МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Волынцева Алена Дмитриевна

Молекулярное моделирование структурной динамики потенциал-управляемых калиевых каналов K_V1 и их комплексов с пептидными блокаторами

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель – *Новоселецкий Валерий Николаевич, кандидат физико-математических наук*

Научный руководитель – *Шайтан Константин Вольдемарович, доктор физико-математических наук, профессор*

Официальные оппоненты – *Шенкарев Захар Олегович, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы структурной биологии ионных каналов Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук»*

Максимов Георгий Владимирович, доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Балабаев Николай Кириллович, кандидат физико-математических наук, доцент, ведущий научный сотрудник Института математических проблем биологии РАН – филиала Института прикладной математики им. М.В.Келдыша Российской академии наук

Защита диссертации состоится « » 2019 г. в ___.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.24, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/152446596/

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Одной из актуальных задач современной биофизики является изучение структур и функций ионных каналов, а также их комплексов с белками.

Диссертация посвящена изучению потенциал-управляемых калиевых каналов семейства K_V1 – распространенной группы трансмембранных белков, осуществляющих перенос ионов K^+ через клеточную мембрану в ответ на изменение мембранного потенциала. K_V1 каналы широко распространены в организме человека и участвуют в разнообразных физиологических функциях: поддержании потенциала покоя и частоты следования потенциала действия в возбудимых клетках, реполяризации нейронального и сердечного потенциалов действия, регуляции кальциевой сигнализации и клеточного объема, стимуляции клеточной пролиферации и миграции.

Нарушения их функционирования за счет возникновения мутаций и изменения уровня экспрессии может сопровождаться развитием неврологических, аутоиммунных, онкологических заболеваний. Одной из эффективных терапевтических стратегий в этих случаях является использование блокаторов отдельных каналов, однако без достоверных структурных данных разработка высокоселективных блокаторов остается сложной задачей.

Недостаток экспериментальных данных о структурных особенностях комплексов калиевых каналов с лигандами может быть восполнен данными разработанных подходов молекулярного моделирования. Вычислительные эксперименты позволяют подробнее изучить механизмы взаимодействия и образования межмолекулярных контактов в комплексах, дополняя и, в некоторых случаях, заменяя дорогостоящие экспериментальные методики.

Методы молекулярного моделирования успешно применялись для моделирования функционирования и строения K_V-каналов и их комплексов с пептидными блокаторами поры, анализа межмолекулярных взаимодействий, описания структурных особенностей комплексов. Несмотря на значительный прогресс в этой области исследований, остаются нерешенными вопросы выявления ключевых межмолекулярных взаимодействий, определяющих аффинность и селективность связывания, разработки быстрых вычислительных алгоритмов оценки энергии связывания в макромолекулярных комплексах, а также создания методики подбора точечных мутаций, изменяющих параметры связывания блокаторов с калиевыми каналами.

Цели и задачи

Цель настоящего исследования – изучение структурной организации порового домена потенциал-управляемых калиевых каналов K_V1, а также их комплексов с пептидными блокаторами семейства α-KTx для выявления молекулярных механизмов взаимодействий.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Построение структурных моделей калиевых каналов семейства K_V1, гибридных каналов KcsA-K_V1 и их комплексов с пептидными блокаторами;
2. Анализ структурных особенностей, определяющих параметры связывания пептидных блокаторов с изучаемыми каналами;
3. Дизайн пептидных блокаторов с измененной активностью в отношении исследуемых каналов.

Научная новизна и практическая значимость работы

Настоящая диссертация посвящена исследованию структурной организации потенциал-управляемых калиевых каналов семейства K_V1, а также их комплексов с поровыми блокаторами, выделенными из яда скорпионов.

В рамках работы были впервые смоделированы структуры комплексов калиевых каналов $K_V1.1$, $K_V1.3$ и $K_V1.6$ с пептидными блокаторами семейства α-KTx методом моделирования по гомологии по шаблону кристаллографической структуры комплекса эукариотического гибридного канала $K_V1.2$-2.1 с харибдотоксином (ChTx). Было продемонстрировано, что такой подход в сочетании с разработанным протоколом расчета молекулярной динамики (МД) позволяет получать достоверные комплексы, отражающие реальные детали подстройки структур молекул в процессе связывания и позволяющие предсказывать аффинность связывания мутантных форм блокаторов.

В результате работы был детально описан интерфейс связывания калиевых каналов $K_V1.1$, $K_V1.3$ и $K_V1.6$ с пептидными высокоаффинными блокаторами, выделенными из яда скорпионов. Полный репертуар образующихся контактов был классифицирован согласно типам взаимодействия и относительным оценкам их стабильности в процессе МД, определены ключевые для формирования комплексов аминокислотные остатки (а.о.) каналов и токсинов. Анализ интерфейсов взаимодействий позволил выявить консервативные и вариабельные контакты в ряду комплексов пептидов с каналами $K_V1.1$, $K_V1.3$ и $K_V1.6$. Проведенные исследования доказали воспроизводимость образующихся контактов в комплексах токсинов семейства α-KTx с нативными $K_V1.X$ и гибридными

каналами KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6), что позволяет в дальнейшем использовать модельные системы гибридных каналов для анализа связывания с блокаторами.

Разработанный алгоритм расчета энергии связывания за счет оценки силы образующихся контактов впервые позволил расчетным путем проанализировать различия в связывании пептидных блокаторов с калиевыми каналами K_V1.1, K_V1.3 и K_V1.6, согласующиеся с экспериментальными данными *in vitro*. Применение оригинальной методики расчета интерфейса связывания позволило оценить влияние предложенных мутаций в аминокислотные последовательности токсинов на аффинность их связывания с каналом K_V1.1. Помимо этого, применение разработанного подхода позволяет значительно минимизировать временные и вычислительные затраты, что позволяет расценивать его как экспресс-метод перед проведением классических экспериментов *in silico* и *in vitro*.

В качестве подтверждающей оценки энергии взаимодействия дикой и мутантных форм аджитоксина 2 (AgTx2) с гибридным каналом KcsA-K_V1.1 были произведены расчеты методом потенциала средней силы. Результаты проведенных расчетов согласуются с экспериментально полученными *in vitro* константами связывания и результатами оценки аффинности связывания за счет предложенного алгоритма описания всех образующихся взаимодействий.

Результаты работы представляют значимость для дальнейших фундаментальных научных исследований функционирования калиевых каналов и процессов связывания высокомолекулярных соединений и, в частности, изучения структурных основ аффинности и селективности пептидных блокаторов при взаимодействии с каналами.

Конструирование селективных блокаторов на основе проведенного детального анализа интерфейсов связывания с калиевыми каналами важно для белкового инжиниринга и рационального дизайна лекарственных средств на основе мутантных форм пептидных блокаторов. Полученные результаты также интересны для разработки молекулярных детектирующих систем *in vivo*, позволяющих определять места экспрессии конкретных каналов, что важно как с точки зрения вклада в развитие науки физиологии и биофизики, так и с прикладной стороны для направленной терапии заболеваний, связанных с гиперэкспрессией отдельных калиевых каналов.

Разработанный вычислительный алгоритм является универсальным и может быть распространен на моделирование комплексов других каналов с пептидными лигандами. Выявленные особенности строения высокомолекулярных комплексов могут быть использованы для включения в

программу учебных курсов по биофизике и физиологии человека и животных.

Личный вклад автора

Автором выполнены детальный анализ опубликованных экспериментальных данных о константах связывания потенциал-управляемых калиевых каналов и пептидных блокаторов, создание молекулярных моделей калиевых каналов, блокаторов и их комплексов методами молекулярного докинга и моделирования по гомологии, проведение расчетов МД, получение энергетических оценок связывания каналов с блокаторами, обработка полученных данных и подготовка результатов к печати.

Планирование исследований, разработка алгоритма анализа контактов, образующихся в комплексах калиевых каналов с пептидными блокаторами, обсуждение полученных результатов, формулирование выводов и публикация статей осуществлялись совместно с руководителями, к.ф.-м.н., Новоселецким В.Н., д.ф.-м.н., профессором Шайтаном К.В., а также с д.б.н., профессором Феофановым А.В.

Положения, выносимые на защиту

1. Структура комплексов потенциал-управляемых калиевых каналов с исследуемыми пептидными блокаторами является консервативной в пределах семейства K_V1 каналов.
2. Взаимодействия пептидных блокаторов с потенциал-управляемыми калиевыми каналами семейства K_V1 носят многоточечный характер. Влияние введения отдельных локальных мутаций в аминокислотную последовательность пептидов может компенсироваться за счет структурных перестроек боковых цепей соседних а.о.
3. Аминокислотные остатки D411, Y425, G426 и D427 каналов $K_V1.X$ (X=1, 3, 6) являются основными для связывания токсинов семейства α-KTx, включая AgTx2, KTx, OSK1.
4. Высокий уровень воспроизводимости образуемых контактов доказывает возможность использования модели гибридного канала KcsA-$K_V1.X$ (X=1, 3, 6) для исследования процесса связывания блокаторов с соответствующим нативным каналом $K_V1.X$ (X=1, 3, 6).

Апробация работы

Результаты проведенных исследований были представлены в виде стендовых докладов на российских и международных конференциях, конгрессах и симпозиумах: Международной конференции "BIOMEMBRANES 2018" (Долгопрудный, Россия, 2018) и

"BIOMEMBRANES 2016" (Долгопрудный, Россия, 2016), Международной научной конференции "XII чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды" (Москва, Россия, 2017), Российской международной конференции по криоэлектронной микроскопии RICCEM2017 (Москва, Россия, 2017), Первом Российском кристаллографическом конгрессе (Москва, Россия, 2016), 41 конгрессе FEBS (Кушадасы, Турция, 2016), Международном симпозиуме "Molecular Neurobiology Today and Tomorrow" (Москва, Россия, 2017), Международном конгрессе "Биотехнологии: состояние и перспективы развития" (Москва, Россия, 2017), Седьмой международной конференции по Биоинформатике (работа награждена дипломом за лучший доклад) (Рим, Италия, 2016), Десятой международной конференции "Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/BGRS-2016" (Москва, Россия, 2016), Международной конференции "Channelopathy-2016" (Париж, Франция, 2016), Седьмом российском симпозиуме "БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ" (Новосибирск, Россия, 2015), Международной школе для студентов и молодых ученых по структуре и функциям ионных каналов (ISonIC-2016) (Москва, Россия, 2016), а также в виде устного доклада на XXII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015" (Москва, Россия, 2015) и пленарного доклада на Пятой Международной научной конференции молодых ученых (Баку, Азербайджан, 2017).

Публикации

По материалам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, и 17 тезисов в сборниках научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 163 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список публикаций по теме диссертации и список литературы, состоящий из 344 наименований. Работа содержит 40 рисунков и 10 таблиц.

Список используемых сокращений

K_V – потенциал-управляемый калиевый канал,
а.о. – аминокислотный остаток,
МД – молекулярная динамика,
ПСС – потенциал средней силы,
СКО – среднеквадратичное отклонение,
СФ – селективный фильтр.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во Введении сформулированы цели и задачи исследования, обоснована актуальность, новизна и практическая значимость работы.

Литературный обзор

Литературный обзор содержит информацию о классификации, экспериментальных данных о пространственной структуре, механизме функционирования и физиологической роли потенциал-управляемых калиевых каналов и их пептидных блокаторов, а также образуемых ими комплексов, освещен терапевтический потенциал применения пептидных блокаторов в лечении болезней человека. Отдельный раздел посвящен вопросам применения современных методов молекулярного моделирования для исследования калиевых каналов и их комплексов с лигандами, а также для проведения расчетов энергии связывания каналов с блокаторами.

В обзоре литературы показано, что несмотря на значительные успехи структурной биологии детальный анализ возникающих взаимодействий между каналами и блокаторами, молекулярных подстроек в процессе связывания, а также выявление ключевых а.о. при возникновении комплексов каналов K_V1 с пептидными блокаторами остается сложной задачей. Ее актуальность подтверждается ролью K_V1 каналов при возникновении большого числа онкологических, аутоиммунных, метаболических и нейрофизических заболеваний человека и обнаруженной эффективностью применения блокаторов каналов для лечения.

Материалы и методы

В данном разделе описаны вычислительные методы создания и уравновешивания структур потенциал-управляемых калиевых каналов семейства K_V1 и пептидных блокаторов.

В первую очередь был описан подход к анализу опубликованных экспериментальных данных о связывании калиевых каналов K_V1 с блокаторами, в дальнейшем использующихся для оценки достоверности получаемых результатов с помощью методов молекулярного моделирования. Выравнивание аминокислотных последовательностей токсинов было проведено для выявления консервативных участков. Модели блокаторов были построены на основе экспериментальных структур или с помощью метода моделирования по гомологии, для создания мутантных форм были введены точечные замены. Затем структуры были уравновешены методом молекулярной динамики (МД) в водном окружении и проанализированы. Для моделирования структур нативных K_V1 каналов и их гибридных форм

KcsA-K_V1 использовался аналогичный подход – моделирование по гомологии на основе экспериментально полученных структур канала K_V1.2 и KcsA, соответственно, и уравновешивание методом МД.

Детально описан алгоритм создания молекулярных моделей комплексов нативных K_V1.X (X=1, 3, 6) и гибридных каналов KcsA-K_V1 с токсинами, включающий непосредственно построение по гомологии с экспериментальными структурами (каналом K_V1.2-2.1 в комплексе с ChTx (pdb-код 4JTA) и каналом KcsA с введенными мутациями в комплексе с ChTx (pdb-код 2A9H)), замену структур в комплексах на предварительно уравновешенные модели, алгоритм подбора оптимальной ориентации блокаторов в сайте связывания канала-мишени за счет поворота относительно исходной ориентации вокруг оси поры канала и расчета МД для каждого положения.

В диссертации описан метод расчета вклада возникающих взаимодействий между а.о. канала и блокатора (гидрофобных контактов, водородных и ионных связей) и оценки их стабильности, использующийся для сравнения аффинности связывания пептидных блокаторов с отдельными каналами. Определены ключевые а.о. каналов и токсинов, ответственные за аффинность связывания блокаторов и в дальнейшем использующиеся как точки введения мутаций для изменения параметров связывания. В качестве подтверждающей оценки связывания дикой и мутантных форм токсина AgTx2 с каналом K_V1.1 были проведены расчеты энергии связывания с помощью метода потенциала средней силы (ПСС).

Результаты и обсуждение

Моделирование структур нативных каналов K_V1 и гибридных каналов KcsA- K_V1

В организме человека экспрессируются полноразмерные эукариотические калиевые каналы K_V1, каждая субъединица которых состоит из порового и потенциал-чувствительного домена. Для подробного изучения функционирования порового домена и характера его взаимодействия с пептидными блокаторами на модельных системах, например, сферопластах, ранее были разработаны гибридные каналы KcsA-K_V1, остов которых представляет собой бактериальный канал KcsA, а характерные P-петли перенесены из соответствующего K_V1 канала. Такая упрощенная конструкция позволяет экспрессировать каналы на мембране и за счет высокого уровня гомологии внеклеточных областей поровых доменов достоверно воспроизводить параметры связывания канала K_V1 с пептидными блокаторами.

В первом разделе были проанализированы аминокислотные последовательности, а также рассмотрены пространственные структуры нативных K_V1.X (X=1, 3, 6) и гибридных калиевых каналов KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6), общие черты организации, а также отличающие детали строения (Рис. 1). В результате моделирования обнаружено, что внеклеточный фрагмент порового домена Kcsa-K_V1 (K_V1) каналов характеризуется широким и довольно плоским плато квадратной формы (площадью около 10 нм^2), окружающим просвет поры. Плато граничит с неструктурированными P-образными петлями, поднимающимися над плато приблизительно на 1 нм.

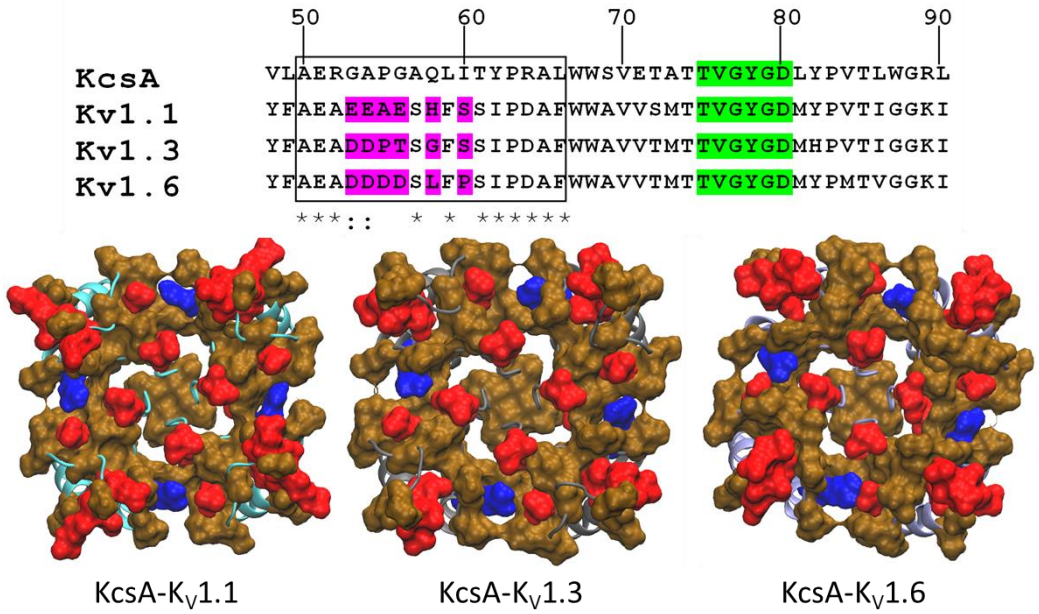

Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей каналов KcsA, K_V1.1, K_V1.3 и K_V1.6. Рамкой на выравнивании выделена область, перенесенная из эукариотического канала K_V1.X и встроенная в соответствующий гибридный канал KcsA-K_V1.X. Фиолетовым отмечены вариабельные а.о., зеленым – консервативные; синим – положительно заряженные, красным – отрицательно; коричневым – гидрофобные а.о.

Показано, что структура каналов является в целом консервативной и стабильной в процессе моделирования МД. Так, селективный фильтр (СФ) каналов не претерпевает значительных изменений (СКО Cα-атомов ~1 Å). Наиболее мобильными частями структуры являются P-петли, последовательность которых обогащена анионными остатками: K_V1.1 (суммарный заряд четырех петель -20), K_V1.2 (-16), K_V1.3 (-16) и K_V1.6 (-24). Величина отрицательного заряда, по-видимому, влияет на связывание пептидных катионных блокаторов, облегчая им распознавание KV1 каналов на плазматической мембране. Расположение ароматических остатков на поверхности каналов K_V1 (KcsA-K_V1) консервативно, за исключением Y429,

который присутствует в каналах K_V1.1, K_V1.6, но не в K_V1.3. Присутствие остатка L405 (L58) в P-петле канала K_V1.6 (KcsA-K_V1.6) создает четыре четко определенных гидрофобных участка в гидрофильной поверхности канала. Описанные различия в расположении ароматических и заряженных остатков каналов являются основой селективности связывания пептидных блокаторов.

Моделирование структур пептидных блокаторов

В рамках работы было проведено моделирование пространственных структур следующих пептидных блокаторов, выделенных из яда скорпионов: аджитоксин (AgTx2), калиотоксин (KTx), токсин OSK1. Они относятся к семейству α-KTx токсинов, структура которых включает в себя консервативный «цистеин-стабилизированный α/β мотив» (CSα/β), α-спираль соединена дисульфидными мостиками с антипараллельным β-листом. Исследуемые токсины демонстрируют высокий уровень гомологии аминокислотных последовательностей (более 75%; 29 из 38 аминокислотных остатков являются инвариантными для всех трех пептидов, 34 остатка инвариантны для пары AgTx2 и KTx, Рис. 2). При pH=7 суммарный заряд изучаемых токсинов α-KTx — положительный и варьирует от +6 до +8, а отрицательно заряженные остатки встречаются преимущественно в N-концевой половине пептида.

При моделировании в водном окружении было показано, что пространственные структуры пептидов стабильны (СКО Cα-атомов ~1 Å), высокую подвижность демонстрируют боковые цепи, изменяя доступную растворителю поверхность а.о. и количество образующихся в молекулах блокаторов водородных связей.

Моделирование структур комплексов калиевых потенциал-управляемых калиевых каналов с пептидными блокаторами

Конструирование структур комплексов потенциал-управляемых калиевых каналов K_V1.X (X=1, 3, 6) и их гибридов KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) с пептидными блокаторами (AgTx2, KTx, OSK1) было произведено методом моделирования по гомологии по шаблону комплекса гибридного канала K_V1.2-2.1 с харибдотоксином (ChTx) (pdb код 4JTA). Полученные модели были использованы для расчета молекулярной динамики.

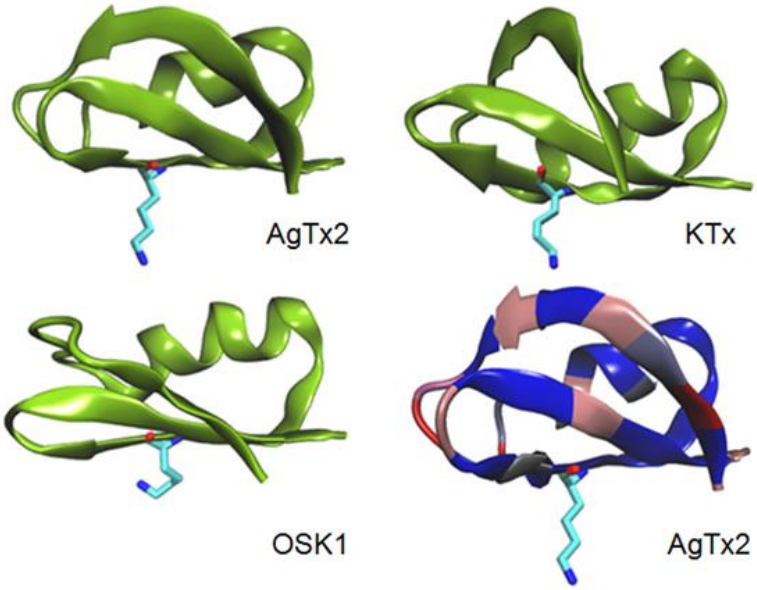

Рис. 2. Трехмерные структуры токсинов AgTx2, KTx, OSK1 в ленточном представлении, остаток K27 – в стержневом представлении. Окраска структура AgTx2 визуализирует локализацию вариабельных (красных) и консервативных (синих) остатков токсинов.

В результате анализа траектории МД при повороте токсинов относительно оси канала было обнаружено, что AgTx2 возвращается в исходное положение в комплексе с каналом KcsA-K_V1.6, в то время как в комплексах с KcsA-K_V1.1 и KcsA-K_V1.3 он поворачивается на 5° и 12° относительно ориентации ChTx в структуре 4JTA. Повороты токсинов могут рассматриваться как характерные подстройки для взаимодействий с отдельными видами KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) каналов. Такой подход позволяет исследовать все возможные положения блокаторов в сайте связывания и выделять наиболее стабильные.

Показано сходство общей картины связывания пептидных блокаторов семейства α-KTx с изучаемыми каналами, а также стабильность вторичной структуры токсинов (СКО Cα-атомов < 1,5 Å), поровых спиралей, СФ и петель D80-T85 каналов (СКО Cα-атомов последовательности TVGYG < 1 Å), в то время как подстройка структуры канала к токсину происходит в области P-петель. В уравновешенном комплексе токсины ассиметрично связываются с плато, образованным субъединицами канала вокруг поры и окруженным четырьмя выступами P-петель. Первый β-тяж и α-спираль токсинов скорпиона обращены в противоположную от канала сторону, в то время как второй и частично третий β-тяжи образуют контакты с поверхностью канала (Рис. 3). Второй β-тяж образует бóльшую часть контактов с порой канала, в то время как α-спираль преимущественно связывается с одной из P-петель канала.

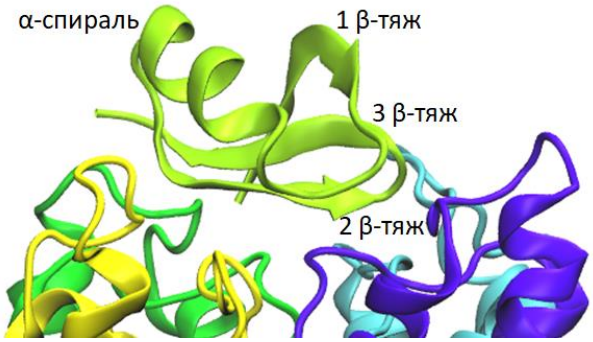

Рис. 3. Молекулярная модель структуры комплекса гибридного калиевого канала KcsA-K_V1.1 с AgTx2.

Особенности интерфейса взаимодействия K_V1.X каналов с аджитоксином

Структуры комплексов AgTx2 с каналами семейства K_V1 до сих пор не являются детально изученными. Для подробного изучения интерфейсов связывания была применена разработанная методика, включающая в себя оригинальный алгоритм расчета МД и использование расширенной версии программного пакета Platinum для оценки вклада каждого образующегося контакта.

Характеристика интерфейса связывания аджитоксина 2 с каналом KcsA-K_V1.3

Отличительной чертой структуры комплекса гибридного канала KcsA-K_V1.3 с AgTx2 является поворот пептида в сайте связывания канала на 12° относительно исходного положения, соответствующего положению харибдотоксина в экспериментальной структуре его комплекса с каналом K_V1.2-2.1. Это может рассматриваться как характерная адаптационная подстройка структуры токсина к консервативной и стабильной в процессе МД структуре порового домена канала K_V1.3.

В результате проведенного анализа было выявлено 16 остатков токсина AgTx2 и 11 остатков канала KcsA-K_V1.3, образующих контакты. Сеть взаимодействий сложна и включает в себя 12 гидрофобных контактов, 21 водородную и 7 ионных связей (Рис. 4). В стабилизации комплекса особую роль играют ионные связи, т.к. поровый домен канала K_V1.3 обогащен анионными а. о., в то время как AgTx2 имеет 7 катионных и только 1 анионный а. о.

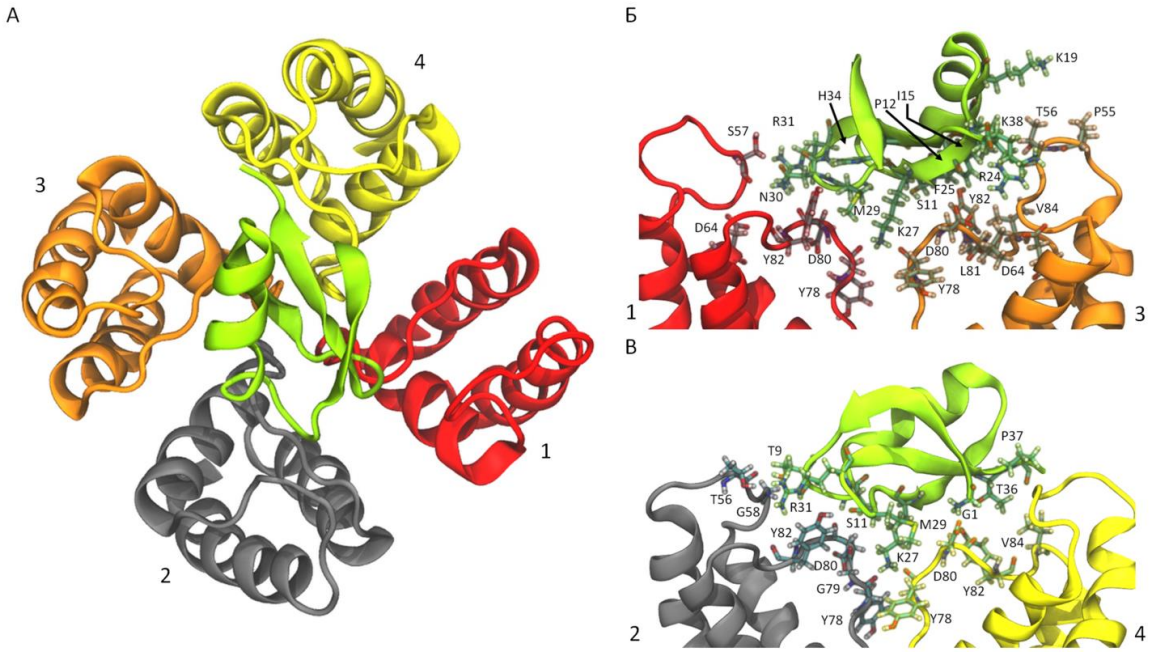

Рис. 4. Модель комплекса гибридного канала KcsA-K_V1.3 с AgTx2: вид сверху (А) и сбоку (Б, В). Боковые цепи субъединиц канала и токсина показаны в спиральном представлении. Номера субъединиц указаны арабскими цифрами.

Остаток токсина K27 образует водородные связи со всеми 4 остатками Y78 СФ и закупоривает пору канала, причем его взаимодействие с порой является идентичным для комплексов AgTx2 с родственными K_V1.X (X=1, 3, 6) каналами. Значительный вклад в образование водородных связей вносят остатки токсина T9 и R31. За образование гидрофобных контактов отвечают остатки S11, P12, I15, F25, M29, P37. Взаимодействия остатков R24, F25, K27 и N30 являются ключевыми для образования комплекса с каналом K_V1.3.

Со стороны канала взаимодействующие остатки расположены в P-петле, поровой спирали, СФ и на плато канала. Остатки поровой спирали (D64), СФ (Y78, G79) и плато (D80, L/M81) являются инвариантными для каналов K_V1.X (X=1–3, 6) и участвуют в связывании AgTx2. Значительное число инвариантных остатков, участвующих в процессе связывания AgTx2, может быть причиной низкой селективности взаимодействий AgTx2 с K_V1-каналами. С другой стороны, остатки E56, H58 и частично остаток Y82 варьируют в ряду K_V1-каналов, поэтому остатки AgTx2, взаимодействующие с ними, могут рассматриваться как точки введения возможных мутаций, повышающих селективность взаимодействия.

Детальный анализ структур комплексов каналов K_V1.6 и KcsA-K_V1.6 с пептидными блокаторами

В диссертационной работе были получены и охарактеризованы молекулярные модели комплексов эукариотического канала K_V1.6 и гибридного канала KcsA-K_V1.6 и набором токсинов скорпионов: аджитоксином 2 (AgTx2), калиотоксином (KTx) и токсином OSK1 (Рис. 5). Создание моделей комплексов каналов с токсинами было выполнено с помощью метода моделирования по гомологии по шаблону структуры комплекса гибридного канала K_V1.2-2.1 с ChTx (PDB код 4JTA) благодаря высокому уровню гомологии между соответствующими молекулами.

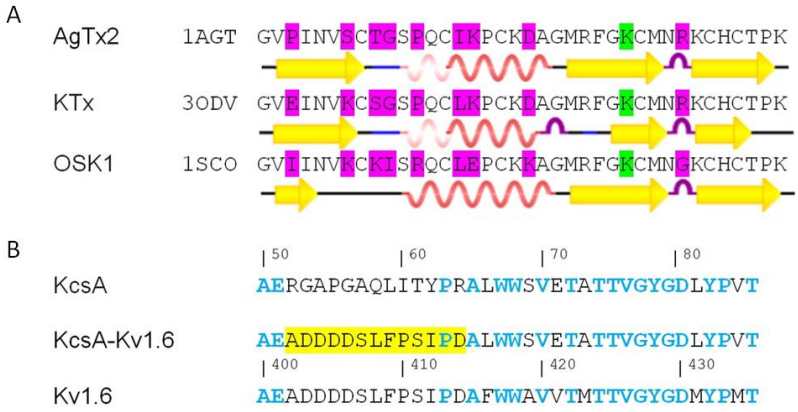

Рис. 5. А – Выравнивание последовательностей и элементов вторичной структуры токсинов AgTx2, KTx, OSK1 в соответствии с PDB-файлами 1AGT, 3ODV и 1SCO. Вариабельные аминокислоты отмечены пурпурным. Блокатор поры K27 отмечен зеленым. Красные и светло-красные волнистые линии обозначают α-спирали и 3/10-спирали, соответственно, фиолетовые мостики - повороты, синие линии - изгибы, желтые стрелки - β-структуры, черные линии – неупорядоченные вторичные структуры. В – Выравнивание аминокислотных последовательностей P-петель каналов KcsA, KcsA-K_V1.6 и K_V1.6. Желтый цвет обозначает последовательность, перенесенную из Kv1.6 в KcsA для формирования канала KcsA-K_V1.6. Остатки, идентичные в K_V1.6 и KcsA, отмечены синим.

Общий вид структуры комплексов поровых доменов KcsA-K_V1.6 (K_V1.6) каналов с поровыми блокаторами консервативен в ряду комплексов K_V1.X (X=1, 3, 6) каналов. Согласно расчетам МД блокаторы AgTx2, KTx и OSK1 сохраняют свою исходную структуру в комплексе с KcsA-K_V1.6 и K_V1.6 каналами (СКО Cα-атомов = 0,5 Å). Также стабильной была структура СФ канала KcsA-K_V1.6 (Kv1.6) (СКО Cα-атомов = 1 Å), тогда как структура P-петель менялась в большей степени (СКО Cα-атомов = 2,5 Å). Было

замечено, что наибольшей подвижностью обладала P-петля первой субъединицы, образующей наименьшее число связей с токсинами.

Расчеты МД показали, что AgTx2 и KTx релаксируют в комплексе с K_V1.6 (KcsA-Kv1.6) каналом к исходной ориентации токсина ChTx в структуре 4JTA, в то время как OSK1 поворачивается на -5° в плоскости, перпендикулярной к оси канала.

Комплексы стабилизируются взаимодействиями 15-19 остатков AgTx2, KTx и OSK1 с 10 остатками канала (на Рис. 6 изображена модель комплексов AgTx2 с каналами K_V1.6 и KcsA-Kv1.6).

Со стороны канала можно выделить два кластера взаимодействующих а.о.: P-петли (D402, D403, L405 (соответствующие D55, D56, L58 в гибридном канале KcsA-K_V1.6)) и СФ с плато вокруг поры (Y425, G426 (Y78, G79) и D427, M428, Y429 (D80, L81, Y82, V84) и D411 (D64)) (Рис. 5, 6). В результате молекулярного моделирования показано, что 81, 77 и 75% связей в комплексах (KcsA-K_V1.6)-AgTx2, (KcsA-K_V1.6)-KTx и (KcsA-K_V1.6)-OSK1 являются такими же, как в комплексах K_V1.6-AgTx2, K_V1.6-KTx и K_V1.6-OSK1 соответственно. Высокий уровень воспроизводимости образуемых контактов доказывает возможность использования модели гибридного канала KcsA-K_V1 для исследования процесса связывания блокаторов соответствующим нативным каналом K_V1.

Среди взаимодействующих а.о. канала K_V1.6 остатки D402, D403, L405 и P407, расположенные на P-петле, и остаток Y429 могут быть ответственны за специфическую модуляцию связывания пептидного блокатора, поскольку являются наиболее вариабельным участком в последовательности каналов K_V1.X (X=1-3), в то время как а.о. D411, Y425, G426, D427 и M428, наоборот, являются консервативными и могут рассматриваться как базовая группа а.о. для связывания токсинов с K_V1.X (X=1-3) и K_V1.6.

В результате проведенной работы обнаружено, что со стороны токсинов во взаимодействии с каналами участвуют семь гомологичных а.о. (L(I)15, R24, F25, K27, M29, N30, P37), воспроизводимых во всех изучаемых комплексах, причем пять из них образуют узлы взаимодействий (три и более связей) – L(I)15, R24, F25, K27 и M29 – и являются основой высокой аффинности связывания изучаемых токсинов с каналами.

Вариабельными аминокислотными остатками изучаемых токсинов являются 3, 7, 9 и частично, 15 для KTx по отношению к AgTx2, остатки 3, 7, 9, 10, 16, 20 и 31 для OSK1 против AgTx2 и KTx (Рис. 5). Детальный анализ образующихся взаимодействий показал, что аффинность связывания токсинов с K_V1.6 (KcsA-K_V1.6) каналом определяется всей совокупностью образующихся контактов: гидрофобными контактами, водородными и ионными связями.

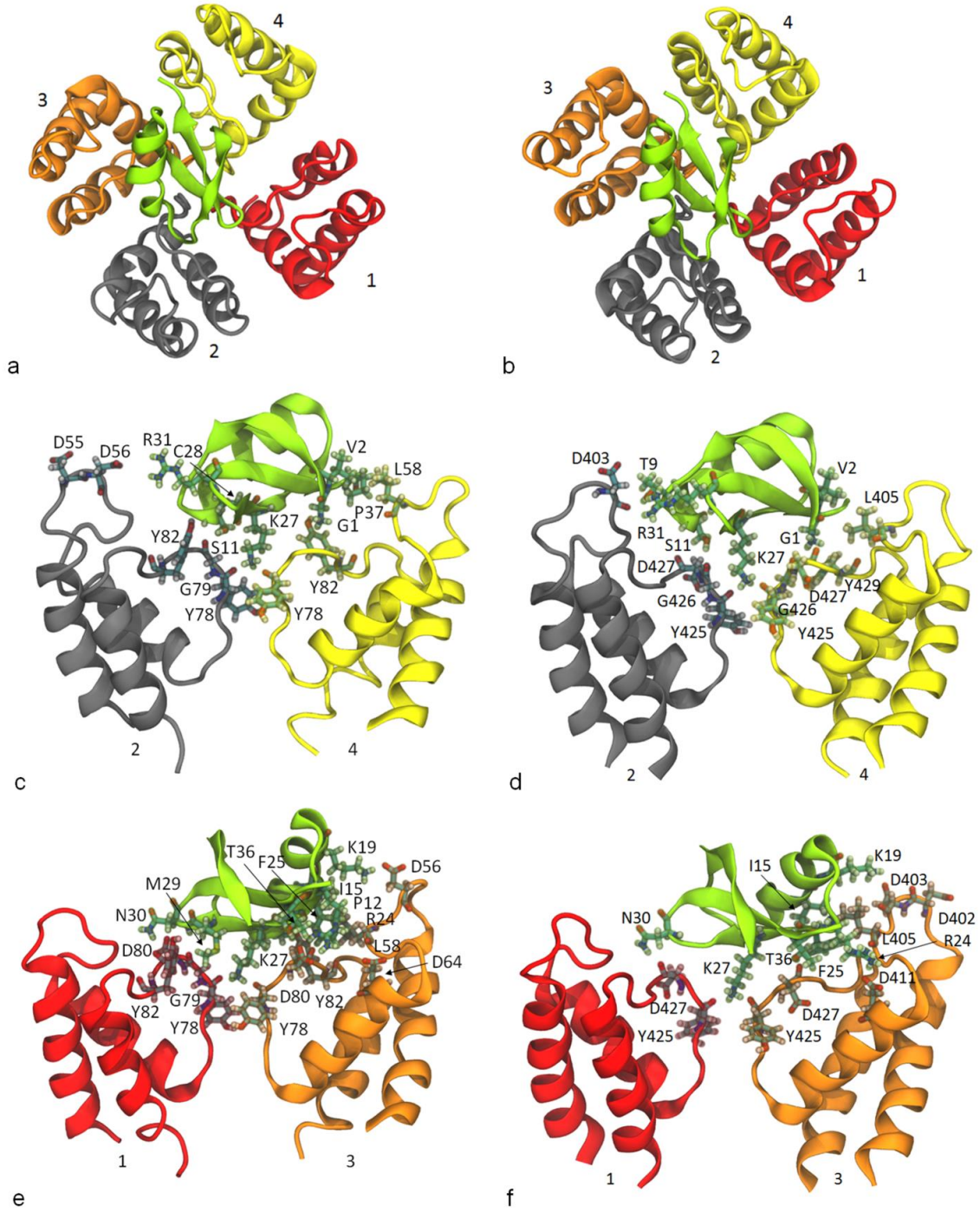

Рис. 6. Модель комплекса гибридного канала KcsA-Kv1.6 (a, c, e) и Kv1.6 (b, d, f) с AgTx2: вид сверху (a, b) и сбоку (c-f). Боковые цепи субъединиц канала (красный, серый, оранжевый и желтый) и токсина (зеленый) показаны в ленточном представлении. Номера субъединиц указаны арабскими цифрами. Вид сбоку показан без передней и задней субъединиц для удобства восприятия. В панелях c-f боковые цепи взаимодействующих остатков показаны с использованием стержневого представления.

Детальное описание связывания нативной и мутантных форм аджитоксина 2 с каналом KcsA-K_V1.1.

Модель комплекса канала KcsA-K_V1.1 с AgTx2 была построена с помощью стандартной методики, новшеством которой стало использование двух алгоритмов расчетов МД. В первом случае, Cα-атомы аминокислотных остатков трансмембранных спиралей были заморожены для симуляции мембранного окружения, в то время как во втором все Cα-атомы комплекса канала с токсином были заморожены, за исключением Cα-атомов P-петель, чтобы достичь окончательной адаптации наиболее подвижных P-петель к токсину в комплексе, и только затем была проведена МД с замороженными Cα-атомами остатков трансмембранных спиралей. Такой подход позволил наиболее полно оценить все возникающие в комплексе взаимодействия.

В результате проведенного анализа структуры комплекса обнаружено, что AgTx2 поворачивается на угол +5° относительно его начальной ориентации. Как и в комплексах с K_V1.3 и K_V1.6 каналами, вторичная структура AgTx2, а также поровых спиралей, СФ и петель D80-T85 канала K_V1.1 остается стабильной (СКО Cα-атомов < 1,5 Å). Интерфейс взаимодействия формируется 13 остатками токсина AgTx2 и 8 остатками канала KcsA-K_V1.1 и включает в себя шесть ионных связей, пятнадцать водородных связей, четыре гидрофобных контакта и стэкинг взаимодействие (Рис. 7).

Ионные взаимодействия AgTx2 являются движущей силой образования комплекса с каналом K_V1.1: a.o. K16, K19, R24, R31 и N-конец токсина образуют связи a.o. канала E56 P-петли, D64 поровой петли и D80, примыкающим к СФ канала. Ключевую роль в замыкании поры играет a.o. K27, образующий стабильные водородные связи с атомами кислорода остатков тирозина поры канала K_V1.1. Стабильные водородные связи также образованы остатками T9, S11, C28, N30 и T36. Гидрофобные контакты неполярных остатков I15 и F25 являются еще одним фактором стабилизации комплекса. На основе сравнительного анализа образующихся контактов был сделан вывод, что a.o. R24, F25, K27 и N30 формируют основу высокой аффинности токсина AgTx2 к каналам K_V1.X (X=1, 3, 6).

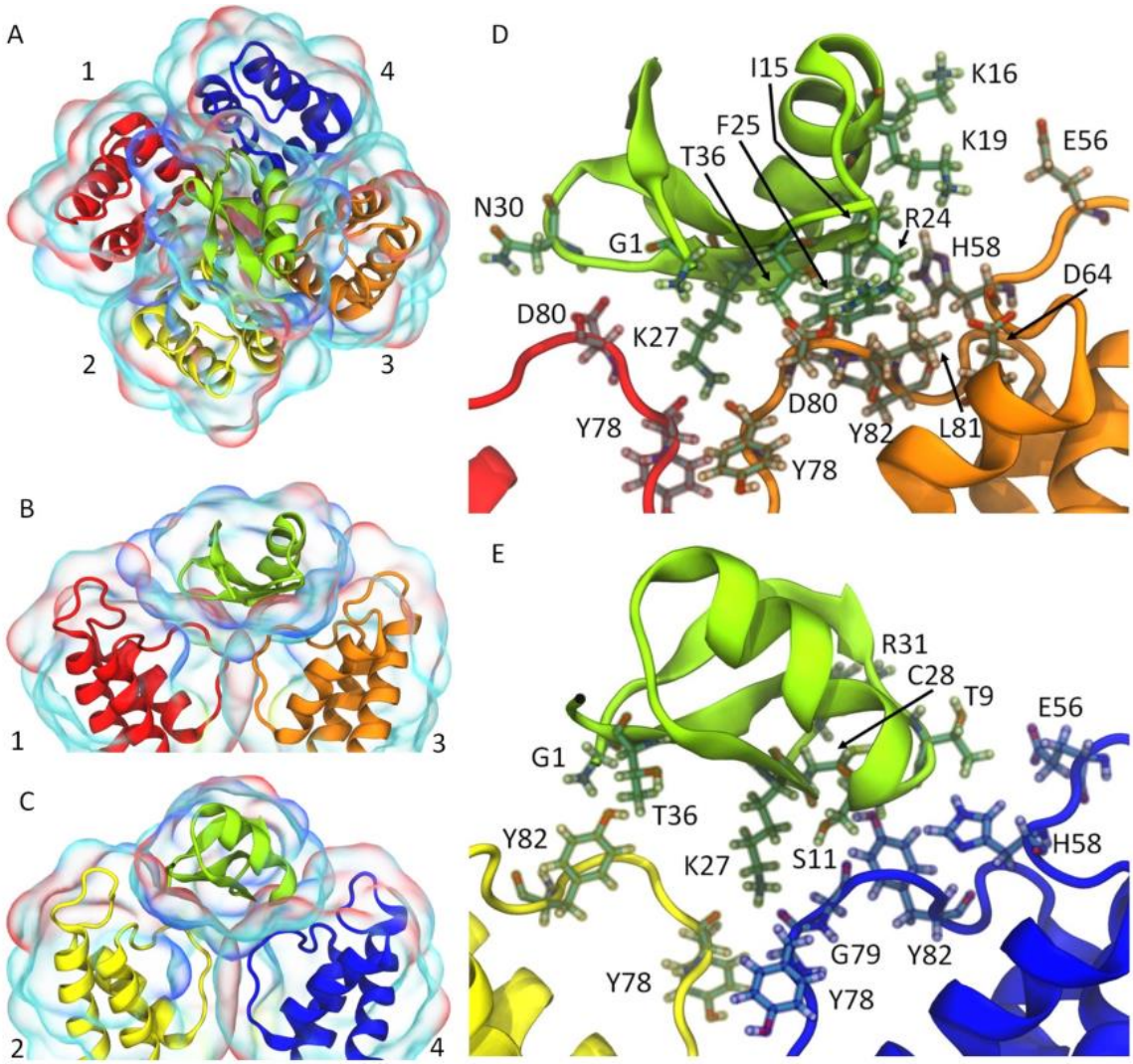

Рис. 7. Модель комплекса AgTx2 с каналом KcsA-K_V1.1: вид сверху (A) и сбоку (B-E). субъединицы канала (красный, синий, оранжевый и желтый) и токсин (зеленый) показаны в ленточном представлении. Номера субъединиц отмечены арабскими цифрами. На видах передняя и задняя субъединицы для ясности не показаны. Молекулярные поверхности показаны в облачном представлении [56] на панелях A-C (N, C и O атомы кодируются синим, голубым и красным цветом соответственно). На панелях D и E боковые цепи взаимодействующих остатков показаны с использованием стержневого представления.

Со стороны K_V1.1 канала сайт связывания с токсином AgTx2 сформирован в большей степени за счет пяти аминокислотных остатков СФ (Y78, G79) и прилегающей петли (D80, L/M81, Y82), формирующей плато вокруг поры. В дополнение, два и один взаимодействующий остаток расположены на башенке (E56) и поровой спирали (D64) соответственно. Значительное число инвариантных а.о. среди K_V1.X (X=1-3, 6) каналов, участвующих в связывании AgTx2 (D64, Y78, G79, D80, L/M81), по-

видимому, является причиной как одинакового высокого сродства, так и низкой селективности взаимодействий AgTx2 с родственными K_V1-каналами. Среди остатков H58, E56, Y78, D80 и Y82, которые образуют четыре или более контактов с AgTx2, остатки E56, H58 и Y82 (частично) варьируются в K_V1-каналах и могут рассматриваться как ключевые для корректировки селективности связывания AgTx2 с K_V1.1 путем введения соответствующих мутаций (Рис. 8).

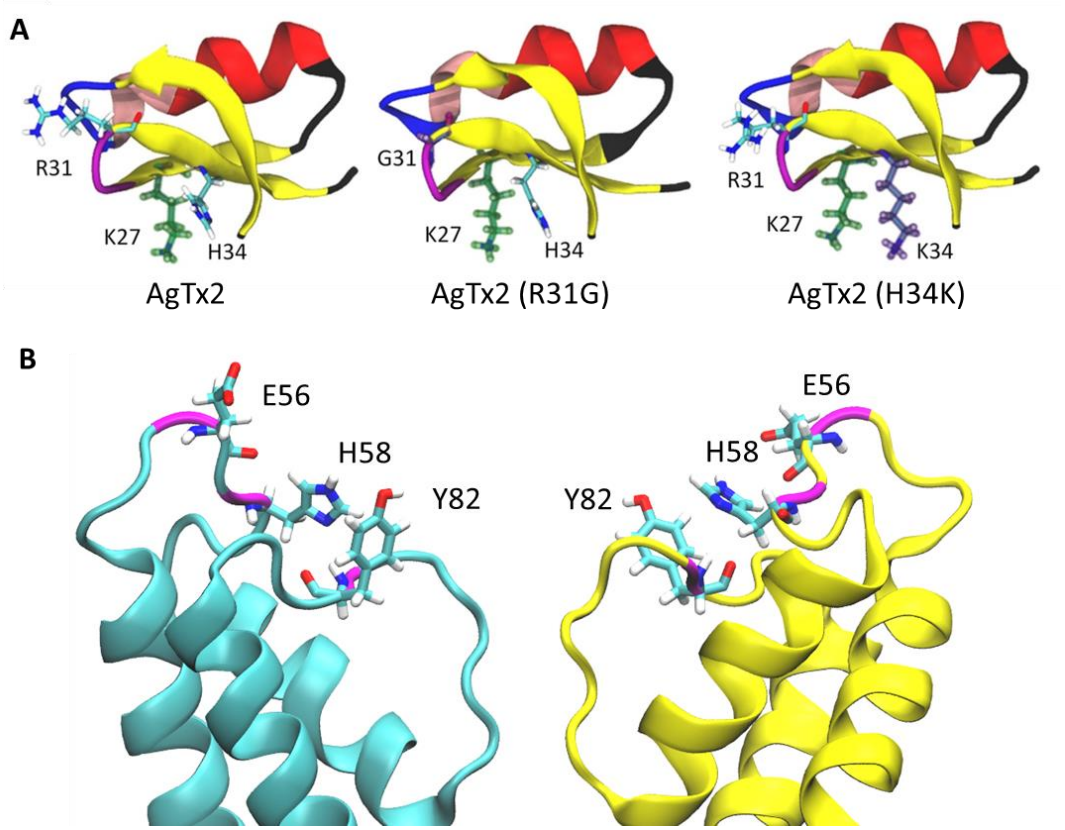

Рис. 8. A – Пространственные структуры токсина AgTx2 дикого типа и мутантных форм. Блокатор поры а. о. K27 (зеленый) и вариабельные а. о. R31 и H34 (пурпурные) показаны с использованием в стержневом представлении. B – Модель порового домена канала K_V1.1, вид сбоку без передней и задней спирали. Пурпурным отмечены вариабельные а.о. E56, H58 и Y82 с использованием стержневого представления.

В рамках работы над диссертацией были предложены две точечные мутации AgTx2(R31G) и AgTx2(H34K) с предполагаемыми противоположными эффектами на аффинность связывания пептида с KcsA-K_V1.1 каналом и созданы модели их комплексов, а также рассчитаны параметры связывания токсинов с каналом KcsA-K_V1.1.

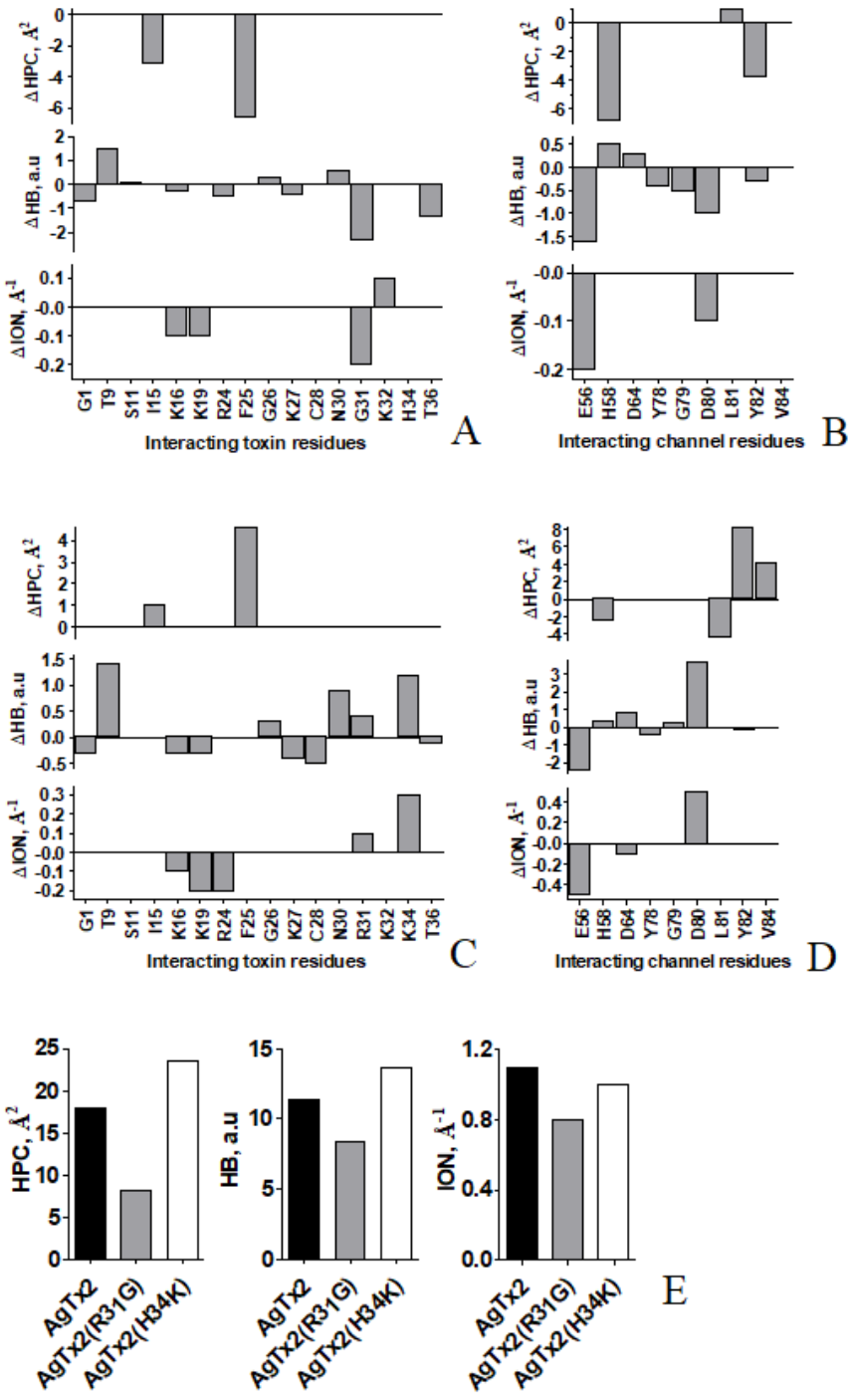

Рис. 9. Изменения в взаимодействиях между аминокислотными остатками сайта связывания Kv1.1 канала и мутантов токсина AgTx2 по сравнению с взаимодействиями в комплексе с диким типом токсина AgTx2. A-D. Изменения в оценках контактов HPC, HB и ION для каждого взаимодействующего токсина (A, C) и канала (B, D), вызванного мутациями R31G (A, B) и H34K (C, D). E. Сравнение сумм гидрофобных контактов (HPC), водородных (HB) и ионных связей (ION) для AgTx2 и его мутантов в комплексе с каналом KcsA-Kv1.1.

Моделирование структур и расчет МД комплекса канала KcsA-K_V1.1 с мутантными формами AgTx2 было выполнено по стандартной методике. Обнаружено, что макроструктура комплексов сохраняется консервативной и стабильной в процессе МД, в то время как анализ межмолекулярных взаимодействий показал значительное изменение репертуара а.о., участвующих в связывании, вследствие изменения ориентации боковых цепей остатков как токсина, так и канала. Отмечено, что при введении мутаций только три а.о. токсинов и канала сохраняют свои исходные связи: K19, K27 и C28 AgTx2(R31G); S11, K27 и C28 AgTx2(H34K); Y78, G79 и L81 канала KcsA-K_V1.1.

Различия в аффинности пептидов к KcsA-K_V1.1 можно объяснить полуколичественно путем сравнения вычисленных сумм оценок гидрофобных контактов, водородных и ионных связей (Рис. 9). Так, сумма соответствующих оценок уменьшились для комплекса канала KcsA-K_V1.1 с AgTx2(R31G) по сравнению с соответствующими суммами оценок для комплекса AgTx2: ослабли ионные взаимодействия остатка 31, гидрофобные контакты а.о. I15 и F25, водородные связи а.о. T9, 31 и T36. Однако в противовес образовались новые связи остатка E56 с а.о. T9, R24 и K32 и усилились взаимодействия а.о. N30, K32-E56 и G26-Y82. В случае анализа влияния мутации H34K на взаимодействия AgTx2 с каналом KcsA-K_V1.1 было обнаружено, что усиливаются гидрофобные контакты а.о. I15 и F25, а также водородные связи а.о. 34, T9 и N30, но ослабляются ионные связи а.о. K16, K19 и R24. В целом, введение мутаций R31G и H34K приводит к ослаблению и усилению взаимодействий с каналом KcsA-K_V1.1, соответственно. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными, полученными в Лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН под руководством А. В. Феофанова.

Общие черты связывания аджитоксина с каналами семейства KcsA-K_V1.X

Структура комплексов каналов KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) с AgTx2 достаточно консервативна. Общая архитектура комплексов включает ассиметричное связывание AgTx2 с внеклеточной стороны поровой спирали калиевого канала. Вторичная структура AgTx2, а также поры, СФ каналов KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) не претерпевает значительных изменений (СКО Cα-атомов = 1 Å), тогда как структура P-петель меняется в большей степени (СКО Cα-атомов = 2,5 Å). Жесткость большинства структурных элементов порового домена KcsA-K_V1.1 канала и структуры AgTx2, связанного в комплексе, является распространенной особенностью комплексов α-KTx

токсинов и K_V1-каналов. Выдвинута гипотеза о роли Р-петель в подстройке канала под структуру токсина для наиболее эффективного взаимодействия.

Поворот AgTx2 в сайте связывания исследуемых каналов вокруг их оси относительно положения харибдотоксина в комплексе с каналом Kv1.2-2.1 воспринимается как характерная черта отдельных комплексов и служит компенсацией описанной конформационной жесткости макромолекул.

Комплексы калиевых каналов семейства K_V1 с AgTx2 стабилизируются за счет совокупности взаимодействий до 10 а.о. каждого канала и до 20 а.о. AgTx2. Все субъединицы каналов в разной степени задействованы в процесс связывания. Наибольшее число взаимодействий наблюдается с субъединицей, контактирующей с α-спиралью и вторым и третьим β-тяжем AgTx2. Многоточечная сеть взаимодействий включает в себя в большей степени водородные и ионные связи, а также гидрофобные контакты и стэкинг-взаимодействия.

Наиболее стабильные контакты AgTx2 с каналами KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) образуются за счет взаимодействия остатков второго β-тяжа токсина: с 24 по 28 остаток. Среди катионных остатков AgTx2, участвующих во взаимодействии с поровым доменом, K27 играет особую роль как остаток, закупоривающий пору. Взаимодействие K27 с порой является идентичным для комплексов AgTx2 с родственными K_V1-каналами. Это экспериментально показано для комплекса с каналом Shaker, K_V1.3, а также *in silico* для K_V1.1, K_V1.3, K_V1.6 канала. Предполагается, что взаимодействие K27 с СФ канала определяет стабильность образуемого комплекса.

Большое число противоположно заряженных а.о. каналов K_V1 и AgTx2 позволяет предложить, что многоточечные электростатические взаимодействия играют важную роль в первичном узнавании и связывании токсина каналом. Ионные взаимодействия рассматриваются как ключевые при образовании и стабилизации комплексов AgTx2 с каналами K_V1.

Остатки поровой спирали (остаток D64), селективного фильтра (остатки Y78, G79) и плато (остатки D80, L/M81) являются инвариантными для родственных каналов KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6). Инвариантные аналоги остатков G79 и D80 взаимодействуют с AgTx2 в канале K_V1.6, тогда как инвариантные аналоги остатков D64, L/M81 и Y78 участвуют в связывании AgTx2 с каналами K_V1.3 и K_V1.6. Значительное число инвариантных остатков, участвующих в связывании AgTx2, по-видимому, является причиной как одинакового высокого сродства, так и низкой селективности взаимодействий AgTx2 с близкородственными K_V1-каналами.

Остатки D56, H58 и Y82 (частично) изменяются в K_V1-каналах и могут рассматриваться как ключевые точки для корректировки селективности

связывания AgTx2 с KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) путем введения соответствующих мутаций в последовательность пептида.

Расчет энергии связывания аджитоксина 2 (дикого типа и мутантных форм) с каналом K_V1.1

В качестве проверки полученных с помощью разработанной методики оценок энергии связывания калиевых каналов с пептидными токсинами, были проведены расчеты ПСС для комплекса канала Kv1.1 с диким и мутантными формами AgTx2 (S7K, T9G, R31G и H34K) путем зонтичного сэмплирования МД (Рис. 10). Введение мутаций S7K, H34K и T9G AgTx2 приводит к уменьшению энергии связывания с каналом KcsA-K_V1.1 на 14,1, 17,6 и 32,9 кДж/моль соответственно, тогда как введение мутации R31G в аминокислотную последовательность AgTx2 увеличивало энергию связи на 2,7 кДж/моль. Полученные результаты хорошо согласуются с экспериментальными значениями констант связывания, увеличивая уровень доверия к сложным моделям и вычислительным методам.

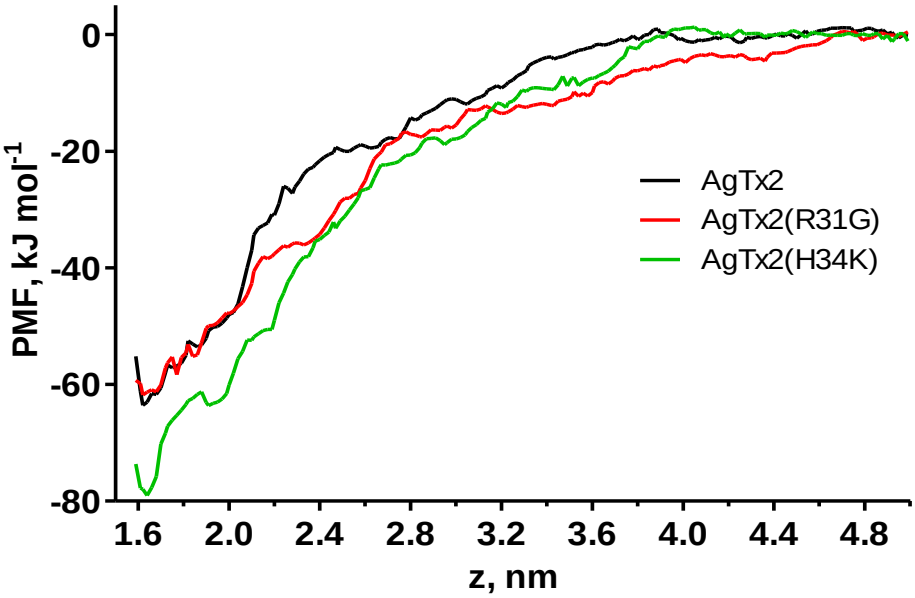

Рис. 10. Сравнение профилей ПСС для оттаскивания нативной и мутированных форм AgTx2 от канала KcsA-K_V1.1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка эффективных способов построения достоверных структур биологических макромолекул и их комплексов с лигандами является необходимым шагом в понимании их функционирования, а также для решения прикладных задач рационального дизайна лекарственных средств.

Предложенный в данной работе алгоритм компьютерного моделирования, включающий моделирование порового домена калиевых каналов с пептидными блокаторами по гомологии, молекулярную динамику, отбор предпочтительной ориентации блокатора в сайте связывания целевого канала и анализ всех образующихся взаимодействий, позволил впервые подробно изучить структурную организацию поровых доменов калиевых каналов K_V1.X (X=1, 3, 6), KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) и их комплексов с токсинами скорпиона.

Анализ общей организации комплексов каналов KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) с пептидными блокаторами выявил высокую консервативность структуры, а также стабильность образующихся комплексов в процессе молекулярной динамики. Показано, что одной из характерных черт структурной организации комплексов является специфический поворот токсина в сайте связывания канала и локальная подстройка P-петель канала.

Детальное изучение полной картины образуемых между молекулами контактов было использовано для обнаружения молекулярных основ аффинности связывания пептидных блокаторов с калиевыми каналами K_V1. Результаты молекулярного моделирования позволяют заключить, что интерфейсы взаимодействия токсинов с каналами формируются сразу многими а.о., создающими сложные системы связей. Эти системы образующихся взаимодействий существенно отличаются не только для пептидов из разных групп и подсемейств, но и для токсинов с высокой гомологией, что, по всей видимости, обуславливает их селективность. Наибольший вклад в образование контактов с каналом был показан для остатков блокаторов, расположенных на плато, которое образовано β-листом, с поровыми остатками каналов. Созданные модели выявляют кластеры взаимодействующих остатков со стороны каналов и токсинов, а также позволяют обнаружить общие принципы связывания блокаторов с CSα/β-структурой с K_V1-каналами.

Полученные оценки аффинности связывания нативной и мутантных форм AgTx2 с гибридными каналами KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6) показали высокую степени корреляции с экспериментальными *in vitro* константами связывания как в случае применения разработанного алгоритма анализа вклада всех образованных контактов, так и с помощью расчета энергии связывания методом потенциала средней силы. В результате детального анализа интерфейса связывания мутантных форм с поровым доменом канала K_V1.1 доказана гипотеза о многоточечном характере взаимодействия и компенсирующем вкладе а. о., соседних к мутационным сайтам, что в свою очередь обосновывает необходимость системного рассмотрения макромолекулярных комплексов.

Результаты проведенных исследований связывания мутантных форм токсинов могут использоваться как для фундаментального изучения структурных основ взаимодействий в комплексах макромолекул, так и для разработки детектирующих систем и высокоэффективных лекарственных средств для терапии аутоиммунных и невропатических заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Архитектура комплексов пептидных блокаторов семейства α-KTx с нативными каналами K_V1.X и гибридными каналами KcsA-K_V1.X (X=1, 3, 6), а также интерфейс взаимодействия в этих комплексах являются попарно консервативными.
2. Взаимодействия блокаторов с калиевыми каналами K_V1 имеют многоточечный характер: в стабилизации комплексов калиевых каналов семейства K_V1.X (X=1, 3, 6) с токсином AgTx2 задействовано до 10 аминокислотных остатков каждого канала и до 20 аминокислотных остатков блокатора.
3. Высокая аффинность и низкая селективность связывания блокаторов семейства α-KTx с каналами K_V1.X (X=1, 3, 6) обусловлена консервативными остатками D411, Y425, G426, D427 и L/M428 со стороны каналов.
4. Мутантные формы блокатора AgTx2 с заменами R31G и H34K демонстрируют разнонаправленное изменение связывания с каналом K_V1.1 по сравнению с природной формой, что подтверждается экспериментальными данными.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Основные публикации Волынцевой Алены Дмитриевны по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.02 - биофизика

1. Volyntseva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V., Nekrasova O.V., Feofanov A.V. Molecular modeling of agitoxin 2 complex with Kv1.1 binding site // *Journal of Bioenergetics and Biomembranes.* – 2018. – Т. 50, № 6. – С. 467-603. **IF 2.236**
2. Nekrasova O., Kudryashova K., Kuzmenkov A., VassIvski A., Korolkova Y., Volyntseva A.**,** Novoseletsky V., Yakimov S., Kirpichnikov M., Feofanov A. Bioengineered analytical system to study potassium channel–

ligand binding // *FEBS Open Bio.* – 2018. – Т. 8 (Suppl. S1). – С. 488. **IF 2.126**

3. Nekrasova O.V., Volyntseva A.D., Kudryashova K.S., Novoseletsky V.N., Lyapina E.A., Illarionova A.V., Yakimov S.A., Korolkova Y.V., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Complexes of Peptide Blockers with Kv1.6 Pore Domain: Molecular Modeling and Studies with KcsA-Kv1.6 Channel // *Journal of NeuroImmune Pharmacology.* – 2017. – Т. 12, № 2. – С. 260-276. **IF 3.988**
4. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Шайтан К.В., Феофанов А.В. Молекулярное моделирование взаимодействий аджитоксина 2 с потенциал-управляемым калиевым каналом Kv1.3 // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. – 2017. – № 1. – С. 29-34. **IF RINC 0.620**
5. Некрасова О.В., Кудряшова К.С., Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Якимов С.А., Кирпичников М.П., Феофанов А.В. Получение рекомбинантных пептидных токсинов из яда скорпионов – молекулярных инструментов и перспективных лекарственных средств // Acta Naturae. – 2017. – № спецвыпуск. – С. 87. **IF 2.554**
6. Volyntceva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V. Molecular studies of scorpion toxin and its mutants interactions with voltage-gated potassium channels // FEBS Journal. – 2016. – Т. 283, № Suppl. 1. – С. 233. **IF 4.432**
7. Новоселецкий В.Н., Волынцева А.Д., Шайтан К.В., Кирпичников М.П., Феофанов А.В. Моделирование структуры комплексов потенциал-управляемых калиевых каналов с пептидными блокаторами: методы и результаты // Acta Naturae. – 2016. – Т. 8, № 2 (29). – С. 39-52. **IF 2.554**

Тезисы докладов по теме диссертации

1. Volyntseva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V., Nekrasova O.V., Feofanov A.V. Molecular modeling of agitoxin 2 complex with Kv1.1 binding site // International Conference "BIOMEMBRANES 2018", Moscow, Russia, 1-5 October.
2. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Якимов С.А., Кирпичников М.П., Некрасова О.В., Кудряшова К.С., Феофанов А.В. Получение рекомбинантных пептидных токсинов из яда скорпионов - молекулярных инструментов и перспективных лекарственных средств // 12th International Scientific Conference on Bioorganic Chemistry devoted to the Memory of Professor Ovchinnikov/Международная научная конференция "XII чтения памяти академика Юрия

Анатольевича Овчинникова" VIII Российский симпозиум "Белки и пептиды", Москва, Россия, 18-22 сентября 2017. – С. 14.

3. Novoseletsky V.N., Karlova M.G., Volyntseva A.D., Shaitan K.V., Sokolova O.S. Electron microscopy and molecular modeling study of a full-length structure of a Kv7.1 potassium channel // Российская международная конференция по криоэлектронной микроскопии RICCEM-2017, Москва, Россия, 6-8 июня 2017. – P. 14
4. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н. Молекулярное моделирование взаимодействий пептидных блокаторов с калиевыми каналами // V International scientific conference of young researchers, Baku, Azerbaijan, 5-6 мая 2017. – С. 22
5. Volyntseva A., Novoseletsky V., Shaitan K., Feofanov A. Molecular modeling of interactions of agitoxin and its mutants with Kv1.6 voltage-gated potassium channel // Fourth biennial German–Russian symposium «Molecular Neurobiology Today and Tomorrow», Moscow, Russia, 5-9 April 2017. – P. 39.
6. Volyntseva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V. Molecular modeling of interactions of inwardly rectifying potassium channel Kir1.1 with tertiapin // IX International Congress Biotechnology: state of the art and perspectives, Moscow, Russia, 21-22 February 2017. – P. 403
7. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Соколова О.С., Шайтан К.В. Моделирование пространственной структуры с-концевого фрагмента калиевого канала Kv10.2 человека // Первый Российский кристаллографический конгресс, Москва, Россия, 21-26 ноября 2016. – С. 37
8. Volyntseva A. Molecular studies of scorpion toxins interactions with calcium-activated potassium channels // 7th International Conference on Bioinformatics, Rome, Италия, 24-25 октября 2016. – P. 26
9. Gluhov G.S., Novoseletsky V.N., Volyntseva A.D., Shaitan K.V., Sokolova O.S. The three-dimensional structure of the human ion channel Kv10.2, microscopy and molecular modeling // Biomembranes 2016, Долгопрудный, Россия, 26-30 сентября 2016. – P. 133.
10. Glukhov G., Novoseletsky V., Volyntseva A., Shaitan K., Sokolova O. Three-dimensional structure of truncated human Kv10.2 ion channel studied by cryoelectron microscopy and molecular modelling // 41st FEBS Congress, Kuşadasi, Turkey, September 3-8 2016. – P. 274
11. Novoseletsky V.N., Volyntseva A.D., Shaitan K.V. Mapping the interaction site for the mesobuthus scorpion toxins in the voltage-gated potassium channel Kv1.2 // Bioinformatics of Genome Regulation and

Structure/BGRS-2016, Новосибирск, Россия, 29 августа - 2 сентября 2016. – P. 41

12. Novoseletsky V.N., Volyntseva A.D., Sokolova O.S., Shaitan K.V. Improved three-dimensional structure of human Kv10.2 ion channel studied by single particle electron microscopy and molecular modelling // Channelopathy-2016, Paris, France, June 12-17 2016. – P. 97.
13. Volyntceva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V. Development of the algorithm for calculating the interactions between scorpion toxins and voltage-gated potassium channels // International school-conference for students and young researchers on structure and functions of ion channels ISonIC2016. May 26-27 2016. — P. 10
14. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Шайтан К.В. Проектирование селективных блокаторов потенциал-зависимых калиевых каналов // VII РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ», Новосибирск, Россия, 12-17 июля 2015. – С. 52
15. Новоселецкий В.Н., Волынцева А.Д. Молекулярное моделирование комплексов калиевых каналов с блокаторами из яда скорпиона // III International scientific conference of young researchers, Baku, Azerbaijan, 17-18 April 2015. – P. 4.
16. Волынцева А.Д., Новоселецкий В.Н., Шайтан К.В. Расчет взаимодействия пептидных блокаторов с потенциал-зависимыми калиевыми каналами // XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015", Москва, Россия, 13-17 апреля 2015. – С. 24
17. Volyntseva A.D., Novoseletsky V.N., Shaitan K.V. Molecular modeling of Potassium channels complexes with several scorpion venom toxins // 22 Международная Конференция "МАТЕМАТИКА. КОМПЬЮТЕР. ОБРАЗОВАНИЕ", Пущино, 26 - 31 января 2015. – С. 26