

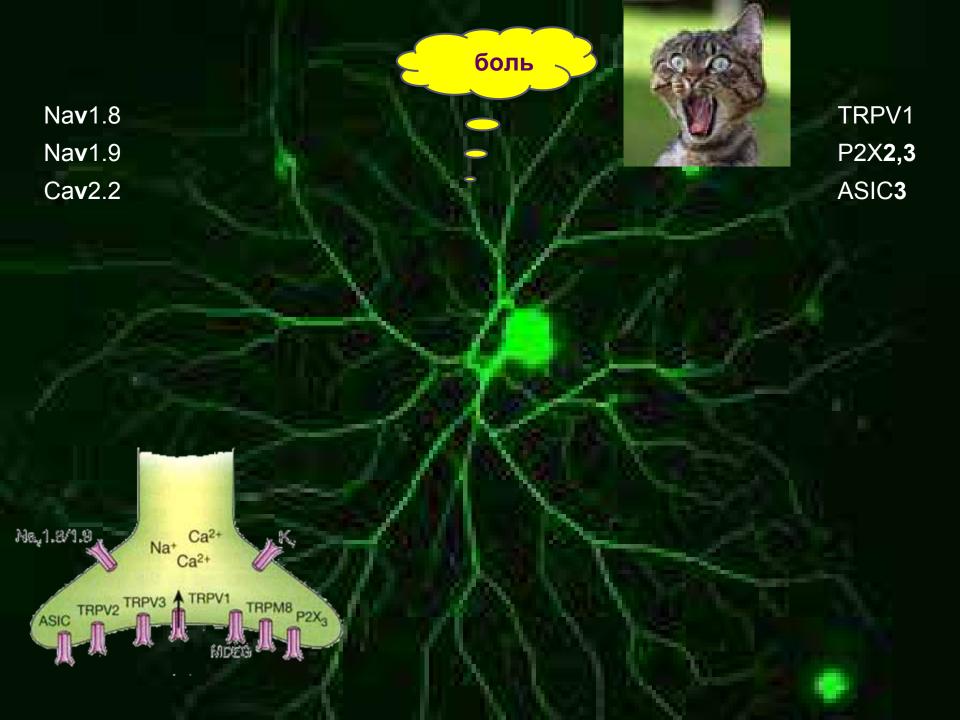
- In Germany (population 82 Mill.):
- 20 Mill. with chronical pain
- 5 Mill. medically treated
- 1.2 Mill. severely affected
- 20% of pain patients don't react to any pain drug



1	FLICKERING _	11 TIRING
	QUIVERING	EXHAUSTING
	PULSING	12 SICKENING
	THROBBING	SUFFOCATING
	BEATING	13 FEARFUL
	POUNDING	FRIGHTFUL
2		TERRIFYING
-	FLASHING	14 PUNISHING
	SHOOTING	GRUELLING
3	PRICKING	CRUEL
	BORING	VICIOUS
	DRILLING	KILLING
	STABBING	15 WRETCHED
	LANCINATING	BLINDING
4	SHARP	16 ANNOYING
4	CUTTING	TROUBLESOME
	LACERATING -	MISERABLE
5	PINCHING	INTENSE
5	PRESSING	_
		UNBEARABLE
	GNAWING	17 SPREADING
	CRAMPING	RADIATING
_	CRUSHING	PENETRATING
6	TUGGING	PIERCING
	PULLING	18 TIGHT
_	WRENCHING	NUMB
7		DRAWING
	BURNING	SQUEEZING
	SCALDING	TEARING
_	SEARING	19 COOL
В	TINGLING	COLD
	ITCHY	FREEZING
	SMARTING	20 NAGGING
	STINGING	NAUSEATING
9	DULL _	AGONIZING
	SORE	DREADFUL
	HURTING _	TORTURING
	ACHING	PPI
_	HEAVY	0 NO PAIN
10	TENDER	1 MILD
	TAUT	2 DISCOMFORTING
	RASPING	3 DISTRESSING
	SPLITTING	4 HORRIBLE
		5 EXCRUCIATING

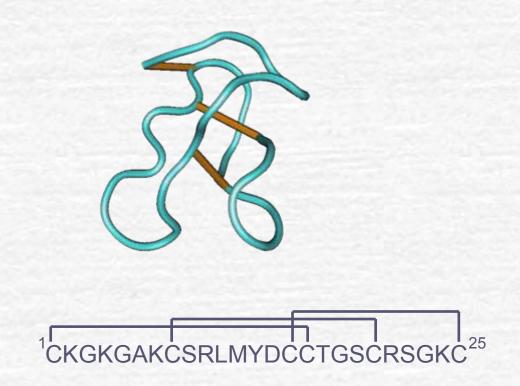


ACCOMPANYING SYMPTOMS NAUSEA HEADACHE	DURATION CONSTANT PERIODIC BRIEF	GOOD SOME
DIZZINESS DROWSINESS CONSTIPATION DIARRHEA	SLEEP GOOD FITFUL CAN'T SLEEP	FOOD INTAKE GOOD SOME LITTLE NONE





Prialt® (ziconotide)



Conus magus



Селективный блокатор **N**-типа кальциевого канала, $EC_{50}\sim0,1$ nM; эффективен для лечения хронических болей

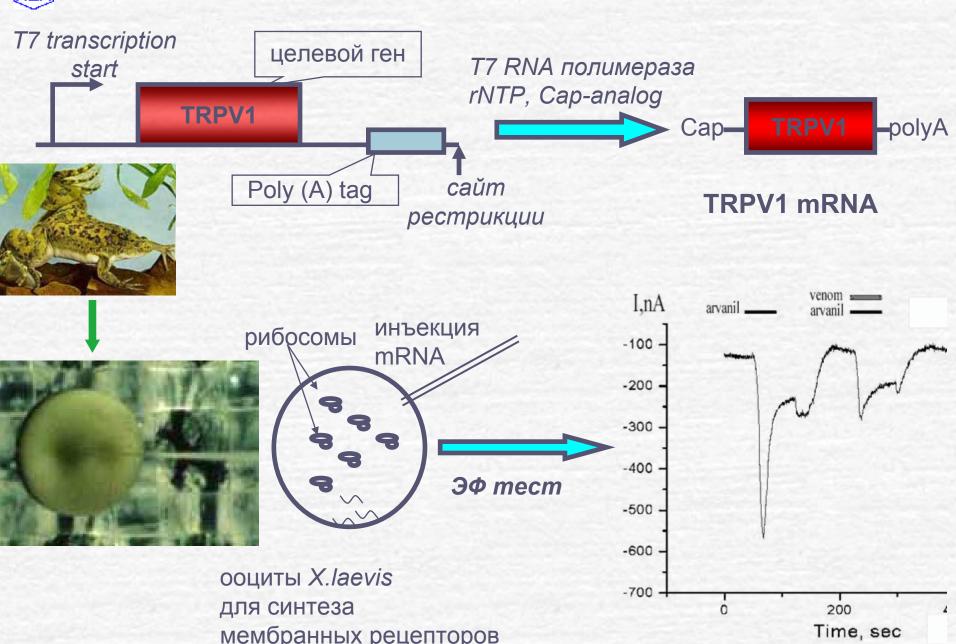


Пептидные токсины как предшественники лекарственных препаратов

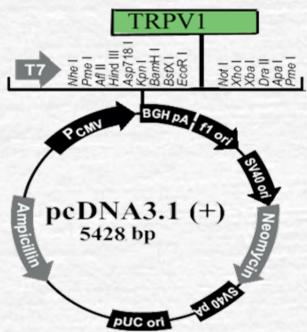
Специфичность действия Стабильность Иммуногенность Оптимизация структуры Производство



Тест система на основе ооцитов



Тест система на основе на основе животных клеток



transfection to eukaryotic cell lines (HEK293, CHO)

+ selective antibiotic

Stable cell lines

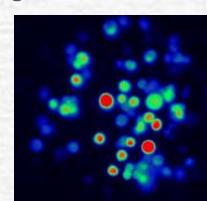
agonist and/or sample treatment

Detection using fluorescent probes

- 1. Ca2+ influx
- 2. Membrane potential change
- 3. Intracellular pH change

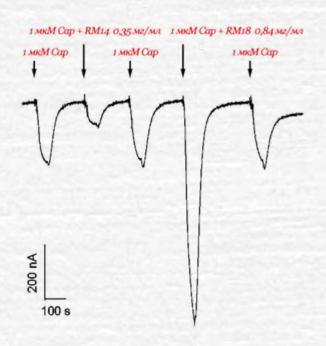
electrophysiological tests

HEK-293 TRPV1 Flou4

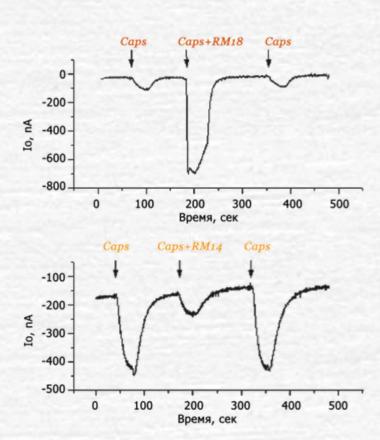




Электрофизиологический анализ экстракта Hetereractis crispa

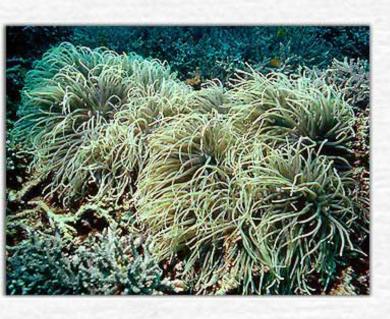








APHC1 - первый пептидный ингибитор TRPV1





GSICLEPKVVGPCTAYFRRFYFDSETGKCTVFIYGGCEGNGNNFETLRACRAICRA

pI 8.01

MW 6187.1

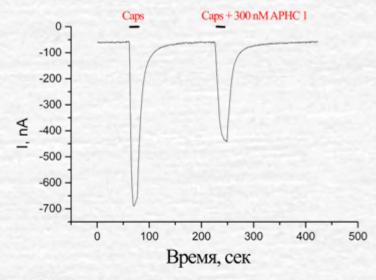


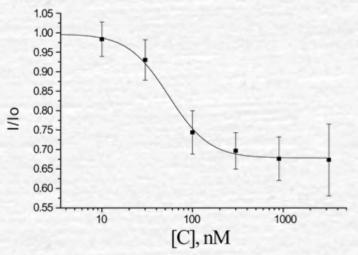
Действие на TRPV1



maximal inhibitory effect EC₅₀ Hill coefficient

32±9% 54±4 nM 2.12±0.19.



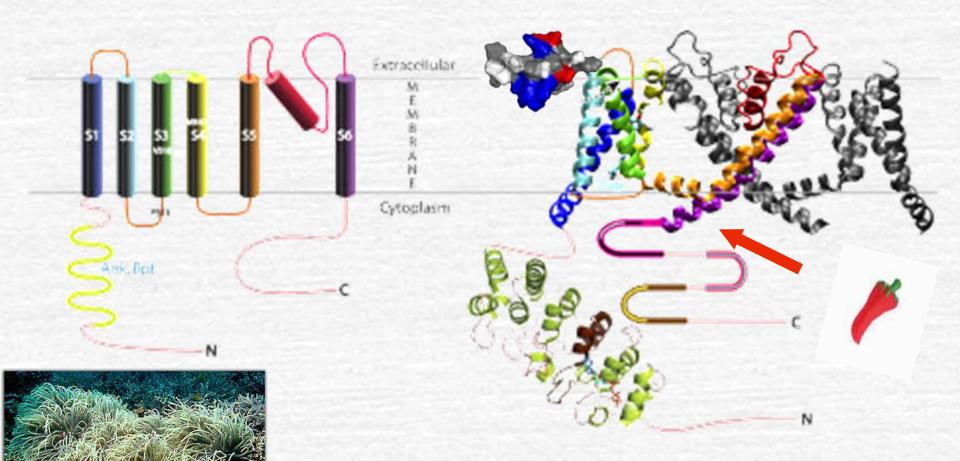




Действие АРНС1



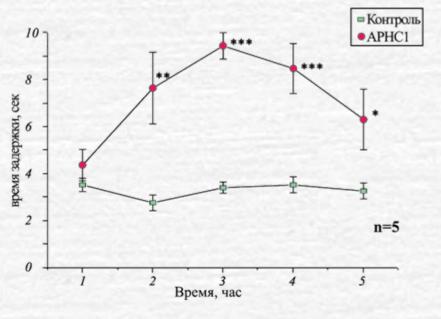
APHC1





Анальгетическая активность APHC1 in vivo

Тест отдергивания хвоста



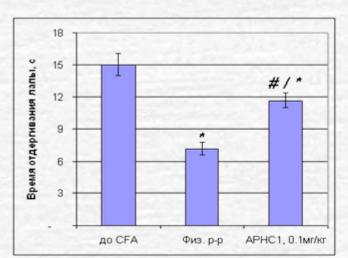
Достоверность данных к контрольному значению

* - p<0,06

** - p<0,01

***- p<0,005

Тепловая гиперчувствительность





Анальгетическая активность APHC1 in vivo

Группа анальгетиков	Название	Модели болевой стимуляции in vivo, ED ₅₀ , мг/кг	Модели болевой стимуляции in vivo, ED ₅₀ , мкмоль/кг	
НПВС (нестероидные противовоспалительные средства- ингибиторы цикооксигеназы 2)	Аспирин Диклофенак Индометацин Ибупрофен	>200 6 15 15	>1100 20 42 7.3	
опиоиды	Морфин трамадол	1-3 10	3.5 38	
Местные анестетики	Лидокаин	1-10 (местно 10-100)	43	
Антагонисты TRPV1	APHC1	0.1	0.016	

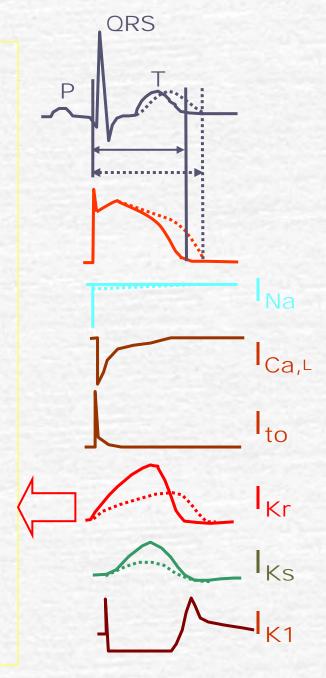


HERG (human ether-a-go-go related gene)

- клонирован в 1994 года, широко экспрессируется в сердце и нервной системе
- поро-образующая α -субъединица потенциалзависимого канала I_{Kr}
- ullet определяет быстрый компонент задержанного выпрямления (I_{kr}), отвечающий за фазу реполяризации сердца

Long QT Syndrome

- характеризуется удлинением QT интервала (более 440 мсек/360 мсек -норма)
- приводит к желудочковой аритмии
- наследственная форма LQTS связана с мутациями в гене *herg1*
- неспецифичный блок I_{кг} различными препаратами (антиаритмики, антипсихотики, антибиотики, др.) приводит к приобретенной форме LQTS





Специфичность действия ВеКт-1

K+-channel

100 nM BeKm-1(% inhibition)

0

0

0

0

0

0

0

Ca 2+-activated

$$hSK1 \quad (n=3)$$

$$rSK2 (n = 3)$$

$$hIK (n = 3)$$

$$hBK (n = 3)$$

KCNQ

$$KCNQ1/KCNE1 (n = 3)$$

$$KCNQ2+3 (n=3)$$

$$KCNQ4 (n = 3)$$

$$hERG (n = 4)$$

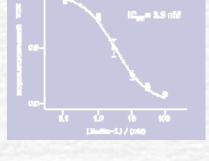
$$rELK1 (n = 3)$$

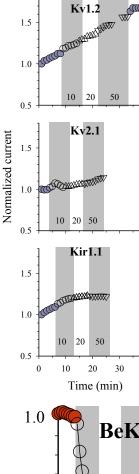
$$hEAG (n = 3)$$

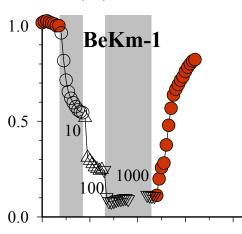
 92 ± 2











Kv1.4

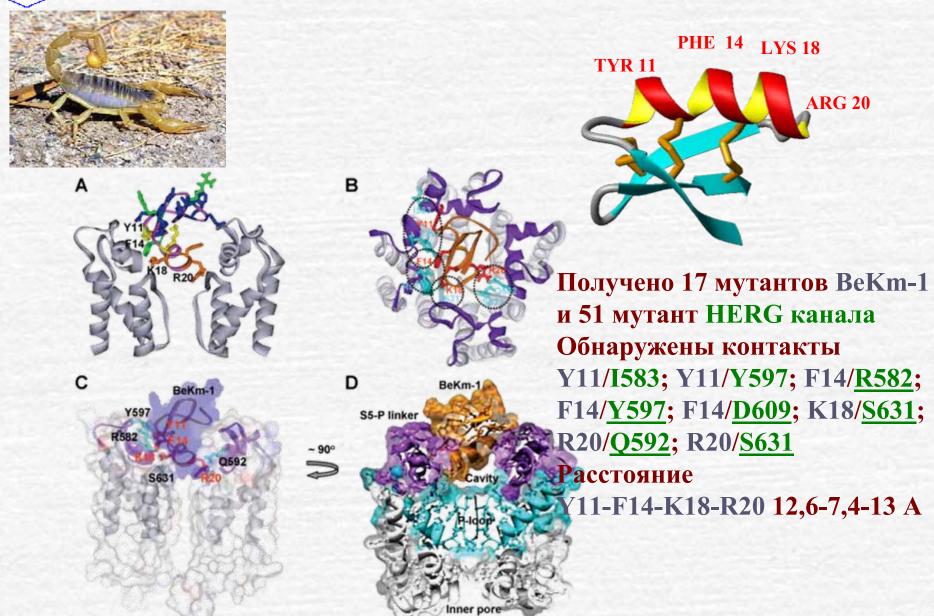
10 20 50

Kv4.3

10 20 50



Молекулярные контакты: токсин-канал





Создание пептидомиметика

