

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи

Глухов Григорий Сергеевич

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ МУТАНТНЫХ ИОННЫХ
КАНАЛОВ *IN VITRO* И В МОДЕЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ**

Специальность 03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор РАН
доцент Ольга Сергеевна Соколова

Москва 2017

Оглавление

| | |
|---|----|
| Список сокращений | 4 |
| Общая характеристика работы | 6 |
| Глава 1. Обзор литературы..... | 10 |
| Виды K ⁺ каналов | 10 |
| Кальций- активируемые K ⁺ каналы | 11 |
| Каналы - внутренние выпрямители..... | 11 |
| Двупоровые калиевые каналы (K2P)..... | 12 |
| Каналы, зависимые от циклических нуклеотидов..... | 12 |
| Потенциал-зависимые K ⁺ каналы | 13 |
| Строение потенциал-зависимых K ⁺ каналов..... | 14 |
| Общий план строения Kv каналов..... | 14 |
| Цитоплазматические домены..... | 15 |
| Особенности строения потенциал-зависимых K ⁺ каналов семейства EAG..... | 17 |
| Взаимодействия цитоплазматических доменов EAG каналов..... | 21 |
| Кальмодулин и потенциал-зависимые калиевые каналы..... | 28 |
| Функции цитоплазматических доменов каналов семейства EAG..... | 30 |
| Механизмы функционирования калиевых каналов..... | 31 |
| Экспериментальные данные для построения моделей активации Kv каналов..... | 33 |
| Современные модели активации Kv каналов семейства <i>Shaker</i> | 35 |
| Электромеханическая связь между поровым и VSD доменами..... | 37 |
| Модели регуляции ворот канала семейства Eag..... | 40 |
| Мембранный транспорт потенциал-зависимых каналов..... | 44 |
| Кластеризация ионных каналов..... | 45 |
| Распределение каналов eag в организме..... | 48 |
| Участие канала Kv10.2 в клеточной пролиферации и возникновении рака..... | 49 |
| Грамицидин А – модельный объект для изучения катионных ионных каналов..... | 50 |
| Глава 2. Материалы и методы..... | 55 |
| Электрофорез в ПААГ | 55 |
| Вестерн-блоттинг..... | 55 |
| Молекулярное клонирование | 57 |
| Экстракция ПЦР-фрагмента из геля..... | 58 |
| Рестрикция ПЦР-фрагмента | 58 |
| Лигирование, создание векторов | 59 |
| Химическая трансформация клеток, наработка и выделение плазмиды..... | 59 |
| Культивирование эукариотических клеток cos-1 | 60 |
| Временная трансфекция эукариотических клеточных линий с помощью электропорации..... | 61 |

| | |
|--|-----|
| Временная трансфекция эукариотических клеточных линий для микроскопических исследований. | 62 |
| Окраска клеток для конфокальной микроскопии. | 63 |
| Конфокальная микроскопия. | 64 |
| Электрофизиологические исследования. | 64 |
| Очистка рекомбинантного белка Kv10.2 ΔPAS..... | 65 |
| Приготовление образцов для электронной микроскопии. | 67 |
| Электронная микроскопия. | 67 |
| Криоэлектронная микроскопия липосом. | 69 |
| Глава 3. Результаты и обсуждение | 70 |
| Кластеризация мутантного грамицидина в модельных липосомах. | 70 |
| Клонирование ДНК каналов Kv10.2 с удаленными N-концевыми доменами. | 75 |
| Влияние N-концевого домена на электрофизиологические характеристики и транспорта каналов Kv10.2 к поверхности клетки. | 76 |
| Участие N-концевого домена канала Kv10.2 во взаимодействии с цитоскелетом. | 81 |
| Кластеризация мутантных каналов..... | 85 |
| Структура канала Kv10.2 с удаленным доменом PAS..... | 86 |
| Влияние S4-S5 линкера в составе канала на его функциональное состояние. | 90 |
| Модель активации канала Kv10.2. | 95 |
| Структурная модель межбелковых взаимодействий при активации канала. | 96 |
| Заключение. | 98 |
| Выводы | 99 |
| Список публикаций по теме диссертации. | 99 |
| Список литературы | 102 |

Список сокращений

ВК - ворота канала

МД - молекулярная динамика

ММа - механистическая модель активации

ММ - молекулярное моделирование

МРА — мультиреференсный анализ

МСА — многомерный статистический анализ

ПААГ – полиакриламидный гель

ПД – потенциал действия

ПЗС - прибор с зарядовой связью

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

T1 – тетрамеризационный домен

ТМ – мембранный домен

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

ЦПЗ - центр переноса зарядов

BSA – бычий сывороточный альбумин

CaM - кальмодулин

CF - карбоксифлуоресцеин

CNBD – домены, связывающие циклические нуклеотиды (cyclic nucleotide-binding domain)

CNG – cyclic nucleotide-gated cation channel

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

dNTP - динуклеатиды

DTT – дитиотреитол

NRPS - не рибосомный мультиферментный комплекс (Non-Ribosomal Peptide Synthesis)

Eag – семейство потенциал-зависимых калиевых каналов *Ether-a-go-go*

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

EggPC - фосфотидилхолин яичного желтка

EK – равновесный потенциал ионов K⁺

Elk - семейство потенциал-зависимых калиевых каналов *Eag-like Gene*

EM – мембранный потенциал

Erg - семейство потенциал-зависимых калиевых каналов *Ether-à-go-go Related Gene*

FRET – ферстеровский резонансный перенос энергии (Förster resonance energy transfer)

GFP - зеленый флуоресцентный белок

GKIR – каналы, регулируемые G-белком

Нах-1 - антиапоптотический белок

КАТР – АТФ-зависимые калиевые каналы

KCNH5 – ген, кодирующий каналы Kv10.2

Kir – калиевые каналы - внутренние выпрямители

Kv – потенциал-зависимые калиевые каналы

Kv10.2 ΔPAS – потенциал-зависимый калиевый канал Kv10.2 с удаленным PAS-доменом

LQTS или LQT - синдром удлиненного интервала QT (long QT syndrome)

MBP - основной белок миелина

MlotiK1 – цАМФ-регулируемый калиевый канал из *Mesorhizobium loti*

PAS – Per-ARNT-Sim домен

PBC – фосфат-связывающая кассета

PBS – натрий-фосфатный буфер

PDB – банк данных 3D структур белков и нуклеиновых кислот (Protein Data Bank)

Rac - малая ГТФаза

SRB - сульфородамин В

tbHO2 - трет-бутил гидропероксид

Tris – 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол

VSD – домен, чувствительный к потенциалу (voltage sensing domain)

Общая характеристика работы

Актуальность работы

С момента обнаружения первого гена ионного канала открыто более 200 генов, которые кодируют различные виды калиевых каналов. Калиевые каналы – мультимеры α -субъединиц, которые образуют ионную пору. У млекопитающих насчитывается более 70 различных α -субъединиц, образующих большое семейство ионных каналов [1,2]. Мутации каналов приводят к наследуемым генетическим заболеваниям, получившим в современной литературе название «каналопатии».

Семейство *ether-à-go-go* (KCNH) включает три подсемейства: Eag (Kv10), Erg (Kv11) и Elk (Kv12). Канал Kv10.2 из них является наименее изученным. Канал Kv10.2 в основном экспрессируется в ЦНС, но также обнаружен в скелетных мышцах, печени, почках, легких, сердце и поджелудочной железе, особенно в момент дифференцировки тканей [2–6]. Увеличение синтеза белка канала наблюдается при медуллобластоме, одном из распространенных онкологических заболеваний головного мозга [6].

Механизм активации каналов – тема продолжающихся дебатов. Для полного понимания вопроса необходимы знания об атомной структуре канала в разных функциональных состояниях, как минимум, в двух конечных конформациях – открытой и закрытой. Большинство кристаллических структур Kv каналов были получены для каналов семейства *Shaker* (Kv1-3) [7,8]. Исходя из этих структур были предложены механистические модели активации потенциал-зависимых калиевых каналов [7–9]. Последние исследования каналов семейства EAG показали, что подходы, использованные в модели, основанной на структуре каналов семейства *Shaker*, не совсем подходят для описания работы семейства каналов EAG [10–13].

Существенную регуляторную роль в функционировании ионных каналов играют цитоплазматические домены [14,15]. Они взаимодействуют

друг с другом и способствуют формированию функционального канала [14,16], а так же взаимодействуют с различными белками в цитоплазме клетки [17–22]. Роль цитоплазматических N-концевых доменов в структуре и функционировании канала Kv10.2 до сегодняшнего дня оставалась неизвестной. Для изучения межбелковых взаимодействий в ионных каналах можно использовать модельные объекты с более простой и хорошо исследованной структурой. Одним из таких объектов является грамицидин А [23].

Цели и задачи

Целью данного исследования было изучение влияния мутаций на структуру, межбелковые взаимодействия и кластеризацию катионных каналов *in vitro*. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучение кластеризации мутантного грамицидина в модельных липосомах с помощью криоэлектронной микроскопии;
2. Расчет трёхмерной реконструкции канала Kv10.2 с удаленным N-концевым доменом с помощью электронной микроскопии макромолекул;
3. Изучение влияния N-концевого домена на функциональное состояние канала Kv10.2 и транспорт его к мембране;
4. Изучение взаимодействия каналов Kv10.2 с цитоскелетом и его кластеризации в клеточной мембране.

Научная новизна и практическая значимость работы

В данной диссертационной работе с помощью метода просвечивающей электронной крио-микроскопии была впервые показана олигомеризация мутантного грамицидина в липосомах с образованием пентамера с порой в центре, способной пропускать высокомолекулярные соединения и получена трехмерная реконструкция олигомера мутантного грамицидина. Впервые в гетерологичной системе экспрессированы калиевые каналы человека Kv10.2

с удаленными N-концевыми доменами в положениях: Δ2-24, Δ2-134 Δ24-134. Изучено распределение мутантных каналов в клетках COS1 и их солокализация с актиновым цитоскелетом. Исследованы их электрофизиологические свойства. Получена впервые структура канала Kv10.2Δ24-134 с использованием метода электронной микроскопии макромолекул. Предложена модель активации каналов Kv10.2.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке новых методов направленного мутагенеза с целью регуляции активации ионных каналов, а также в учебном процессе при модификации существующих и разработке новых образовательных курсов для студентов высших учебных заведений.

Личный вклад автора

Основная работа (получение изображений методом просвечивающей электронной микроскопии, построение трёхмерных реконструкций молекул, молекулярное клонирование, очистка и экспрессия белка, оптическая и конфокальная микроскопия), обработка полученных данных и подготовка результатов к печати выполнены автором самостоятельно.

Планирование исследований, обсуждение и обобщение полученных результатов, формулирование выводов и написание статей осуществлялись совместно с руководителем, д.б.н., профессором РАН, доцентом Соколовой О.С.

Положения, выносимые на защиту:

1. При замене аланина в третьем положении на лизин [Lys3]gA образует в модельных мембранах кластеры диаметром 40Å, имеющие пятилучевую симметрию и состоящие из 10 пептидов. Кластеры имеют посередине пору с диаметром ~16Å, достаточную для выхода из липосом высокомолекулярных красителей;

2. Мутации в N-концевом домене ($\Delta 2-24$, $\Delta 2-134$ $\Delta 24-134$) канала Kv10.2 приводят к формированию неактивной формы тетрамерного канала. Отсутствие N-концевого домена приводит к нарушению транспорта к мембране и к аномальной кластеризации канала в клетках. N-концевой домен канала отвечает за взаимодействие с актином;
3. Канал Kv10.2 активируется в соответствии с лиганд-рецепторным механизмом.

Апробация работы

Результаты проведенных исследований были представлены в виде стендовых докладов на российских и международных конференциях и школах: V Съезде биофизиков России, Первом Российском кристаллографическом конгрессе, 38 конгрессе FEBS, Российской международной конференции по криоэлектронной микроскопии RICSEM-2017, международной школе для студентов и молодых ученых по структуре и функциям ионных каналов (ISonIC-2016), а также устных докладов на семинарах группы структурной биотехнологии каф. Биоинженерии Биологического факультета МГУ.

Публикации

По материалам работы опубликовано 4 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, и 10 тезисов в сборниках научных конференций.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 120 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 195 наименований. Работа содержит 45 рисунков и 1 таблицу.

Глава 1. Обзор литературы

Виды K⁺ каналов

Калиевые каналы - мультимеры α -субъединиц, которые образуют ионную пору [2]. У млекопитающих насчитывается более 70 различных α -субъединиц, образующих большое семейство ионных каналов (рис. 1). С момента обнаружения первого гена калиевого канала открыто более 200 генов, которые кодируют различные виды калиевых каналов [1].

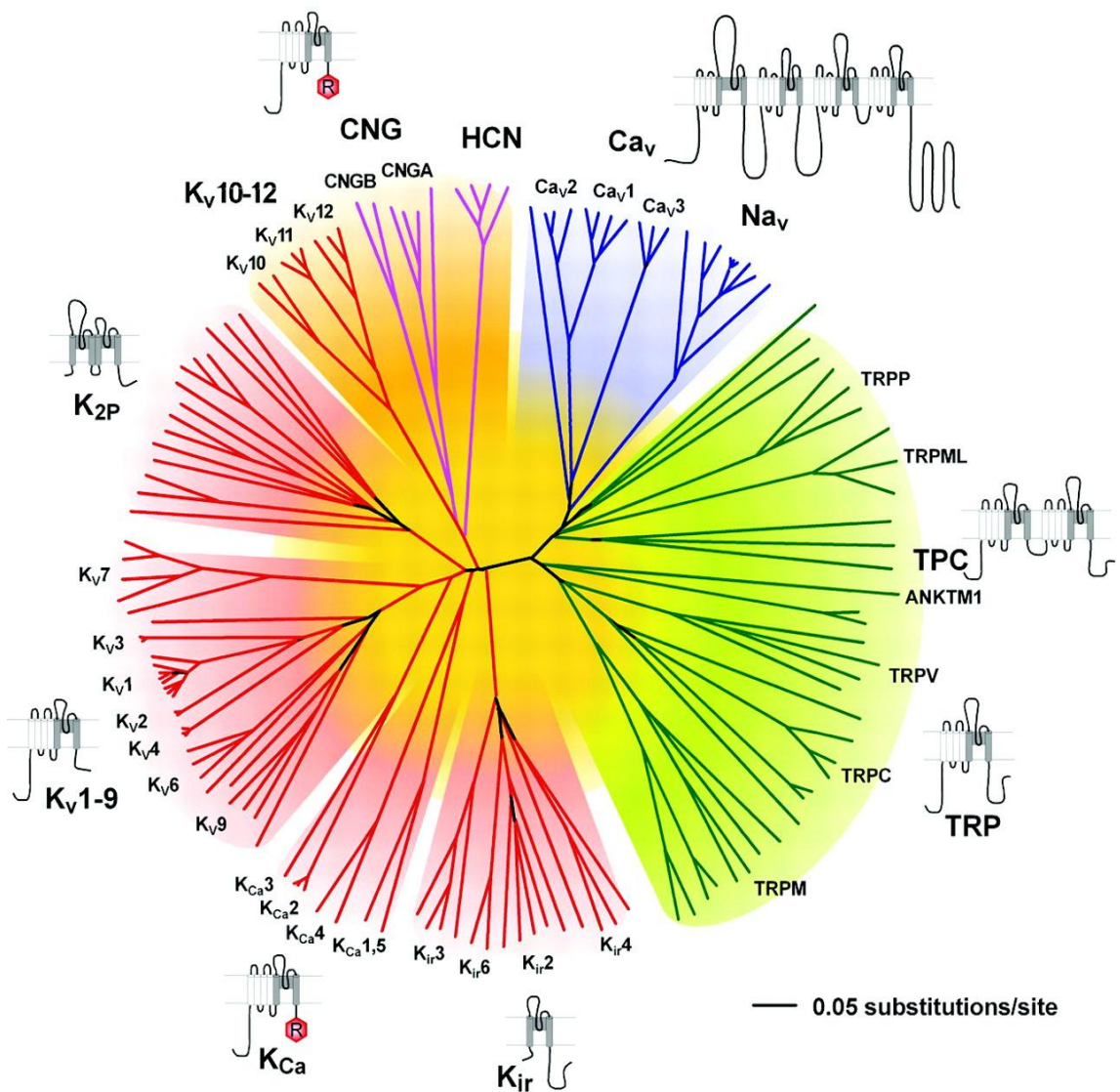


Рисунок 1. Филогенетическое дерево α -субъединиц калиевых каналов [24].

Калиевые каналы можно распределить на три структурных класса, основанных на топологии их мембранных доменов. Они включают

потенциал-зависимые K^+ каналы, состоящие из 6 трансмембранных сегментов, которые образуют одну пору, каналы - внутренние выпрямители, α -субъединица которых содержит только два трансмембранных сегмента, окружающих одну пору, а также двупоровые K^+ каналы с четырьмя трансмембранными сегментами и двумя порообразующими доменами.

Самую большую группу составляют каналы, включающие 6 трансмембранных сегментов, составляющих одну пору [25]. Такие каналы функциональны в виде тетрамера и могут состоять из одинаковых (гомомультимер) или разных (гетеромультимер) субъединиц. Эти каналы включают в себя следующие семейства: потенциал-зависимые каналы, кальций-активируемые каналы, каналы зависящие от циклических нуклеотидов.

Кальций- активируемые K^+ каналы

Функционирование кальций-активируемых каналов сильно зависит от внутриклеточной концентрации ионов кальция. Сейчас известно три подсемейства кальций-активируемых K^+ каналов. Их поделили на группы, исходя из их биофизических свойств: каналы с большой (BK), средней (IK) и малой (SK) проводимостью калия.

Каналы - внутренние выпрямители

Данный структурный класс включает калиевые каналы с двумя трансмембранными сегментами и одной порой. Четыре α -субъединицы необходимы для формирования функционального канала. К этому структурному классу относят каналы - внутренние выпрямители (K_{ir}), АТФ-зависимые каналы (КАТР) и K^+ каналы, регулируемые G-белком (GKIR) [26].

K^+ каналы - внутренние выпрямители (K_{ir}) - первоначально были обнаружены в скелетных мышцах [27]. В противоположность внешним выпрямителям в соответствии с нернстовским потенциалом они показывали большие токи внутрь клетки, нежели из нее. K_{ir} каналы обнаружены в

аксонах гигантского кальмара [28]. Их взаимодействие с мембранным потенциалом не подчиняется кинетике Ходжкина-Хаксли, вместо этого их поведение сильно зависит от электрохимического градиента K^+ (мембранный потенциал (EM) минус равновесный потенциал для K^+ (EK)). Подобные характеристики токов каналов Kir не являются исключением из правил, а являются результатом ассиметричного открывания поры. По этой причине в физиологических условиях Kir-каналы генерируют значительные калиевые токи при отрицательных значениях потенциала EK, и небольшие токи при положительных значениях потенциала EK [29,30].

Двупоровые калиевые каналы (K2P)

К этому структурному классу относятся калиевые каналы с 4 трансмембранными сегментами и двумя поровыми доменами; каналы активны в виде димера и образуют две поры. Эти каналы обнаружены в самых разнообразных тканях. Они встречаются как в возбудимых, так и в невозбудимых клетках. K2P каналы продуцируют токи с отличными от других K^+ каналов характеристиками. Эти каналы не чувствительны к классическим калиевым блокаторам, они квазимгновенны и проводят ток на всех значениях потенциала мембраны.

Двупоровые калиевые каналы можно отнести к четырем разным подсемействам: TWIK-1 и TWIK-2; TREK-1, TRAAK; TASK-1 и TASK-2. TWIK-1 и TWIK-2, стимулируются протеинкиназой C. Каналы TASK-1 и TASK-2 чувствительны к внешним изменениям pH в узком интервале, близком к физиологическому [31].

Каналы, зависимые от циклических нуклеотидов.

К данному типу относятся два вида каналов: CNG (Cyclic Nucleotide-Gated) – каналы, активируемые циклическими нуклеотидами, и HCN (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated) - каналы, активируемые гиперполяризацией и циклическими нуклеотидами. Общим для данных

каналов является строение трансмембранной части: α -субъединица включает 6 трансмембранных сегментов, тетрамер которых образует пору. Особенностью этой группы является наличие CNBD-домена (домена, связывающего циклические нуклеотиды) на внутриклеточном С-конце аминокислотной последовательности канала. С функциональной точки зрения каналы данной группы являются неселективными проводниками катионов, и, в зависимости от типа, проводят ионы K^+ , Na^+ , Ca^{2+} . Они широко экспрессируются во всех тканях организма. Каналы HCN участвуют в контроле сердечных и нервных ритмов. Каналы CNG участвуют в фоторецепторных функциях, сперматогенезе, выведению ионов в почках и секреции гормонов [32–34].

Потенциал-зависимые K^+ каналы

Потенциал-зависимые K^+ каналы (K_v) чувствительны к ионам K^+ и к изменению мембранного потенциала. Они необходимы для возвращения деполяризованной мембраны в состояние покоя. На основе гомологии трансмембранной части α -субъединицы эти каналы разделили на 12 классов K_v1 - K_v12 [24,35].

Строение потенциал-зависимых K^+ каналов

Общий план строения K_v каналов.

Потенциал-зависимые K_v каналы имеют в своем составе 4 α -субъединицы, каждая из которых состоит из шести трансмембранных сегментов (S1-S6), в их числе поровый домен, включающий сегменты S5 и S6 и селективный фильтр. N- и C-концевые домены располагаются в цитоплазме [8] (рис. 2).

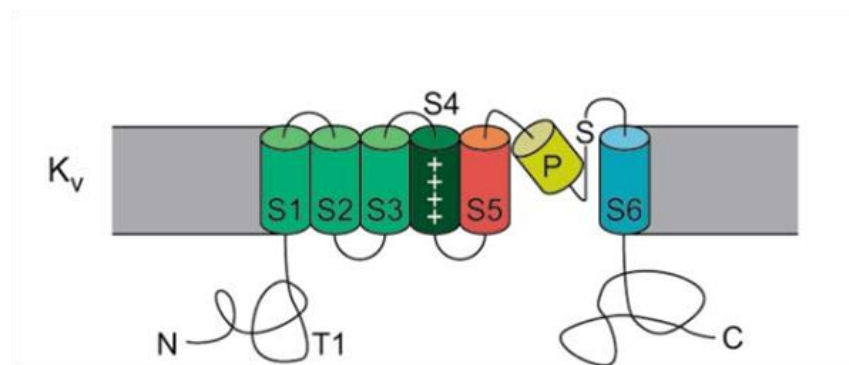


Рисунок 2. Строение Каналов K_v с 6 трансмембранными субъединицами (S1-S6).

В каналах K_v S1-S4 сегменты контролируют открывание/закрывание поры. Сегменты S1-S3 экспонированы в липидный слой. Сегмент S4 функционирует как потенциал-чувствительный элемент. Расположение заряженных остатков в сегментах S2-S4 консервативно у разных ионных каналов. В составе сегмента S4 лизин и аргинин расположены в каждой третьей или четвертой позиции; подобные заряженные участки составляют четверть данного трансмембранного сегмента. Изменение мембранного потенциала вызывает движение S4 сегмента, что в свою очередь приводит к изменению конформации поры и открыванию канала [36]. Генетические исследования показали высокую степень гомологии между K^+ потенциал-зависимыми каналами K_v1 мозга крысы и каналами *Shaker* у *Drosophila melanogaster*. Последовательность белка K_v1 крысы на 68% идентична последовательности белка *Shaker*. Стоит отметить, что для различных

сегментов степень гомологии варьируется. 132 аминокислотных остатка в S1 идентичны на 85%, а 133 аминокислотных остатка, входящих в домен S4 идентичны на 90% [37].

Водная пора канала имеет ассиметричное строение. Самый узкий участок поры, селективный фильтр, имеет диаметр 3 Å и находится ближе к внешней части поры; далее пора расширяется до 10-15 Å. Стенки поры не заряжены, но гидрофильны. Селективный фильтр K⁺ канала в своей последовательности содержит 5 аминокислот, образующих крайне консервативный мотив [ST][IV]G[FY]G [9] Существует несколько моделей механизма прохождения иона K⁺ через селективный фильтр (рис. 3). Одна из них, предложенная Ходжкиным в 1952 г. - так называемый «knock on» механизм, при котором в селективном фильтре сразу располагается несколько дегидратированных ионов K⁺ и за счет комбинации сил притяжения ионов к каналу и ион-ионного отталкивания происходит проход K⁺ через пространство селективного фильтра [38].

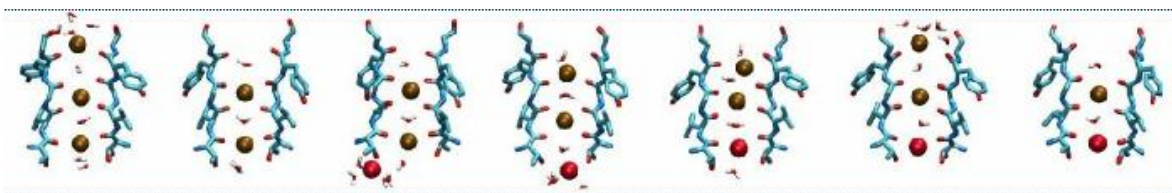


Рисунок 3. Компьютерное моделирование показало, что во время прохождения через канал, с селективным фильтром одновременно связано 2-3 иона K⁺[39].

Цитоплазматические домены

Существенные различия наблюдаются в цитоплазматических доменах. Они обеспечивают многообразие функций различных семейств потенциал-зависимых калиевых каналов [40].

Существует два основных способа сборки цитоплазматических доменов в каналах Kv (рис. 4). Один паттерн характерен для каналов Kv1-Kv4. N-концевые домены четырех субъединиц канала объединяются в T1 (тетрамеризующий) домен, находящийся в цитоплазме и функционально

ответственный за тетрамеризацию [7,41,42], при этом С-концевые участки расположены на периферии [43].

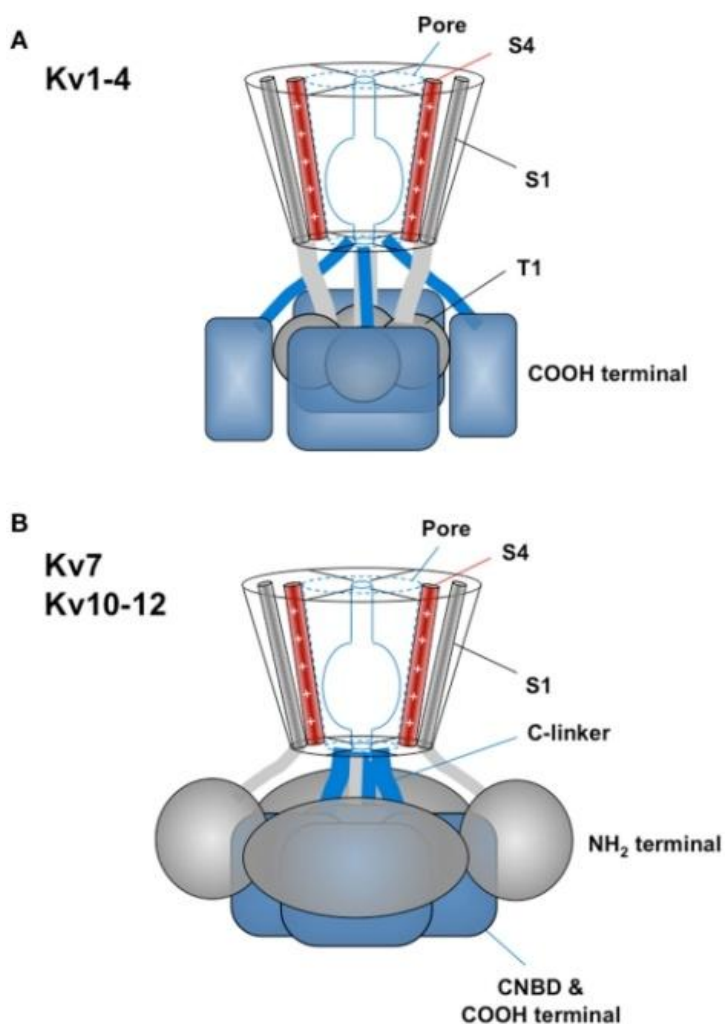


Рисунок 4. Основные паттерны укладки цитоплазматических доменов каналов семейства Kv: (A) Организация каналов Kv1–Kv4 с T1-доменом в центре. (B) Организация каналов Kv7 и Kv10–Kv12 с С-концевым доменом в центре. Детали в тексте [40].

Другой паттерн обнаружен у каналов Kv7 и Kv10, Kv11, Kv12; он характеризуется отсутствием N-концевого T1-домена и присутствием С-концевого тетрамеризационного CAD-домена, также расположенного на оси симметрии канала, под трансмембранным доменом. Ко второму типу организации относятся также родственные Kv семейства калиевых каналов HCN и CNG [24,35].

Особенности строения потенциал-зависимых K⁺ каналов семейства EAG.

Ген KCNH, кодирующий потенциал-зависимый калиевый канал *ether à go-go* (EAG), впервые открыт в *Drosophila* [44] во время анализа мутационных изменений мембранной возбудимости. Последующие молекулярные исследования и сравнения последовательностей различных форм каналов позволили выделить отдельное семейство EAG. Семейство EAG содержит 3 подсемейства: Eag, EAG-Related Gene (Erg) и EAG-Like K⁺ (Elk). У млекопитающих подсемейство Eag включает две группы каналов: Eag1 (KCNH1, KV10.1 [45,46]) и Eag2 (KCNH5, KV10.2 [3,5]). Порообразующая α -субъединица KCNH1-канала аналогична по своему строению другим потенциал-зависимым каналам; она функционирует в виде тетрамера, в котором каждый мономер имеет в составе шесть трансмембранных субъединиц (S1–S6), где S1-S4 является потенциал-чувствительным доменом. Но, в отличие от других каналов, каналы Eag содержат обширные цитоплазматические домены на C- и N- концах. На N-конце расположен Per-ARNT-Sim (PAS) домен [17] и кальмодулин-связывающий мотив [47]. C-концевой участок содержит домен, связывающий циклические нуклеотиды (cNBD) и два дополнительных кальмодулин-связывающих мотива [48] (рис. 6).

В настоящий момент кристаллические структуры с высоким разрешением расшифрованы для PAS-домена канала Erg [17] и для CNBD-домена канала Elk [49]. Кристаллическая структура домена CNBD канала hEag2 до сих пор не получена, однако, недавно была опубликована крио-структура канала hEag1 (Kv10.1) [54], которая свидетельствует, что CNBD-домен расположен под трансмембранной частью и окружен N-концевым участком [22]. Интересно заметить, что большинство представителей семейства EAG не зависят от концентрации цАМФ. CNG каналы имеют низкую чувствительность к потенциалу, а каналы Eag обладают сильной чувствительностью к изменению потенциала, они высокоизбирательны к

ионам натрия и калия, в отличие от каналов CNG. Возможно, семейство eag является переходной формой от каналов CNG к семейству *Shaker* [35].

В работе Соколовой с соавторами в 2012 [50] была получена трехмерная структура калиевого канала hEag2 (Kv10.2) при помощи электронной микроскопии макромолекул и последующей реконструкции с разрешением 2,5 нм. Цитоплазматические домены канала Kv10.2 образуют структуру, построенную по типу “висячей гондолы” [51], соединенную с трансмембранной частью канала линкерами. Длина линкеров дает возможность контактировать С-концевому CNBD-домену и N-концевому PAS доменам и образует «окна» для прохождения инактивационного пептида (рис. 5) [50].

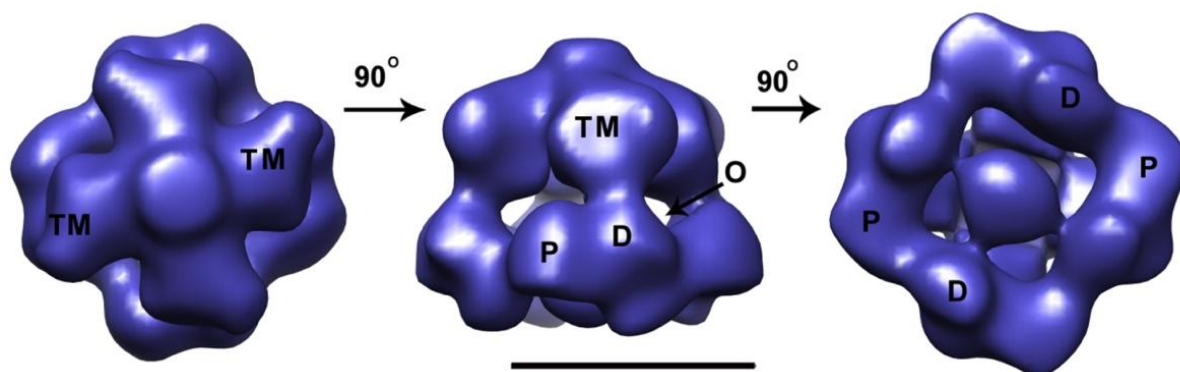


Рисунок 5. Трехмерная реконструкция канала Kv10.2. Слева направо: вид сверху, боковой вид и вид снизу. Масштабный отрезок равен 10 нм. ТМ – мембранный домен; P и D – цитоплазматические домены; O – “окно” [50]

За последнее время при помощи криоэлектронной микроскопии было получено несколько трехмерных структур потенциал-зависимых каналов, в том числе и представителей семейства EAG [10,52,53]. Для канала Kv10.1 (Eag1) получена трехмерная структура транкированной формы с удаленными 114 аминокислотными остатками на С-конце (773–886) (рис. 6). Транкированные каналы сохраняют активность, хотя и имеют несколько измененные значения потенциала активации. Разрешение полученной структуры составило 3,78 Å. Структура показала, что каналы семейства EAG имеют ряд отличий от каналов семейства *Shaker*. Одной из интересных особенностей каналов Kv10.1 является наличие "башенки" на внеклеточной части трансмембранного домена, образованной остатками 391–399,

формирующими α - спираль во внеклеточном линкере между спиралью S5 и порой; спираль расположена параллельно мембране и взаимодействует как с порой, так и с внеклеточным линкером между поровым доменом и S6. Данная спираль имеет два сайта гликозилирования: N388 и N406 и, по всей видимости, подобная структурная особенность препятствует взаимодействию порового домена с токсинами, которые до сих пор не обнаружены для каналов Kv10 [54].

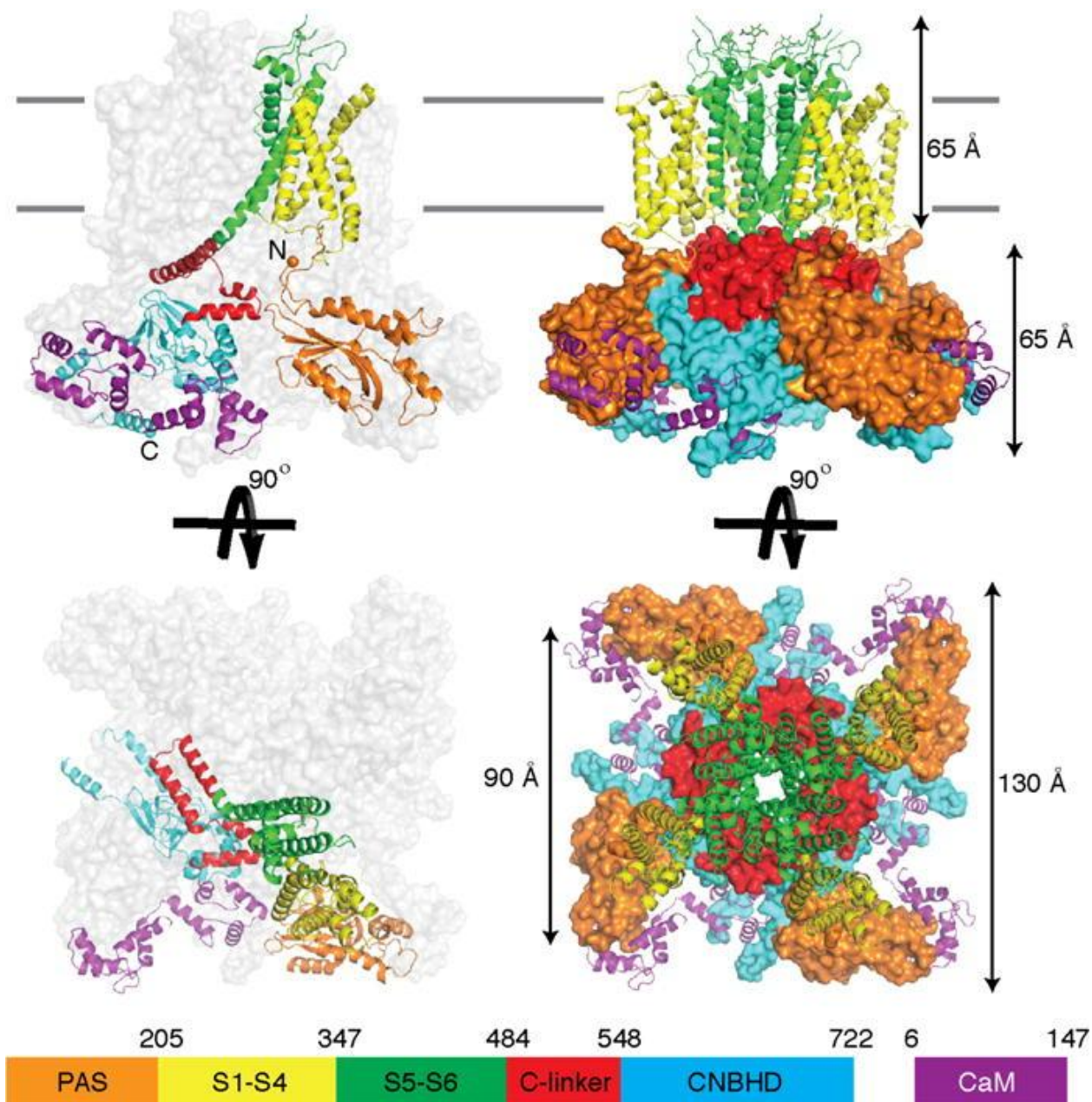


Рисунок 6 Модель канала rEag1 Δ , связанного с кальмодулином (CaM). Цвета каждого домена отражены на диаграмме снизу [54].

Внутриклеточный домен погружен в цитоплазму на 65 Å. PAS домен, как уже было показано ранее, расположен на периферии внутриклеточного домена [50]. Цитоплазматический С-линкер, расположенный на С-конце, сразу после S6, как и в каналах HCN, имеет в составе четыре альфа-спирали, где первые две образуют мотив "спираль-поворот-спираль", который взаимодействует с двумя другими спиральями соседнего домена [52,54]. С-линкер образует кольцо, расположенное между трансмембранным доменом, формирующим пору, и CNBD-доменом. CNBD-домен, как было показано ранее при исследовании кристаллических структур CNBD- и EAG-домена каналов Kv10.1, взаимодействует с PAS-доменом в месте, предназначенном для связывания циклических нуклеотидов [15].

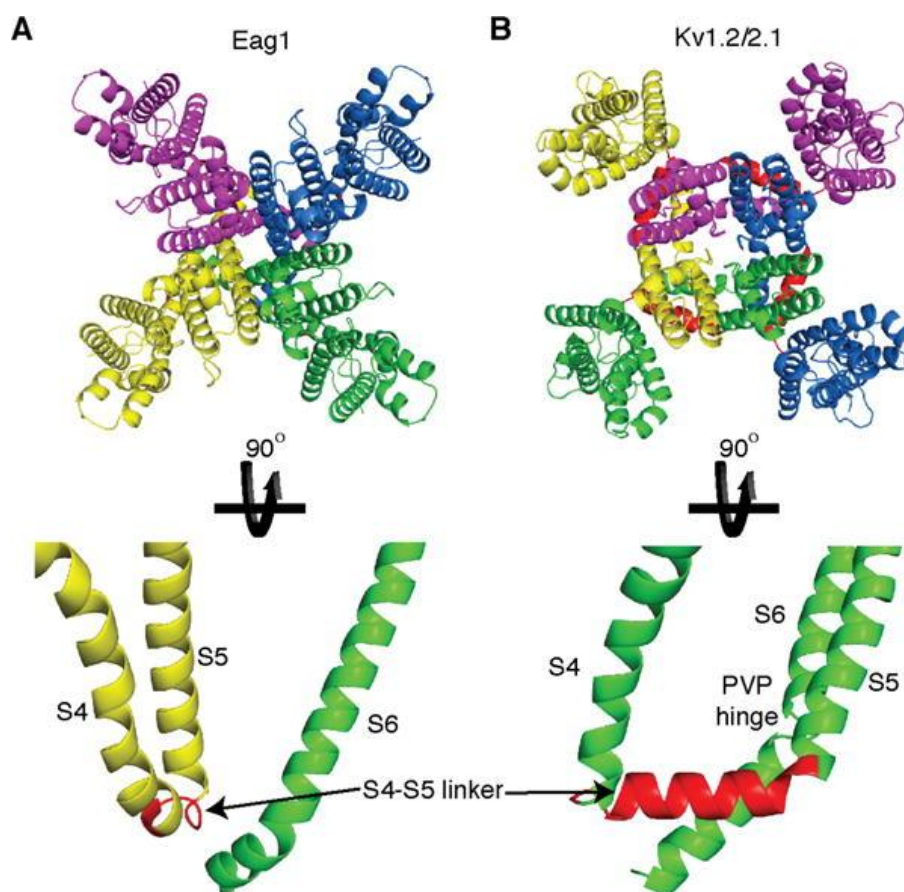


Рисунок 7. Доменная перестановка. А – каналы семейства EAG; В – Каналы семейства *Shaker*. Внизу: строение S4-S5 линкеров. Разными цветами отмечены отдельные α – субъединицы канала [54].

Существенным отличием в структуре каналов EAG от каналов семейства *Shaker* является также короткий S4-S5 линкер. У каналов EAG он составляет 5 аминокислот, тогда как у каналов Kv1.2 его длина 15 аминокислот. Для структуры канала Kv1.2–2.1 характерна так называемая «доменная перестановка» (доменный обмен). При подобной организации трансмембранной части канала происходит соприкосновение сенсора потенциала (S1-S4) от одной α -субъединицы с поровой областью (спирали S6-S5) другой субъединицы (рис. 7). S4-S5 линкеры огибают сегмент S6 и формируют кольцо. Подобная организация трансмембранных спиралей возможна из-за длинного S4-S5 линкера. Формирование такого кольца невозможно для каналов EAG, так как длина линкера не позволяет организовать доменную перестановку. У каналов EAG спираль S5 взаимодействует непосредственно со своим же потенциал-чувствительным доменом, а линкер S4-S5 находится над S6 терминальной областью соседней субъединицы [54].

Взаимодействия цитоплазматических доменов EAG каналов и их функции.

N-концевой регион у семейства каналов EAG включает три структурных участка: CAP-домен, PAS-домен и N-линкер, который связывает PAS домен и трансмембранный S1-сегмент [17,18]. CAP- и PAS-домены образуют так называемый EAG-домен. Каналы Eag и Erg существенно различаются последовательностью N-линкера, причем у канала Erg линкер на 190 аминокислот длиннее [55,56]. EAG-домен участвует в регуляции инактивационной кинетики за счет как межсубъединичных взаимодействий между N- и C- концевыми доменами, так и взаимодействия с трансмембранными доменами [57]. При удалении N-концевого домена крысиного канала Eag1 наблюдалось сохранение функции проведения ионов калия, но при удалении части аминокислот, Δ 2-190, Δ 2-12 и Δ 7-12 кинетика

активации канала замедлялась, а при удалении $\Delta 150-162$ - наоборот ускорялась. Подобное действие этих мутаций можно объяснить взаимодействием N-концевого участка канала со спиралью S4 [58].

Полное удаление N-концевого участка канала eag1 сохраняет его функции. При удалении N-концевого фрагмента канала Kv10.1 (hEAG1 $\Delta 2-190$) происходит сильное изменение вольтамперных характеристик канала. Характерным изменением является снижение порога активации на -75 мВ и медленная деактивация канала. Данный факт свидетельствует об участии N-концевого домена в стабилизации канала в закрытом состоянии. N-концевой домен взаимодействует с линкером S4-S5, стабилизируя канал в закрытом состоянии [47].

У подсемейства Kv10 на C-конце расположен небольшой домен CAD, CNBD домен и C-линкер, который связывает цитоплазматический домен с S6. CAD домен состоит из 41 аминокислот. Похожий тетрамеризационный домен (TCC) расположен на C-конце у каналов Kv11. По своему строению CNBD домен гомологичен подобным доменам в других белках. Исследования отдельного CNBD-домена (связывающий циклические нуклеотиды домен) из mEAG [59] и zELK [49] обнаружили короткую петлю (697-701), следующую за α C-спиралью, которая в каналах семейства EAG заменяет циклический нуклеотид в месте связывания с циклическим нуклеотидом в обычном CNBD-домене. Данная спираль получила название «внутренний мотив». C-линкер состоит из четырех α -спиралей, которые попарно образуют контакт с C-линкерами соседних субъединиц канала.

Экспериментальная замена домена TCC канала Kv11 на домен CAD канала Kv10 приводит к образованию гетеромультимеров [60]. Долгое время считалось, что домены CAD и TCC необходимы для сборки каналов, но, как показали работы [14] и [16], это не обязательно. CAD-домен выполняет основную роль во взаимодействии между субъединицами канала. При этом в своем строении CAD домен имеет два субдомена, строго взаимодействующих друг с другом, нарушения в которых, приводят к

разрушению взаимодействия между САД доменами соседних субъединиц канала [61]. В работе [62] авторами был сконструирован ряд химерных конструкций между различными представителями семейств EAG (Kv10-12). Химерные конструкции содержали разные N- и C-концевые участки каналов семейства EAG. По все видимости, наличие как N-терминального, так и C-терминального доменов необходимо для сборки каналов в рамках одного подсемейства [62]. В работе [63] изучались эффекты, вызванные обменом участками A723-S962 и L719-F988 у каналов Kv10.1 и Kv10.2. Химерные каналы, содержащие в своей последовательности трансмембранную часть и N-концевой участок от одного канала, C-концевой участок - от другого. При экспрессии в клетках HEK293T или ооцитах *Xenopus* оба химерных канала давали характерные токи K^+ , обусловленных C-концевым доменом. В экспериментах по гибридизации отдельных фрагментов канала Eag с экспрессированным *in vivo* полноразмерным каналом, меченым ³⁵S радиоактивной меткой, определили минимально необходимый домен для взаимодействия между субъединицами канала. Для взаимодействия необходим C-концевой участок Eag – 937-962. При этом гибридизация с N-концевым участком канала не выявила необходимых для тетрамеризации взаимодействия [61]. C-линкер необходим для образования функционального канала. Удаление различных участков канала за счет введения стоп-кодона в C-линкере (Q477X и R521X) или в следующем за ним cNBHD (N673X и E722X) в гене KCNH1 крысы прекращает формирование электрофизиологических свойств канала [14]. Можно предположить, что C-линкер и другие C-концевые участки непосредственно участвуют в регуляции работы канала за счет взаимодействия с S6.

Исследования внутриклеточной локализации каналов показали, что химеры rEag1 с C-концевым доменом от канала rEag2 распределяются аналогично каналу rEag2. Аналогичные данные показал химерный канал rEag2, распределение сигнала флуоресценции для химеры оказалось характерной каналу rEag1. Эти данные свидетельствуют о потенциальной

корреляции между последовательностью, расположенной после CNBD домена и образованием кластеров канала в нейронах гиппокампа [63]. В работе [63] делают выводы, что дистальная область С-концевого участка каналов Kv10, включая домен карбоксильной сборки (CAD), не участвует в определении субклеточной локализации rEag1. Как было показано [14], мутация, при которой полностью отсутствует С-концевой CAD домен (K848X), сохраняет мембранный транспорт и биофизические свойства канала rEag1.

При исследовании инактивации каналов Kv было обнаружено, что N- и С-концевые домены, взаимодействуют между собой и с другими частями канала [40]. Известно, что С-концевые участки канала Kv1.2 способны взаимодействовать с S4–S5 линкером соседних субъединиц и тем самым регулировать работу канала. Полярная поверхность T1-домена у каналов Kv1.2 млекопитающих и Kv1.1 *Aplysia* играет ключевую роль в конформационных изменениях, лежащих в основе открывания канала [64]. Совместные перестройки N- и С-концевых участков канала Kv2.1 при деполяризации были показаны с применением метода FRET, комбинированного с методом петч-кламп [65]. Взаимодействия между N- и С-концевыми участками обнаружены также у каналов Kv7.1 [66].

У каналов семейства EAG площадь взаимодействия N- и С-цитоплазматических доменов велика и составляет примерно 1400 \AA^2 . Поверхность взаимодействия можно разбить на три региона: остатки 57-61 PAS домена (α B) взаимодействуют с внутренним мотивом CNBD, β A- и β B-листы в PAS взаимодействуют с пост-CNBD петлей, и N-концевой участок PAS домен (α CA β) образует взаимодействие с β -спиралью в CNBD [15] (рис. 8).

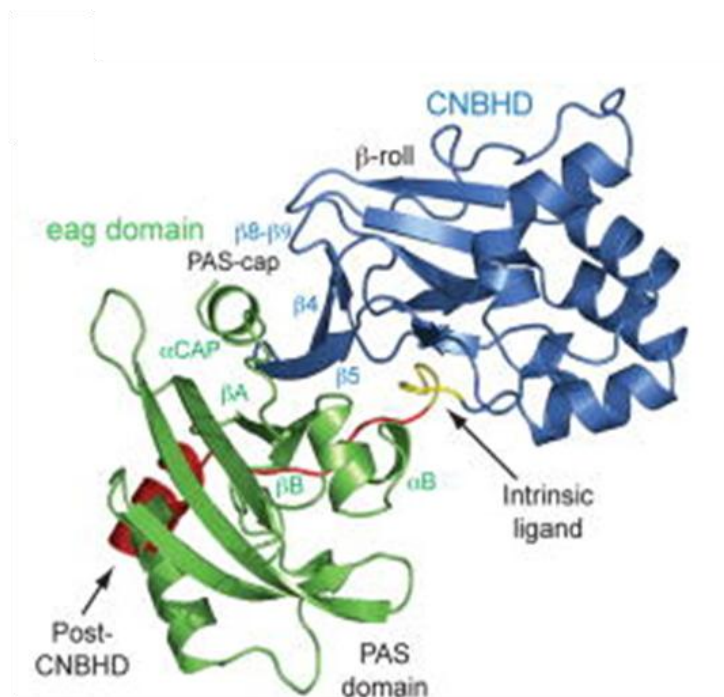


Рисунок 8 Кристаллическая структура комплекса цитоплазматических доменов EAG и CNBD канала Kv10.1 мыши. Синим – CNBD домен, зеленым – EAG домен, красным – пост-CNBHD петля [15].

Кристаллические структуры комплекса PAS-CNBBD представляют две различные конформации EAG- и CNBD-доменов. При этом α P-спираль (остатки 649-651) претерпевает значительные перегруппировки в разных конформационных состояниях. Наличие двух конформаций свидетельствует, что комплекс EAG–CNBD не является статичным и дает возможность предполагать, что существуют перестройки, связанные с регуляцией проводимости канала с помощью EAG-домена [15]. В работе [15] соотносили различные мутации в N- и C-концевых доменах канала KCNH исходя из структуры комплекса доменов EAG-CNBBD. Были изучены мутации вызывающие LQTS или иные нарушения в работе организма, связанные с данным типом канала [21,22]. Большая часть аминокислот, определяющая данные мутации, находится на границе взаимодействия двух доменов. Например, позиция N34 в EAG домене образует водородные связи с V634 в CNBD домене, мутация hERG1 N33T характерна для LQT2. Y44 образует взаимодействия с I637 и G639 CNBD домена. Y44H в hEAG1 мутация, коррелирующая с карциномой кишечника, а мутация hERG1 (Y43C)

приводят к LQTS [23]. Можно предположить, что нарушения во взаимодействии между двумя доменами лежат в основе патофизиологии заболеваний, связанных с KCNH. Например, мутации в T65P в PAS домене канала hErg приводят к нарушению транспорта в мембрану и сборки тетрамеров канала, а также дают снижение показателей активации/деактивации по сравнению диким типом [67].

N- и C- концевые домены активно участвуют во взаимодействии с белками цитоплазмы клетки. В экспериментах по иммунопреципитации различных участков C-концевого цитоплазматического домена канала Kv10.2 (S6-cNBD линкера остатки 471–549, cNBD остатки 550–650, варибельного домена остатки 717–826 (VD), и концевого участка остатки 909–978) со смесью белков человеческого мозга, были выделены и определены, ряд белков партнеров. В ходе экспериментов получили, что с S6-CNBD линкером взаимодействует α -тубулин, β -тубулин и Hsc71. Для cNBD α -тубулин, β -тубулин и основной белок миелина (MBP). У VD есть взаимодействие с α -тубулином, β -тубулином. Для C-конца характерно взаимодействие с MBP [20]. Коэкспрессия канала Kv10.2 и α -тубулина в ооцитах *Xenopus* отразилась на кинетике канала в виде увеличения времени активации канала. Подобные изменения происходят при обработке ооцитов колхицином, веществом, нарушающим образование микротрубочек. α -тубулин так же, как и колхицин, приводит к нарушению сборки микротрубочек. При этом обработка паклитакселом приводит к обратному эффекту за счет стабилизации микротрубочек [20].

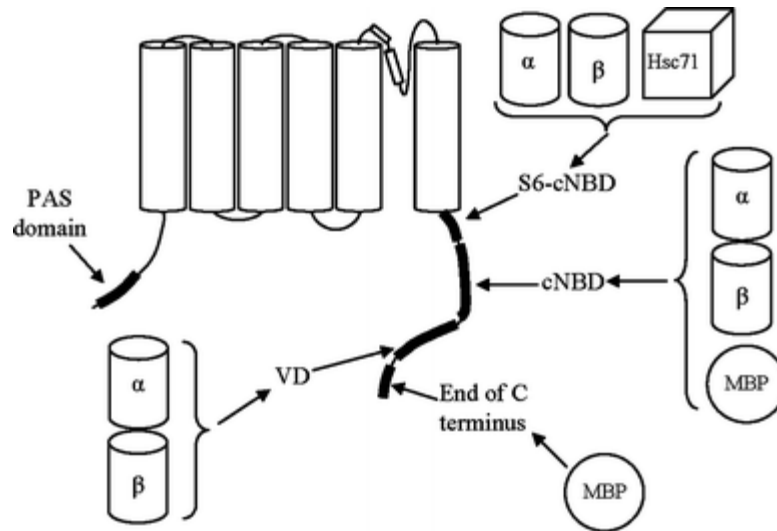


Рисунок 9 Схема взаимодействия С – концевых доменов канала HEAG2 с цитоплазматическими белками [20].

Для канала Kv10.2 не обнаружено тубулин-связывающего домена. По всей видимости, существует определенный белок-посредник между каналом и тубулином. Возможно, у канала Kv10.2 более сложный механизм взаимодействия с тубулином, в котором участвует несколько участков С-концевых доменов, и выделить отдельный участок взаимодействия пока не представляется возможным (рис. 9).

Кальмодулин и потенциал-зависимые калиевые каналы.

Одним из распространенных механизмов регуляции работы клеточных белков является концентрация кальция. Регуляция осуществляется через кальмодулин (CaM), белок, взаимодействующий с другими белками в зависимости от концентрации свободного кальция в клетке. Для потенциал-зависимых каналов также характерен данный метод регуляции [68].

Для каналов Kv7.1 выявлены остатки на С-конце, отвечающие за связывание CaM: K526 и K527. По сайтам K526 и K527 происходит конкурентное взаимодействие CaM и фосфатидилинозитол-4,5-бифосфата (PIP2). Мутации по данным сайтам приводят к нарушению взаимодействия с CaM, вызывая LQT синдром (синдром, выражающийся в удлинении промежутка на кардиограмме между зубцами Q и T во время сердечного сокращения). Эксперименты на культурах клеток СНО показали, что оверэкспрессия CaM приводит к уменьшению токов у каналов Kv7.2, Kv7.4, и Kv7.5, но не влияет на работу Kv7.1 и Kv7.3 [19]. При этом PIP2 стабилизирует канал в открытом состоянии, что приводит к увеличению амплитуды тока и обеспечивает более медленную деактивацию. Проксимальные цепи С-концевого участка канала взаимодействуют со спиралями S4-S5 посредством PIP2. При этом замещение кальмодулина PIP2 происходит только в присутствии кальция [69].

Для каналов eag характерно взаимодействие с CaM, при котором происходит ингибирование активности канала и в котором в равной степени принимают участие С-концевой и N-концевой участки [47,48,70]. В экспериментах по удалению N-концевого домена канала eag1 крысы происходит нарушение взаимодействия с CaM что приводит к невозможности регуляции канала посредством свободного кальция. В норме для канала Eag1 при наличии свободного кальция происходит блокирование канала в закрытой конформации. При удалении N-концевого домена

происходит не только изменение кривых активации и инактивации, но также наблюдается отсутствие регуляции канала CaM, даже при высоких концентрациях кальция [47] (рис. 10).

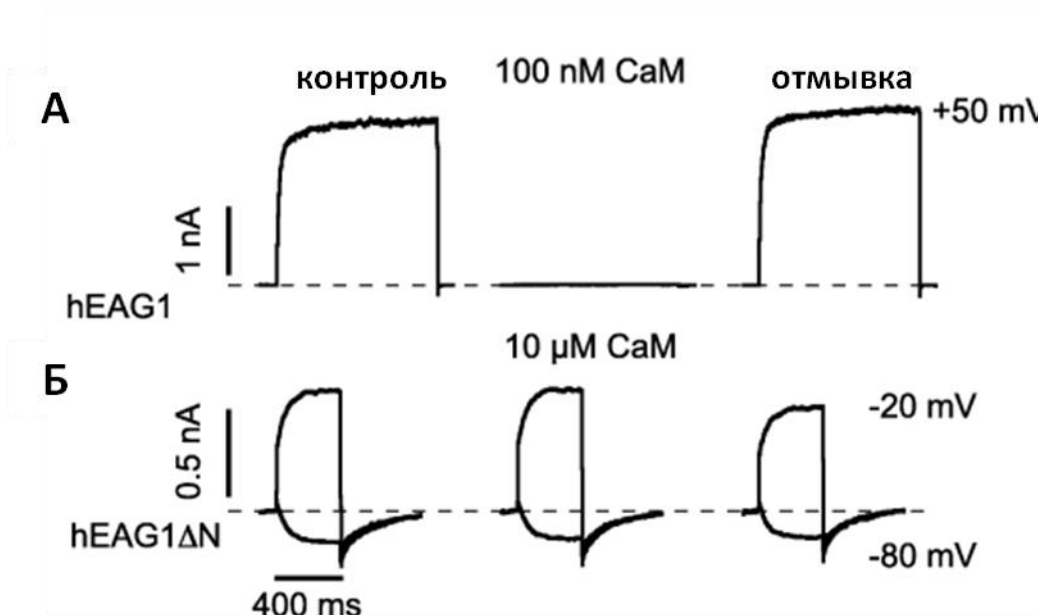


Рисунок 10. Токи канала Kv10.1, в зависимости от взаимодействия с кальмодулином (CaM). (А) Канал дикого типа. (Б) Транкированный по N-концевому домену канал [47].

В работе [54] показано, что каждая субъединица канала Kv10.1 взаимодействует с CaM по трем сайтам. Два сайта расположены в области CNBD-домена, включают остатки 683-695 и 708-722. Один сайт расположен в области PAS-домена, остатки 147-157.

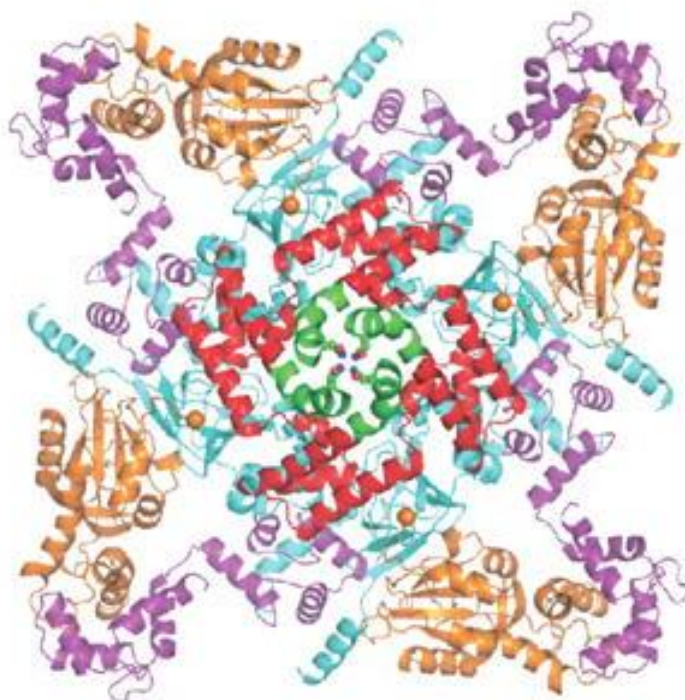


Рисунок 11 Организация цитоплазматических доменов канала Kv10.1, вид сверху. Порový домен (S6) – зеленый, С-линкер – красный, кальмодулин – фиолетовый, CNBD домен – голубой, PAS – оранжевый [47].

Исходя из структурных данных можно предположить, что CaM действует как молекулярный зажим, притягивающий CNBD-домен к PAS-домену соседней субъединицы, что приводит к конформационным перестройкам С-линкера, и последующему смещению S6. Подобное взаимодействие приводит к фиксации поры канала в закрытом состоянии (рис. 11).

Механизмы функционирования калиевых каналов.

Механизм активации калиевых каналов – тема продолжающихся дебатов. Для полного понимания вопроса необходимы знания об атомной структуре каналов в разных функциональных состояниях, как минимум, в двух конечных конформациях – открытой и закрытой. Большинство кристаллических структур Kv каналов [23, 41, 42] были получены в открытом состоянии. Недавно несколько структур каналов семейства EAG были получены в закрытой и открытой конформации методом крио-ПЭМ [53,54].

В каналах Kv существует три минимальных функциональных элемента: ион-проводящая пора с ионоселективным фильтром, потенциал-чувствительный сенсор, который реагирует на изменение электрического поля и ворота, одни или несколько, отвечающие за открывание или закрывание поры в зависимости от потенциала. У каналов Kv существуют три возможных типа ворот [40,71]:

1. Цитоплазматические ворота, находящиеся на конце S6 спирали.
2. Ворота на уровне селективного фильтра.
3. Инактивационные ворота, способные закупоривать пору со стороны цитоплазмы.

Первые два механизма закрывания связаны с потенциал-чувствительным доменом и обеспечивают активацию или инактивацию S-типа. Третий механизм приводит к быстрой инактивации N-типа (рис. 12).

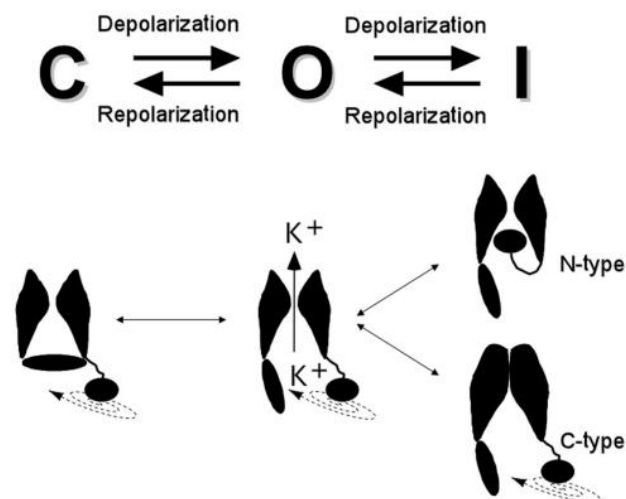


Рисунок 12. Схематическое представление конформационных состояний каналов семейства Kv [40].

Один из предложенных механизмов инактивации калиевых каналов - «шар-цепь», где «шар» - инактивационный пептид, находящийся на N-конце, а «цепь» - последовательность из ~80 аминокислот, связывающая пептид с T1 доменом [7] **Ошибка! Источник ссылки не найден.** При инактивации канала инактивационный пептид взаимодействует с порой со стороны цитоплазмы и перекрывает ток ионов через канал. Этот механизм закрывания поры канала был впервые изучен в 1990 году при исследовании быстрой инактивации N-типа канала *Shaker* [40]. Процесс инактивации по N-типу исчезал при удалении 20 концевых аминокислот с N концевого участка [72].

Однако для канала Kv1.4 удаление части последовательности «цепи» не только не приводило к укорачиванию времен инактивации, а, напротив, увеличивало их, что привело исследователей к выводу о том, что возможно специфическая структура этого региона влияет на движение и ориентацию инактивирующей частицы [73].

Положение «шара» четко определено, он находится внутри поры для инактивации канала, в отличие от «цепи», положение сегментов которой и их динамические перестройки в ходе закрытия и открытия канала неизвестны.

Экспериментальные данные для построения моделей активации Kv каналов.

В самых первых моделях активации Kv каналов, было предположено, что при активации канала сенсор потенциала S4 под действием изменения трансмембранного потенциала движется вверх по каналу, который сообщается с наружным и внутренним растворами [74]. Позже стали накапливаться экспериментальные данные о функционировании Kv каналов, которые позволили уточнить имеющиеся модели активации. К основополагающим данным, важным для расшифровки механизма активации Kv каналов относятся следующие наблюдения:

(1) Сегмент S4 содержит консервативный повторяющийся мотив из трех аминокислотных остатков: (+, X1, X2, +, X1, X2 ...).

Мутационный и электрофизиологический анализ позволил определить остатки, наиболее значимые (HI - high-impact) и менее значимые (LI - low-impact) для процесса активации/деактивации канала [75]. Сенсор потенциала S4 содержит консервативную последовательность (+, X1, X2, +, X1, X2 ...), в которой (+) – положительно заряженный HI (значимый) остаток, (X1) - гидрофобный HI остаток, и (X2) - гидрофобный LI (незначимый) остаток (рис.3А) [76,77]. Остатки X1, располагаются в белковом окружении, где их мутации могут привести к нарушению упаковки белка, а следовательно и к нарушению процесса открытия/закрытия канала. Остатки X2 экспонированы в липидное или водное окружение, и их воздействие на функционирование канала незначительно. Повтор (+, X1, X2, +, X1, X2 ...) формирует три параллельных левозакрученных витка с небольшим наклоном вдоль правозакрученной спирали S4.

(2) Каждая субъединица несет ~3 воротных заряда, расположенных на остатках R1-R4 спирали S4.

Движение сенсора потенциала S4 может быть детектировано посредством измерения воротных токов, происходящих при передвижении электростатических зарядов спирали S4 относительно электрического поля.

При переходе канала *Shaker* из покоящегося в активированное состояние перемещается ~3,2-3,4 заряда на субъединицу [78–80]. Метод поочередной нейтрализации отрицательных зарядов спиралей S2/S3 и положительных зарядов S4 позволил идентифицировать а.о., переносящие воротный заряд [79,80], это остатки R1, R2, R3 и R4 [81,82].

(3) 10 аминокислотных остатков сегмента S4 расположены в мембране.

Замена некоторых а.о. канала *Shaker* на Cys показало, что при нахождении канала в состоянии покоя, последовательность из ~10 а.к. недоступна как для внутриклеточного, так и внеклеточного раствора [83,84]. Эта последовательность соответствует ~13,5Å α -спирали и может включать в себя только 2 – 3 положительных заряда S4 (рис.3 Б, В). Соответственно, с обеих сторон мембраны имеются глубокие водные вестибюли, и лишь малая часть S4 располагается в коротком ВК.

(4) Спираль S4 может перемещаться в заполненной водой щели, так называемом «воротном канале» (ВК) с очень узким барьером между внешним и внутренним растворами.

При этом три «стороны» ВК формируют спиралы S2/S3, поровый домен и липиды. Взаимодействие между тремя консервативными отрицательными а.к. в спиральных S2, S3 и положительными а.к. в S4 свидетельствует о том, что S2 и S3 лежат с одной стороны ВК [79,85–87].

Флуоресцентный и мутационный анализ свидетельствуют о том, что с другой стороны ВК находится поровый домен [88,89]. Это подтверждается тем, что при активации остатки R1 и R2 спиралы S4 сближаются с остатком E418 порового домена [90,91] и что Cys введенные в S4 могут образовывать связь с Cys, введенными в поровый домен [75,92].

Третья сторона ВК, по-видимому, образована липидами, что соответствует гидрофобной природе остатка спиралы S4 в позиции X2. На это также указывает то, что мутации этих остатков слабо связаны с активацией канала [76,77].

(5) Активация приводит к смещению сегмента S4 на девять аминокислотных остатков.

Метод измерения флуоресценции показал, что процесс активации связан с передвижением ~ 9 а.к. S4 из ВК во внешний раствор [77,83,84,93,94]. При этом последовательность из ~ 9 а.к. исчезает из внутреннего водного вестибюля [83,84].

(6) Спираль S4 вращается во время активации.

С помощью метода FRET было обнаружено, что при активации канала происходит вращение S4 на $\sim 180^\circ$ [95,96].

(7) Сенсор мембранного потенциала S4 имеет стабильное промежуточное состояние.

С помощью кинетических исследований были обнаружены две фазы движения воротных зарядов [97] и продемонстрированы два последовательных передвижения воротных зарядов во внешнем направлении с промежуточной трансмембранной позицией S4.

(8) Канал может формировать протонную пору.

Замена остатка R1, либо R4 на His позволяет каналу пропускать протоны (омега-ток) [81,82]. Следовательно, канал может содержать водный канал, который является мостом между внутренним и внешним растворами, при этом R1H формирует протонную пору в состоянии покоя, R4H в активированном состоянии.

Современные модели активации Kv каналов семейства *Shaker*.

С появлением кристаллической структуры эукариотического канала Kv1.2 [9], которая впоследствии была улучшена [98], и структуры химеры Kv1.2/Kv2.1 [9] стали доступны новые данные об открытой конформации Kv канала. Усовершенствование компьютерной техники и методов привело к возможности рассчитывать более сложные молекулярные модели и изучать механизмы функционирования посредством молекулярной динамики. Все

это привело к возникновению ряда новых моделей и гипотез активации Kv каналов [99].

Полученные данные свидетельствуют о том, что активация Kv каналов связана с двумя основными типами конформационных изменений: (1) независимые движения VSD доменов с переходом из состояния покоя в «закрытое активированное» состояние, которое сохраняет ворота порового домена закрытыми [100–102], и (2) кооперативный переход всех доменов VSD и порового домена в открытое состояние, при котором ворота порового домена открыты для проникновения ионов [101–103].

Роль открытия ворот отводится внутриклеточному участку спирали S6; при этом S5 сначала поворачивается на $\sim 7\text{\AA}$ вокруг порового домена. Таким образом, во вторую основную перестройку вовлечены наклоны спирали S4, способствующие наклону внутриклеточной половины спирали S5. Такое движение против часовой стрелки (с внеклеточной стороны мембраны) дает возможность линкеру S4-S5 и спирали S6 во всех четырех субъединицах двигаться вместе и открывать внутриклеточные ворота.

Р. МакКиннон с сотрудниками [104] обнаружили в домене VSD высококонсервативный сайт, сформированный двумя негативно-заряженными а.к. (D259, E236 – в канале *Shaker*) и одной высоко консервативной F233, который представляет собой «катализатор» переноса через мембранное поле каждой из основных а.к. (R1-R4, K5) VSD домена. Этот сайт был назван центром переноса зарядов (ЦПЗ) [105]. При движении S4 каждая из её заряженных а.к. последовательно связывается с этим центром, в результате чего весь процесс активации/инактивации разделяется на пять последовательных стадий (открытый канал, три промежуточных стадии и закрытый канал), в которых заряженные а.к. спирали S4 (R1-R4, K5) последовательно связываются с ЦПЗ. Основываясь на данных исследования [104], группа исследователей из Франции [106], используя метод МД, изучила структуру домена VSD, находящегося в различных промежуточных состояниях канала Kv1.2, помещенного в липидный бислой с приложенным

гиперполяризационным потенциалом. Полученные пять стадий были названы: начальное верхнее положение, α ; три промежуточных, β , γ , δ ; и нижнее закрытое положение, ϵ . При деактивации канала, основные заряженные а.к. S4 движутся от внешних к внутренним сайтам связывания, которые представляют собой отрицательно-заряженные аминокислоты сегментов S1-S3 (E183, E226, D259, и E236), а также группами PO4 – липидов. Во время деактивации канала центр масс остатков R1-R4 движется во внутриклеточном направлении приблизительно на 12 Å [95,96]. Кроме того, каждое из четырех перемещений сопровождается передвижением одного остатка (K5, R4, R3 и R2, соответственно) через участок ЦПЗ.

Электромеханическая связь между поровым и VSD доменами.

Для объяснения функционирования Kv канала и выяснения механизма электромеханической связи порового и VSD доменов группа исследователей [107] изучила кристаллическую структуру открытого состояния канала Kv1.2/Kv2.1 [9,108] с помощью метода МД. Известно, что основная роль в формировании электромеханической связи между VSD и поровым доменами отводится линкеру S4-S5 [43,107].

Авторам удалось создать цельную и подробную механистическую модель активации/деактивации Kv канала (ММа), объясняющую многие ранее неизвестные черты этого процесса [107].

При деактивации канала происходит уменьшение ионного транспорта, сопровождаемое выходом воды из гидрофобной полости поры и конкурентным закрытием поры (коллапс поры) что объясняет осмотическую зависимость всего процесса функционирования канала [109,110]. Далее происходит (1) полная релаксация доменов VSD –передвижение S4 внутрь на ~15 Å, относительно более неподвижных спиралей S1-S3a, а также (2) вращение S4 на ~120°, благодаря которому заряженные а.к. остаются направленными в полость VSD, и (3) боковое разделение VSD и порового доменов за счет вращения и передвижения VSD наружу относительно поры,

что позволяет поре оставаться закрытой. Остаток R4 при активированном состоянии канала располагается по центру мембраны в точке наибольшего трансмембранного электрического поля и является инициатором движения воротных зарядов. ЦПЗ - центральный гидрофобный остаток F233, разделяющий внешнюю и внутреннюю гидратированные полости домена VSD. Остатки R3 и R2 движутся последовательно, при этом движение S4 во внутреннем направлении обычно останавливается, когда R1(Q) достигает остатка F233. В VSD домене образуется несколько солевых мостиков, но в основном S4 взаимодействует с фосфатными группами липидов. Эти данные согласуются с данными о функциональном взаимодействии VSD домена с липидами [111,112].

При активации канал проходит те же этапы, но в обратном направлении: S4 стремительно передвигается наружу на $\sim 5-10$ Å. На первом этапе воротные заряды передвигаются быстро, так как большинство солевых мостиков между S4 и другими сегментами домена VSD в закрытом состоянии разрушены; при движении S4 наружу эти солевые мостики временно восстанавливаются, приводя к постепенному замедлению движения S4. Как только движение S4 подходит к завершению, домены VSD приближаются к состоянию, характерному для активированного канала. Ключевым отличием от деактивации является то, что все четыре домена VSD должны быть подняты перед полным открытием поры канала; канал с полностью перемещенными вверх S4 сегментами нарушает упаковку S4-S5 линкера со спиралью S6, что позволяет воде и выходящим ионам вновь зайти в пору и восстановить проводимость. Боковые цепи L331 (S5) и P405 (S6) переходят в положение, позволяющее им взаимодействовать [109]. Такие перестройки способствуют связыванию спирали S6 с мотивом PVP, что приводит к расширению с внутриклеточной стороны и полной гидратации поры. Сопутствующее этому открытие верхних (гидрофобных) ворот (I402) позволяет сайту S5 селективного фильтра заполниться ионами K⁺ [113] а каналу перейти в полностью открытое состояние. Спираль S6 и линкер S4-S5

принимают плотноупакованную конфигурацию, которая стабилизирует открытие поры.

Таким образом, открытие и закрытие Kv канала – это энергетически асимметричный процесс [107]. Так как пора является более стабильной в дегидратированном закрытом состоянии [109,114] (в связи с гидрофобностью полости поры [109], для её закрытия нет необходимости в сильном давлении спирали S4 на линкер S4-S5. Напротив, активация канала требует приложения работы деполяризации, стимулирующей передвижение S4 через мембрану, который в конечном счете сильно тянет линкер S4-S5, что приводит к нарушению взаимодействия S4-S5/S6 и открытию поры. Только когда все воротные заряженные а.к. и линкер S4-S5 находятся в поднятом состоянии, происходит достаточно сильная дестабилизация закрытой поры, в результате чего флуктуации нижних ворот (за счет нарушения взаимодействий линкера со спиралью S6) позволяют частично, а затем и полностью гидратировать полость поры. Линкер S4-S5 находится в напряжении в активированном состоянии канала и расслаблен в состоянии покоя, что возможно объясняет консервативность длины линкера: более короткий линкер ингибирует закрытие канала, так как S4 не может переместиться на достаточное расстояние, а более длинный линкер ингибирует открытие, потому что даже полное перемещение S4 во внешнем направлении не может эффективно тянуть спираль S6 посредством линкера S4-S5 [107].

Модель ММа показала, что линкер S4-S5 и С-конец спирали S6 управляют процессом открытия/закрытия канала, независимо от механизма, поднимающего и опускающего домен VSD [107]. При этом линкер S5 функционирует как рычаг, передающий движение сенсора потенциала к S6. В ответ на движение сенсора потенциала, S6 двигается внутри мембраны за счет «пролинового шарнира» (мотив PVP), вследствие чего происходит открытие или закрытие канала [8]. Как показали исследования [13],

реализация механизма активации, характерного для каналов семейства *Shaker* не возможна при отсутствии ковалентной связи между S4 и S5.

Модели регуляции ворот канала семейства Eag.

Последние исследования каналов семейства EAG показали, что подходы, использованные в моделях, основаны на структуре каналов семейства *Shaker*, не совсем подходят для описания работы семейства каналов, кодируемых геном KCNH [10–13].

Как предполагают Вичер и Маккинон [54], закрытие поры для каналов семейства EAG возможно и без взаимодействия с S4-S5 линкером, а основную роль в передаче конформационных изменений на S6 осуществляет С-линкер и связанный с ним CNBD-домен. При перемещении S4 в нижнее положение (при гиперполяризации мембраны) С-конец спирали S4 взаимодействует с С-линкером, который, в свою очередь, воздействует на спираль S6 и изгибает ее, приводя пору канала в закрытое состояние. Важен в этом процессе и N-концевой PAS-домен, который взаимодействует как с потенциал-чувствительным доменом, так и с С-концевыми CNBD-доменами (рис. 13). Это подтверждается тем, что связывание с CaM приводит к закрытию поры канала Kv10.1 независимо от потенциала [48].

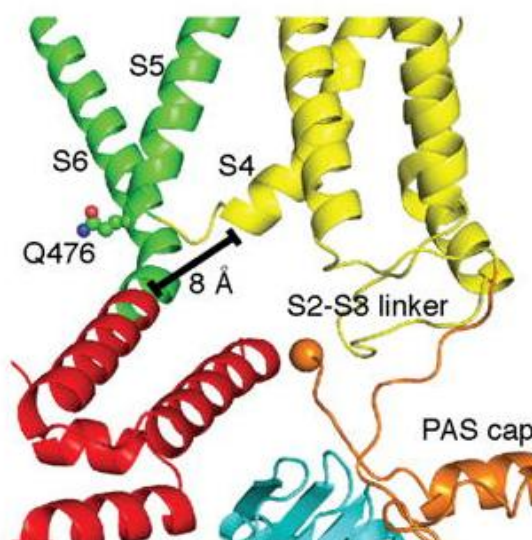


Рисунок 13. Организация порового пространства канала Kv10.1. S6, S5 – отмечены зеленым, С-линкер – красным, VS – желтый, CNBD домен – синий, PAS – оранжевый. Черной шкалой отмечено расстояние между С-линкером и S4 [54].

Сравнение структуры канала Kv11.1 в открытой конформации [115] с каналом Kv10.1, пора которого была закрыта за счет взаимодействия с CaM [54], привело исследователей к новой гипотезе функционирования каналов семейства EAG (рис. 14). Отличие ее от предыдущей модели состоит в том, что С-линкеру отводится меньшая роль, а основное изменение конформации S6 происходит за счет изгиба в области глицинового шарнира под действием латерального смещение S4 и S5 сигментов. Роль шарнира который обеспечивает изменение конформации S6 выполняет остаток глицина (G648 у Kv11.1 и G460 у Kv10.1) (рис. 14B) [11].

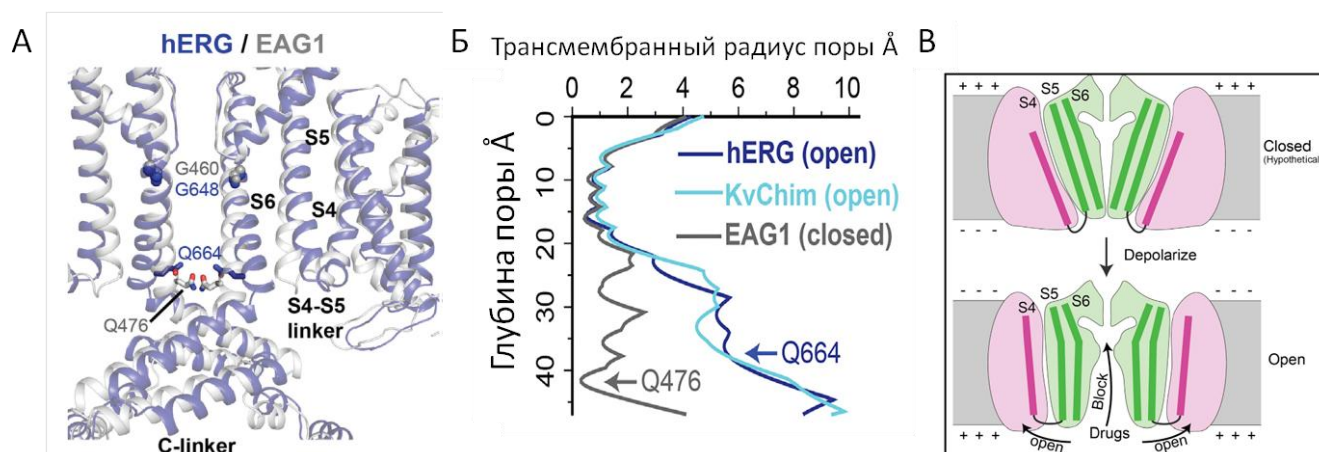


Рисунок 14 (А) Различия в структурах трансмембранной части и прилегающих к поре цитоплазматических доменов открытого канала Kv11.1 (фиолетовый) и закрытого канала Kv10.1 (серый). **(Б)** Сравнения профиля каналов, полученных в открытом состоянии (hERG и KvChim и закрытом (EAG1). **(В)** Схема функционирования каналов семейства EAG [11].

В ряде исследований были выдвинуты предположения, что активация каналов семейства EAG происходит по лиганд/рецепторному механизму [12,116].

Для их функционирования нет необходимости механического воздействия линкера на поровый участок канала S6. У представителей семейства EAG линкер S4-S5 короче, чем у других семейств потенциал зависимых калиевых каналов, что делает невозможным его функционирование как «молекулярного рычага». В данном случае пептид S4-S5 действует как внешний лиганд, который связывает S6T и блокирует канал в закрытом состоянии, когда сегменты S4 находятся в состоянии «внизу» при отрицательном потенциале. Когда сегменты S4 находятся в состоянии «вверху», линкер S4-S5L выходит из кармана связывания с S6T и происходит открытие канала. Этот молекулярный механизм согласуется с предыдущими наблюдениями [116], сделанными на каналах hERG [12] (рис 15).

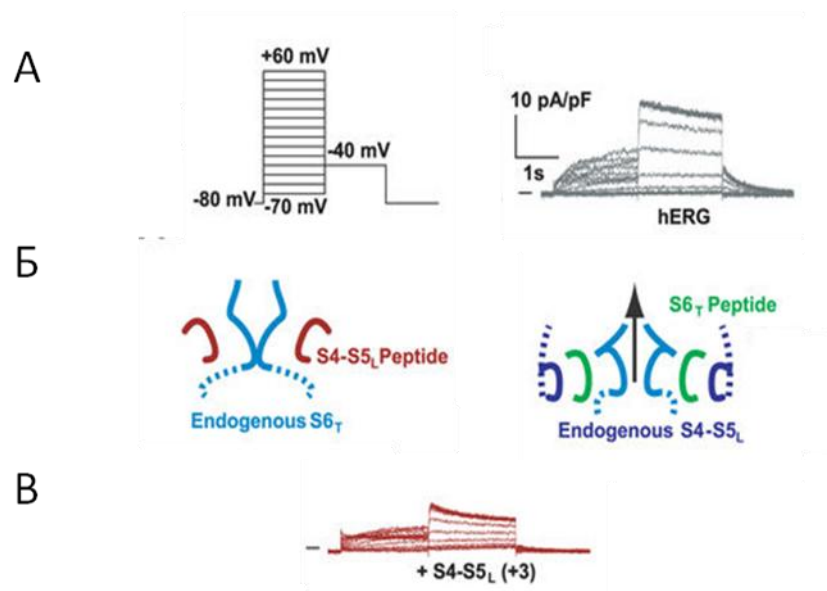


Рисунок 15 Влияние экзогенных пептидов на работу каналов Kv11.1. (А) Токи каналов Kv11.1 (Б) Схемы, представляющие связь экзогенных S4-S5 и S6T пептида с воротами канала Kv11. (В) Токи канала ко-экспрессированного с S4-S5 пептидом [12].

Для подтверждения гипотезы о непосредственном взаимодействии линкера S4-S5 и терминальной области S6 авторами статьи [12] были введены цистеиновые замены в положениях D540C и L666C, эффект от которых был ранее описан в статье [116]. Для бицистеиновых мутантов в ходе экспериментов по обработке клеток реактивом T_бNO₂ (трет-бутил гидропероксид) было показано, что происходит инактивация канала, при этом функции канала восстанавливаются после обработки раствором, содержащим восстановитель цистеиновых связей DTT [12]. При ко-экспрессии полноразмерного белка hErg с экзогенными пептидами, имитирующими различные участки S4-S4 линкера, токи через канал ингибировались и порог активации сдвигался на 5 мВ в отрицательную область (рис. 15 В) [12].

Мембранный транспорт потенциал-зависимых каналов.

Синтез ионных каналов, как и других мембранных белков, происходит на эндоплазматическом ретикулуме. После того как мРНК канала взаимодействует с рибосомой и белки распознают последовательность мембранной локализации, происходит связывание с транслокатором. Образование тетрамеров канала происходит в ЭПР. В аппарате Гольджи происходит гликозилирование канала, а уже после этого субъединица канала транспортируется в мембрану клетки [117,118]. Транспорт к плазматической мембране осуществляется везикулами, покрытыми белковым комплексом СОРII (coat protein complex) [119] (рис. 16). Время полудеградации канала в мембране составляет примерно 10 часов [120].

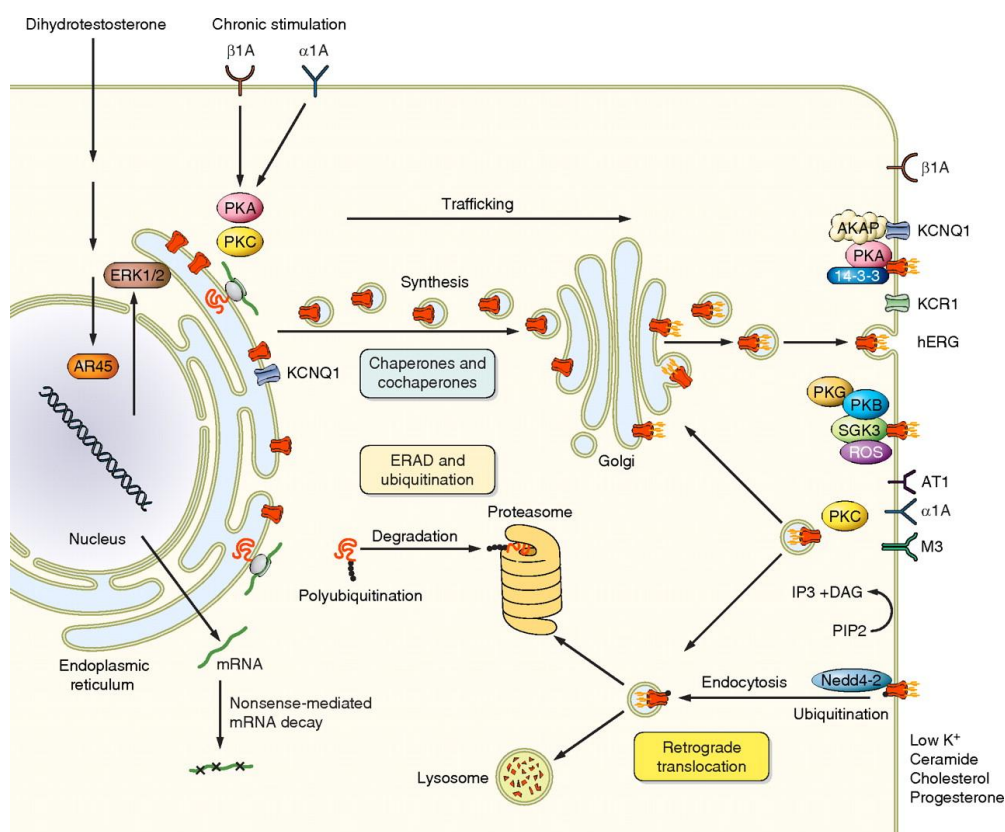


Рисунок 16 Биогенез каналов EAG, на примере канала hErg [117].

Причин нарушения транспорта канала в мембрану может быть несколько. Одной из них является нарушение синтеза мРНК, вследствие чего не происходит синтез белка канала. Также может изменяться фолдинг белка.

Для правильной укладки белки каналов нуждаются во взаимодействии с шаперонами. Шапероны Hsp70 и Hsp90 необходимы для правильной укладки и транспорта каналов семейства eag. Предполагают, что сайт взаимодействия шаперонов и белка канала расположен на С-конце [121]. Для ряда мембранных белков описан мотив RXR (Arg-X-Arg), необходимый для транспорта белка к мембране [122]. Правильное гликозилирование канала также имеет значение для транспорта каналов к мембране клетки. Мутации по сайтам гликозилирования приводят к нарушению трафика каналов [123].

Один из представителей семейства потенциал-зависимых калиевых каналов - Kv7.1, для которого описаны мутации, приводящие к нарушению мембранного транспорта. У транскрибированных форм канала Kv7 по N-концевому цитоплазматическому домену ($\Delta 14$, $\Delta 50$, $\Delta 84$, $\Delta 94$, $\Delta 99$ и $\Delta 106$ -KCNQ1) сохраняется мембранная локализация. При этом для канала с делецией первых 140 аминокислот происходит нарушение мембранного транспорта. Так же подобные нарушения происходят при мутациях аминокислот, находящейся на проксимальном участке N-концевого цитоплазматического домена: Y111C, L114P, и P117L. Делеция дистального N-концевого домена не приводит к нарушению мембранного транспорта. [124].

Для каналов Herg характерно большое количество мутаций, приводящих к LQT-синдрому, ассоциированных с С-концевым доменом. Удаление последовательности между остатками 860 и 899 приводит к нарушению мембранного транспорта канала, но при этом сохраняется его тетрамеризация. Происходит удержание канала в эндоплазматическом ретикулуме, и зрелая гликозилированная форма канала не образуется [125].

Кластеризация ионных каналов.

Развитие нервной системы является важным фактором в эволюции животных. В связи с увеличением размеров организмов появилась необходимость быстрой передачи нервного сигнала на большие расстояния с

минимальными затратами для метаболизма. У позвоночных данная проблема решена за счет развития миелиновой оболочки и кластеризации ионных каналов. Кластеры ионных каналов отсутствуют у беспозвоночных животных: насекомых, червей и т.д. Для животных, у которых отсутствует глия, для увеличения проводимости присутствуют гигантские аксоны. Но инициация ПД в гигантских аксонах затруднена. Поэтому кластеризация ионных каналов необходима для увеличения локальной плотности каналов и облегчения инициации ПД. Для каналов, входящих в состав кластера, характерно уменьшение проводимости ионов или полное ее отсутствие [126].

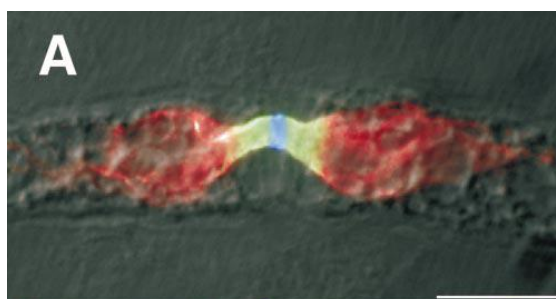


Рисунок 17 Распределение каналов разных типов в перехвате Ранвье. Иммуноокрашивание шванновских клеток в области перехвата Ранвье. Красным окрашены калиевые потенциал-зависимые каналы, Синим - натриевые потенциал-зависимые каналы [127].

Формирование кластеров калиевых канала начинается в перехвате Ранвье, но затем кластеры быстро мигрируют в пространство вокруг перехвата [128]. В результате в областях перехватов Ранвье калиевые каналы отсутствуют, но расположены вокруг них под миелиновой оболочкой [129] (рис. 17). Ингибирование миелинизации аксона приводит к ингибированию кластеризации калиевых каналов [130]. При нарушениях миелинизации аксонов зрительного нерва, кластеры калиевых каналов располагаются в случайном порядке [131].

Существенную роль в кластеризации каналов играют различные компоненты белков скаффолда. Для каналов Kv2.1, расположенных в аксональных холмиках характерна тесная взаимосвязь кластеров с белками анкиринами, для каналов Kv7 и Nav также наблюдается взаимосвязь с

анкирином [132]. Нарушение синтеза анкирина G приводит к нарушению работы потенциал зависимых каналов [133].

Подвижность каналов Kv10.1 связана с цитоскелетом. При разрушении цитоскелета происходит уменьшение количества каналов в синаптической области нейрона [134]. Наличие актин-спектриновой сети и связанных с ней через анкирин трансмембранных белков позволяет упорядочить субклеточное пространство и улучшить показатели ПД [135]. Спектрин в перехвате Ранвье уменьшает плотность мембран и увеличивает плотность каналов. Разрушение актина в клетке приводит к декластеризации канала Kv2.1 [136].

Распределение каналов eag в организме.

Для каналов семейства Kv10 подробно изучена локализация в мозге млекопитающих, на примере крысы. В экспериментах по *in situ* гибридизации была показана локализация канала Kv10.1 в различных структурах головного мозга. Наиболее выраженная экспрессия генов данного канала у взрослых крыс наблюдается в обонятельных луковицах, коре головного мозга, гиппокампе и мозжечке [3,137]. В меньшей степени данный канал экспрессируется в ядрах таламуса. В коре канал Kv10.1 расположен в IV и VI слоях, для мозжечка наличие канала характерно для гранулярного слоя и, в меньшей степени, для слоя Пуркинье [137].

Данные по экспрессии канала Kv10.2 достаточно ограничены. Экспрессия канала наблюдается в обонятельных луковицах, таламусе миндалинах и коре головного мозга взрослых крыс (рис. 18). Частично экспрессия наблюдается в гиппокампе и в мозжечке. Канал Kv10.2, в отличие от Kv10.1 расположен в III и IV слоях, при этом показано, что данные каналы расположены не в тормозных нейронах, а в возбудимых нейронах, и участвуют в формировании потенциала действия [4].

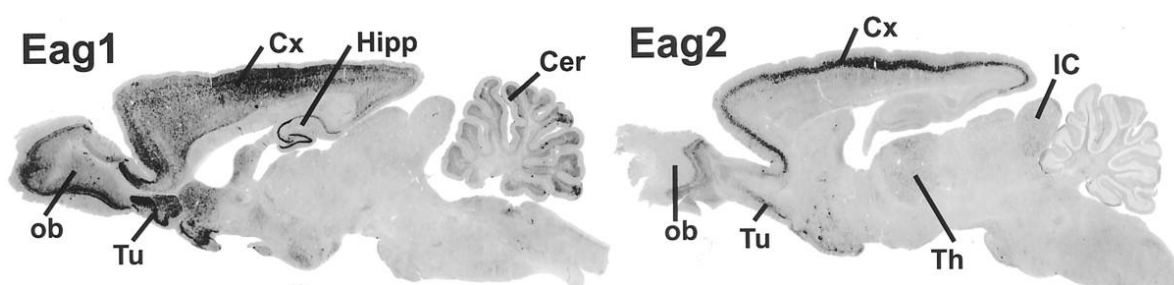


Рисунок 18 Распространение каналов Eag1 Eag2 в головном мозге крысы. Сх - кора головного мозга, IC - нижнее двухолмие, Th- таламус, Hipp - гиппокамп, Cer - мозжечек, Tu - обонятельные бугорки, об - обонятельные луковицы [4].

Для каналов Kv10.1 и Kv10.2 характерна экспрессия в клетках сетчатки. Наибольшая экспрессия канала Kv10.1 наблюдается во внутреннем плексиформном слое, но канал также экспрессируется во внешнем и внутреннем сегментах фоторецепторных клеток, во внешнем плексиформном слое, внутреннем ядерном слое и в ганглиозных клетках. В отличие от канала

Kv10.1, канал Kv10.2 отсутствует во внутреннем плексиформном слое, но экспрессируется во внешнем плексиформном слое. Канал Kv10.2 также обнаружен во внешнем и внутреннем сегментах фоторецепторных клеток, внутреннем ядерном слое и в ганглиозном слое [138].

Для остальных органов данные по экспрессии канала Kv10.2 разнятся. Используя метод ПЦР, показали строгую локализацию гена Kcnnh5 только в мозгу взрослых крыс, тогда как в сердце, скелетных мышцах, селезенке, легких, почках и печени значения для транскриптов гена KCNNH5 были отрицательны. В исследованиях показали, что, кроме ЦНС, канал Kv10.2 экспрессируется в активно делящихся клетках во время дифференцировки [137].

Функции канала, учитывая его расположение в мозгу млекопитающих, могут быть связаны, в первую очередь, с восприятием эмоциональной информации, контролем гормонального фона, обеспечением правильной работы клеток Пуркинье, а так же участием в различных функциях ствола головного мозга.

Участие канала Kv10.2 в клеточной пролиферации и возникновении рака.

Степень экспрессии каналов в клетке связана с клеточным циклом. Раковые клетки увеличивают экспрессию калиевых каналов в ответ на временную гиперполяризацию клетки при ее активном делении. Таким образом, уровень экспрессии каналов сильно зависит от фазы клеточного цикла [139]. Например, экспрессия канала hEAG1 зависит от клеточного цикла при развитии человеческой нейробластомы [140]. Скорость активации канала hERG зависит от клеточного цикла [141]. Стоит заметить, что мутантные формы канала EAG, не способные к проведению ионов, а значит и не изменяющие значение потенциала клетки, также влияют на пролиферацию [142]. При медуллобластоме происходит оверэкспрессия канала EAG2 в головном мозге мышей. Нокаут гена Kv10 приводит к уменьшению роста

опухоли при ксенотрансплантологии и к увеличению шансов выживания особей. Наиболее активная экспрессия гена KCNH5 при данной патологии происходит в фазе G2 клеточного цикла [6].

Для канала Kv10.2 в клетках медуллобластомы была обнаружена особенная внутриклеточная локализация. Когда клетка находится в немигрирующем состоянии, канал преимущественно расположен в приадресном пространстве мембраны. Для мигрирующей клетки характерно смещение канала к противоположной направлению миграции клетки части мембраны (рис. 19).

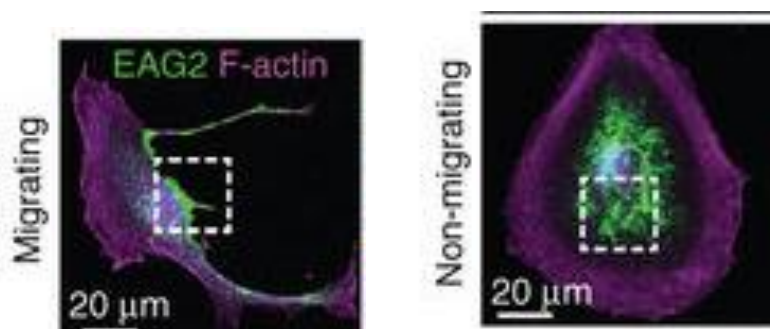


Рисунок 19 Участие каналов Kv10.2 в миграции клеток. Зеленым показан - сигнал от канала, Фиолетовым - сигнал от F-актина [6].

При нокдауне гена канала Eag2 происходило заметное уменьшение скорости миграции клеток, но направление миграции клеток оставалось прежним. Подобный эффект наблюдался при обработке астемизолом, неспецифическим блокатором канала Kv10.2 с концентрацией полумаксимального ингибирования 1,5 мкМ. По всей видимости, снижение метастазирования клеток с нокдауном канала Kv10.2 наблюдается из-за ухудшения клеточной пролиферации (нарушение митоза), а также снижения моторики клеток за счет ухудшения способности клетки втягивать задний край при миграции [6].

Грамицидин А – модельный объект для изучения катионных ионных каналов

Грамицидин часто используется как модельный объект для структурных и функциональных исследований трансмембранных каналов [143,144]. Он

является первым антибиотиком, использованным в клинической практике в 1939. Грамицидин продуцируется почвенными бактериями *Bacillus brevis*. Концентрация грамицидина в бактериальной клетке может достигать до 1М, во время споруляции. Грамицидин синтезируется при помощи не рибосомного мультиферментного комплекса NRPS (Non-Ribosomal Peptide Synthesis) и содержит L- и D- аминокислоты. Природная смесь грамицидина, помимо грамицидина А содержит грамицидины В и С. Отличие их от грамицидина А заключается в замене триптофана в 11 положении на Phe и Tyr соответственно. В части молекул Val в первом положении замещается на Ile [145].

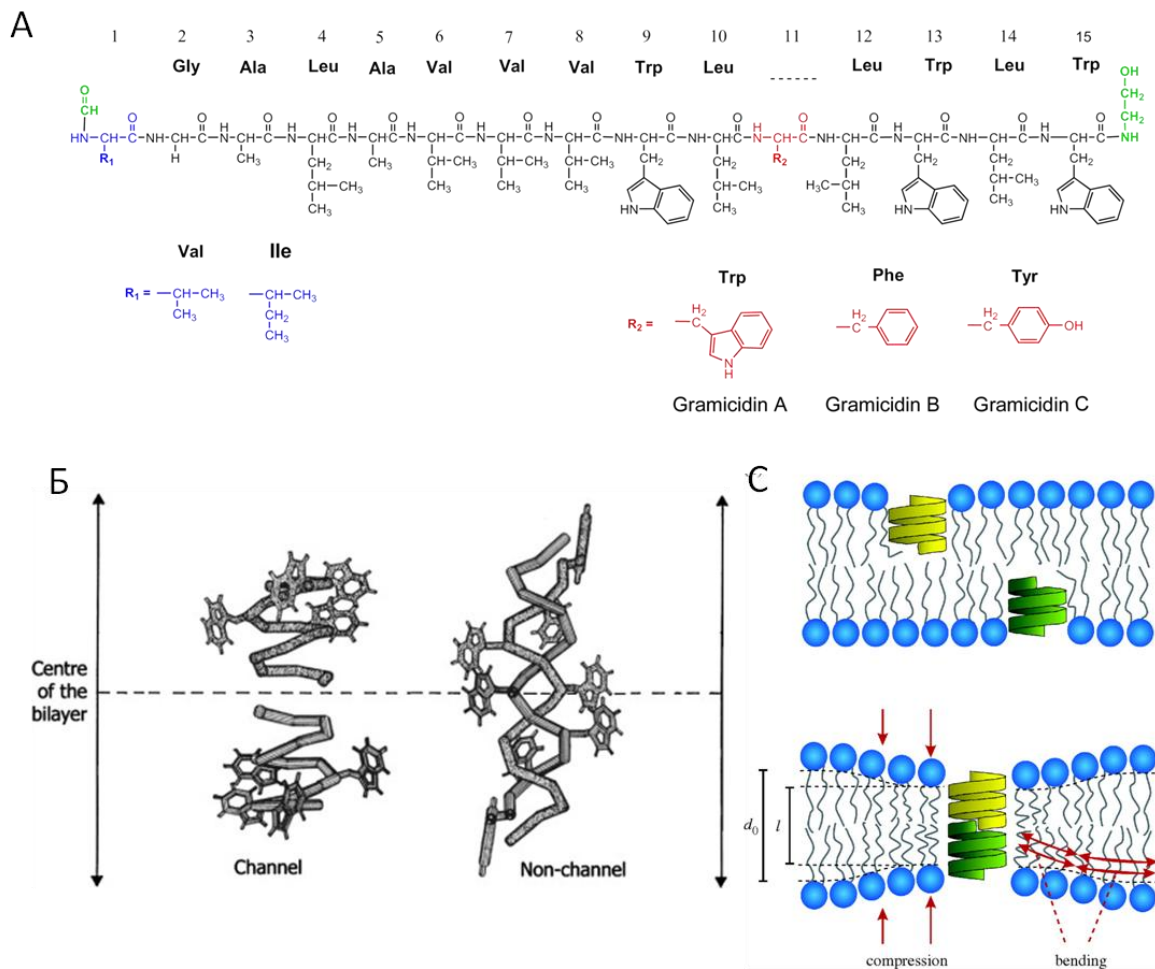


Рисунок 20 А - аминокислотная последовательность аналогов грамицидина. **Б** - схематическое представление двух различных конформаций грамицидина, канальной (одноцепочечного димера) и не образующей канал (двухцепочечного димера) [146]. **С** - влияние грамицидина на толщину мембранного бислоя [147].

В модельных мембранах грамицидин формирует ионные каналы с проводимостью 10^7 ионов в секунду. Благодаря своим небольшим размерам грамицидин легко подвергается различным химическим заменам. Природная смесь грамицидина состоит в основном из грамицидина А (до 85%). Грамицидин А имеет в своем составе триптофаны в 9, 11, 13 и 15 позиции (рис. 20А). Имеет низкую растворимость в воде (5×10^{-7} М) [148].

Таким образом, грамицидин является удобной моделью для исследования конформационных изменений мембранных белков.

Конформация грамицидина сильно зависит от внешних условий. Существует два основных конформационных мотива: (1) Одноцепочечный димер (канальная форма) [149] (2) двуцепочечная спираль (не проводящая форма, неканальная) [150] (рис. 20Б). Стоит отметить, что двуцепочечная форма преобладает в органических растворителях [151]. Двуцепочечная форма имеет длинную и узкую пору, которая не способна пропускать ионы. В формировании функциональной поры участвуют N-концевые аминокислоты [152]. В мембране мономер грамицидина образует β -спирали. Два мономера формируют димер по принципу «голова к голове» [149]. Димер в мембране стабилизирован за счет водородных связей (15 внутримолекулярных водородных связей и шесть межмолекулярных). Размер поры составляет 4Å. Подобный размер позволяет прохождение катионов Cs^+ , Rb^+ , K^+ , Na^+ , Li^+ . При этом Ca^{2+} блокирует канал [153]. Длина димера составляет примерно 26Å. Кристаллическая структура получена для двухцепочечного димера. Для канальной формы получена структура в липидном окружении с использованием ЯМР [154]. По всей видимости, конформация грамицидина зависит от начального растворителя, в котором находится грамицидин перед включением в мембрану. Так, для таких растворителей как хлороформ/метанол, бензол/метанол или этанол после включения в мембрану грамицидин принимает неканальную конформацию (двуцепочечный димер). [155]. После обработки ультразвуком и инкубации при 65°C происходит переход в канальную конформацию. При растворении

грамицидина в трифторэтаноле происходит формирование канальной конформации без дополнительной обработки [156].

В мембране одноцепочечный $\beta^{6.3}$ спиральный димер образуют наиболее термодинамически стабильную конформацию [155]. Остатки триптофана расположены в области полярных голов мембранных липидов на границе с водной фазой (рис. 20Б). NH-группа триптофана способна формировать водородные связи. Наличие ароматического остатка дает возможность формировать π - π и полярные взаимодействия [157,158]. Амфипатический характер триптофана играет ключевую роль в образовании проводящего канала грамицидина.

Интересно, что в неканальной конформации триптофаны расположены вдоль оси мембраны, в области гидрофобных остатков, делая данную конформацию термодинамически не стабильной (рис 20Б). В аналоге грамицидина, в котором все триптофаны заменены на фенилаланины, которые более гидрофобные нежели триптофан, и не могут образовывать водородные связи, конформация двухцепочечного димера становится более термодинамически стабильной [159].

Грамицидин достаточно медленно образует функциональные поры при асимметричном добавлении к модельным мембранам. Наличие триптофанов на С-конце последовательности пептида предотвращает поворот грамицидина в липидном бислое. С-конец грамицидина ответственен за проведение ионов, N-концевой участок влияет на формирование трансмембранного канала. Димеры стабилизируются за счет гидрофобных связей на N-конце [160]. Замена или удаление аминокислот на N-конце приводит к нарушению формирования проводящего канала.

Гидрофобная толщина функционального димера грамицидина считается $\sim 22 \text{ \AA}$ [161]. Поскольку гидрофобная толщина грамицидина меньше, чем толщина мембраны [162], образование каналов грамицидина почти всегда ассоциируется с обратимой локальной мембранной деформацией, при этом

происходит утончение мембраны в местах образования димеров (рис. 20B) [163].

Сравнение устройства поры грамицидина с порой калиевого канала KcsA выявило, что в обоих случаях проведение ионов зависит от взаимодействия их с карбонильными группами в поре канала. При этом глицины, расположенные в селективном фильтре канала KcsA, выполняют роль D-аминокислот грамицидина [164–166].

Грамицидин является удобной моделью для определения конформационного поведения белков внутри мембраны. Хотя грамицидин отличается от калиевых каналов, но основные физические принципы взаимодействия белков каналов с липидами сохраняются. Переход грамицидина из функционального состояния в нефункциональное, связанный с белковыми перестройками внутри мембраны, также характерен для других ионных каналов [166].

Глава 2. Материалы и методы

Электрофорез в ПААГ

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) проводился согласно стандартной методике в 12.5 % разделяющем геле. При этом использовался прибор фирмы BioRad (США) для гелей 8x10 см.

Вестерн-блоттинг

Используемые растворы.

Буфер для переноса (TS): для приготовления 800 мл стока использовали 5.82 г Tris, 2.93 г Glycine, 7.75 мл 10 % SDS, но перед использованием добавляли 20 % метанола.

Буфер для отмывки: для приготовления 200 мл буфера использовали 200 мл 1xPBS, 100 мкл Tween20.

Буфер для блокирования: для приготовления 15 мл буфера использовали 15 мл отмывочного буфера с добавлением 0.3 г BSA.

Раствор первичных антител: для приготовления 6 мл буфера использовали 6 мл отмывочного буфера с добавлением 0.006 г BSA и 2 мкл антител к полигистидиновому тагу (Biorad).

Раствор вторичных антител: для приготовления 9 мл буфера использовали 6 мл отмывочного буфера с добавлением 0.009 г BSA и 3 мкл антител к первичным антителам (Biorad).

Процедура Вестерн-блоттинга.

1. Отрезали концентрирующий гель, ненужные участки геля;
2. Помещали гель в контейнер, заливали 50 мл буфера для переноса (TS), и инкубировали 15мин при комнатной температуре при перемешивании;
3. В это время готовили нитроцеллюлозную мембрану - вырезали кусочек (по размеру геля) и четыре таких же кусочка вырезали из ватмана (Whatman 3MM, Amersham);

4. Мембрану смачивали в течение 5 минут в 50 мл TS;
5. Ватман смачивали в 50 мл TS;
6. Приготавливали “сэндвич”: на трансблоттер помещались 2 листа ватмана один на другой, затем мембрана, гель, и сверху еще три листа ватмана, аккуратно прокатывали пипеткой, чтобы выгнать пузыри;
7. Перенос осуществляли в течение 30 минут, с силой тока $I=30$ мА на 1 см^2 геля;

После переноса:

8. Мембрану помещали в контейнер на 500 мл, инкубировали в 15 мл раствора для блокировки в течение 30 мин на шейкере при температуре 37°C ;
9. Мембрану промывали буфером для отмывки в течение 5 минут при температуре 37°C , повторяли процедуру три раза;
10. Затем к мембране добавляли раствор первичных антител и инкубировали мембрану в нем в течение 90 мин при комнатной температуре или ночь при $+4^\circ\text{C}$;
11. Мембрану промывали буфером для отмывки в течение 5 минут при температуре 37°C , повторяли процедуру три раза;
12. Затем к мембране добавляли раствор вторичных антител и инкубировали мембрану в нем в течение 60 мин при температуре 37°C ;
13. Мембрану промывали буфером для отмывки в течение 5 минут при температуре 37°C , повторяли процедуру три раза и один раз чистым раствором PBS;

Окраска мембраны:

14. Аккуратно подсушивали нитроцеллюлозную мембрану;
15. Окраску мембраны осуществляли набором для флуоресцентной детекции ECL+. Для окраски использовали следующий раствор: 3 мл раствора А и 50 мкл раствора В. Полученную смесь равномерно наносили на сухую нитроцеллюлозную мембрану. Инкубировали в течение 5 мин при температуре 37°C ; подсушивали мембрану для последующего сканирования;

16. Сканирование осуществляли на приборе Turphoon 9400 (GE Healthcare). При сканировании использовали стандартные настройки для ECL+.

Молекулярное клонирование

Последовательность нуклеотидов, кодирующих мутантные белки каналов, получали методом ПЦР из последовательности полноразмерного канала HEAG2. Для получения мутаций с делецией первых 24 аминокислот использовали следующие праймеры:

1. Прямой праймер; 5' gсaccAAGCTTatggaatcaagtttctactg 3' длина 32. Mw 9767 г/моль. Сайт действия рестриктазы: Hinc3
2. Обратный праймер; 5' gcccTCTAGAttaagcaggagссacc 3' длина 26. Mw 7900 г/моль. Сайт действия рестриктазы: Xba1.

Для получения мутаций с делецией первых 134 аминокислот использовали следующие праймеры:

1. Прямой праймер; 5' gсaccAAGCTTatgaaacagссaatagag 3' длина 29. Mw 8885 г/моль. Сайт действия рестриктазы: Hinc3
2. Обратный праймер; 5' gcccTCTAGAttaagcaggagссacc 3' длина 26. Mw 7900 г/моль. Сайт действия рестриктазы: Xba1.

Для переклонирования полноразмерного канала из вектора рMT3 в вектор рсDNATM6/V5-His использовали следующие праймеры:

1. Прямой праймер; 5' ctgсааGAATTCсaccatgсс3' длина 21. Mw 6315 г/моль. Сайт действия рестриктазы: EcoR1
2. Обратный праймер; 5' gcccTCTAGAttaagcaggagссacc 3' длина 26. Mw 6315 г/моль. Сайт действия рестриктазы: Xba1.

Праймеры были синтезированы в ЗАО «Евроген». Процедуру ПЦР проводили на приборе фирмы BioRad IQ5.

Реакционная смесь содержала следующие компоненты:

10x HF Buffer с MgSO₄ (Fermentas), 0.125 mM dNTP (Fermentas), 10 pM Прямого праймера, 10 pM Обратного праймера, ДНК последовательность канала HEAG 0.1нг, HF mix Полимераза (Fermentas).

Температура и продолжительность каждой стадии амплификации была установлена следующим образом: предварительное расплавление в течение 5 минут при 95°C; 25 циклов, включающих этапы: денатурация при 95°C в течение 15 секунд, отжиг праймеров 65°C 30 секунд, элонгация при 72°C в течение 3 минут; окончание процесса амплификации - 4°C до момента изъятия реакционной смеси. Реакционную смесь анализировали методом электрофореза в 1 % агарозном геле.

Экстракция ПЦР-фрагмента из геля

Для экстракции ПЦР-фрагмента использовался QIAEX Gel Extraction Kit. Предварительно необходимый участок геля, содержащий ПЦР-фрагменты, вырезали при помощи скальпеля. Гель подвергали растворению в QG буфере (500 мкл), при 50°C, раствор охлаждали до комнатной температуры. Далее раствор наносили на специальную колонку и промывали QG буфером (два раза по 500 мкл). Повторно промывали PE буфером с добавлением спирта. Тщательно сушили колонку на центрифуге. Элюцию производили водой (nuclear Free, Fermentas) 25мкл. Результат проверяли при помощи 1 % агарозного геля-электрофореза. Раствор с ПЦР фрагментом хранили при +4°C.

Рестрикция ПЦР-фрагмента

Состав реакционной смеси: 3 мкл буферного раствора (10x FD Buffer Green, Fermentas), раствор с ПЦР фрагментом - 25 мкл, FD фермент Hind3 (Fermentas) - 1 мкл, FD фермент Xba1 (Fermentas) - 1 мкл. Конечный объем смеси - 30 мкл.

Рестрикция плазмидного вектора pcDNATM6/V5-His A (Invitrogen):

Состав реакционной смеси: 1 мкл буферного раствора (10x FD Buffer Green, Fermentas), раствор с плазмидой pcDNATM6/V5-His A 7 мкл, FD фермент Hind3 (Fermentas) 1 мкл, FD фермент Xba1 (Fermentas) 1 мкл. Конечный объем смеси 10 мкл.

Смесь готовили при комнатной температуре, готовую смесь тщательно перемешивали. Непосредственно рестрикцию проводили при 37°C в течение 60 минут, для поддержания температуры использовали прибор Thermomixer (Eppendorf). Далее производили инактивацию рестриктаз при 80°C 10 минут. Результат проверяли при помощи 1% агарозного гель-электрофореза.

Лигирование, создание векторов

Лигазная смесь содержала следующие компоненты: линейный вектор pcDNATM6/V5-His A 10 мкл, ПЦР фрагмент 20 мкл, 10x T4 DNA buffer (Fermentas) 3 мкл, T4 DNA ligase (Fermentas) 1 мкл. Лигазную смесь тщательно перемешивали и инкубировали при 22°C 1 час и далее 16 часов на +4°C, для поддержания температуры использовали прибор BioRad IQ5. Полученную смесь использовали для трансформации клеток.

Химическая трансформация клеток, наработка и выделение плазмиды

Для трансформации 50 мкл суспензии компетентных клеток (*E.coli XL 10 Gold*) инкубировали с 10 мкл лигазной смеси при 37°C, 40 минут. Далее производили тепловой шок, 90 секунд 42°C, охлаждали на льду 2 минуты. Переносили клетки в 200 мкл LB, инкубировали 30 минут при 37°C и переносили на чашки с твердым агаром LB, содержащим 50 мкг/мл ампициллина. Чашки помещали в инкубатор при 37°C, на ночь.

Полученные клоны проверяли на наличие плазмиды с нужной вставкой методом ПЦР. Клоны ресуспендировали в 10 мкл H₂O (nuclear Free, Fermentas). Из полученной суспензии отбирали 5 мкл и добавляли к ПЦР смеси, содержащей 2 мкл 10x ПЦР буфера с MgSO₄ (Евроген), 0.125 мМ

dNTP (Fermentas), 10 pM прямого праймера, 10 pM обратного праймера, 1 единицу Taq Полимеразы (Евроген).

Образцы, для которых ПЦР реакция дала положительный результат, переносили в 2 мл LB с ампициллином, клетки инкубировали 4 часа при 37°C. Из полученной культуры выделяли плазмидную ДНК.

Для выделения плазмидной ДНК использовали PureLink™ HQ Mini Plasmid Purification Kit. Выделение плазмиды производили по следующему протоколу:

Суспензию трансфицированных клеток центрифугировали при 4000 g в течение 10 минут, к получившемуся осадку добавляли 250 мкл раствора для ресуспендирования. Аккуратно растворяли клеточный осадок. После лизирования клеток к полученному раствору добавляли 250 мкл буфера для растворения, перемешивали в течение 5 минут. После этого добавляли 350 мкл раствора для нейтрализации, перемешивали, центрифугировали при максимальных оборотах 5 минут.

Полученный супернатант наносили на колонку, центрифугировали 1 минуту. Промывку колонки осуществляли при помощи 500 мкл буфера для промывки и центрифугирования в течение 1 минуты. Данную процедуру повторяли 2 раза. После промывки колонку сушили путем центрифугирования в течение 1 минуты. Сорбированную плазмидную ДНК смывали 50 мкл водой (nuclear Free, Fermentas). Полученные плазмиды со вставками нуклеотидной последовательности каналов секвенировали в ЗАО «Евроген».

Культивирование эукариотических клеток cos-1

Мутантные формы канала с делециями: N-САР участка (2-24 а.к.), PAS домена (25-134 а.к.) и всего N-концевого участка (2-134 а.к.) получали методом ПЦР. Все формы были клонированы в вектор pcDNA6v5his. Полученные векторы были проверены секвенированием на правильность нуклеотидной последовательности. В составе экспрессионного вектора

содержится промотор цитомегаловируса (CMV), точка начала репликации вируса SV40 и участок полиаденилирования, стоп-кодон расположен непосредственно после аффинного 1D4-тага. В качестве экспрессионной системы использовали эукариотические клетки линии COS-1. Для получения транзientной трансфекции клеток использовали методы электропорации (в соответствии с протоколом к прибору BioRad Gene Pulser Xcell), эффективность электропорации составила приблизительно 40-60 %, либо трансфецирующий агент Fugene 6 Transfection Reagent (Promega) эффективность данного метода доходила до 80 %. Электропорацией клетки трансфецировали для выделения и дальнейшей очистки белка, Fugene 6 использовали для конфокальной микроскопии и электрофизиологических исследований.

Экспрессию производили в CO₂-инкубаторе с 5 % содержанием CO₂ при температуре 37°C. Оптимальное время экспрессии белков каналов составило 48 часов. В результате были получены клетки COS-1, экспрессирующие различные варианты каналов.

Временная трансфекция эукариотических клеточных линий с помощью электропорации.

Подготовка клеток к электропорации.

За сутки до электропорации клетки пересаживали в чистые чашки Петри со свежей средой таким образом, чтобы к моменту электропорации клетки покрывали 50-70 % предоставленной площади. Плотность клеток должна составлять $2 \cdot 10^6$. Подсчет клеток производили при помощи камеры Горяева.

Перед электропорацией отбирали среду и промывали клетки стерильным фосфатно-солевым буфером. После отмывки PBS добавляли 0.5 мл раствора (0.05 % трипсин, 53 мМ EDTA, растворенные в PBS) и инкубировали от 2 до 5 минут при комнатной температуре. Клетки отделяли от поверхности культуральной чашки, нейтрализовали действие трипсина

добавлением 10 мл среды с сывороткой, полученную взвесь помещали в 15 мл центрифужные пробирки и центрифугировали (800 rpm, 5 минут). После центрифугирования супернатант сливали, к клеточному осадку добавляли необходимое количество буфера до получения концентрации клеток $5 \cdot 10^6$, тщательно ресуспендировали осадок.

Электропорация клеток

Для электропорации использовали прибор Gene Pulser Xcell™ Total System (Biorad). Использовали встроенный протокол для эукариотических клеток Mammalian Pre-set Protocol, Mammalian 7 (прямоугольный импульс, 20 мсек, 110 В). Во время электропорации использовали 0,2 см кюветы фирмы Biorad (Gene Pulser®/MicroPulser™).

Процедуру электропорации проводили следующий образом: 200 мкл суспензии клеток с добавленной 2 мкг плазмидной ДНК помещали в кювету, аккуратно перемешивали, после этого помещали кювету в ячейку, закрывали крышечкой отсек и включали импульс. После импульса быстро добавляли в кювету 1 мл свежей среды, тщательно перемешивали, после чего переносили клетки на культуральные чашки со средой с добавлением сыворотки. Культивировали клетки в CO₂ инкубаторе в течение суток.

Сбор клеток

Отбирали среду из культуральных чашек. Отделяли клетки от поверхности чашек с помощью 0.05 % раствора трипсина в PBS. Полученную суспензию с 10 культуральных чашек переносили в 15 мл пробирку и центрифугировали при 800 rpm в течение 5 минут. Супернатант сливали, клеточный осадок замораживали при -80°C с добавлением криопротектора (10 % глицерина).

Временная трансфекция эукариотических клеточных линий для микроскопических исследований.

За сутки до трансфекции клетки рассаживали на культуральные чашки диаметром 35 мм. Предварительно в чашки помещали стерильное покрывное

стекло диаметром 12 мм, толщиной 0,13-0,16 мм Концентрация клеток составляла $0,1 \cdot 10^6$ клеток в миллилитре. На следующий день при достижении конfluence 40 % производили трансформацию клеток с использованием реагента Fugene6-Transfection-reagent (Promega). Процедуру производили в соответствии с рекомендациями производителя. В чистой среде DMEM разводили 7 мкл Fugene6-реагента, инкубировали 5 минут при комнатной температуре. В получившийся раствор добавляли 2 мг плазмидной ДНК (соотношение 0,3 мкл реагента : 100 нг плазмидной ДНК); конечный объем смеси составлял 100 мкл. Полученную смесь инкубировали 30 минут при комнатной температуре, добавляли к клеткам со свежей средой. Клетки растили 48 часов. После этого производили процедуру иммуноокрашивания.

Окраска клеток для конфокальной микроскопии.

Для определения локализации канала в клетках после трансфекции был проведен ряд исследований с использованием конфокальной микроскопии. Клетки фиксировали 4 % параформальдегидом и пермеабелизовали мембраны 0,25 % раствором Triton X100 в PBS. Для уменьшения неспецифического взаимодействия антител с белками и структурами фиксированной клетки, перед окрашиванием антителами клетки обрабатывали 1% раствором БСА с добавлением глицина и инкубировали 30 мин. Окрашивание производили первичными антителами мыши к аффинному тагу 1D4, расположенному на С-конце канала, вторичные антитела были мечены красителем AlexaFluor 488 (Abcam). Ядра были окрашены красителем DAPI. При сканировании использовали 60-кратное увеличение, разрешение на ПЗС матрице 1024*1024 точек. Для возбуждения сигнала от красителя DAPI использовали лазер с длиной волны 405 нм, сигнал фиксировали в канале 410 – 538 нм. Для возбуждения красителя AlexaFluor 488 использовали лазер с длиной волны 488 нм и фиксировали флюоресценцию в интервале 504 – 572 нм. Для предотвращения пересечения

сигналов от разных флуоресцентных меток использовали разные лазеры последовательно. Окраску актинового цитоскелета осуществляли с использованием реагента Alexa Fluor 546-фаллоидин (Life technologies) в течение 10 минут.

Конфокальная микроскопия.

Конфокальную микроскопию производили с использованием микроскопов LSM710-confocor3 (Zeiss) и Confocal A1RSi (Nikon) с использованием объективов alpha Plan-Apochromat 63x/1.46 Oil Korr M27 и SR Apo 100 × 1.49 N.A (N.A. – числовая апертура), соответственно. Полученные изображения обрабатывали с использованием программ Image J и ZEN [167].

Электрофизиологические исследования.

Для проведения электрофизиологических исследований использовали клетки почки африканской зеленой мартышки линии COS-7. Клетки культивировали как описано выше для клеточной линии COS-1. При достижении конfluence 50-60 % осуществляли трансфекцию с использованием трансфецирующего реагента Fugene-6 в соответствии со стандартным протоколом. На одну культуральную чашку диаметром 35 мм использовали 4 мкг плазмидной ДНК и 12 мкл реагента. В зависимости от эксперимента в качестве плазмидной ДНК для ко-трансфекции использовались различные плазмиды в следующих соотношениях:

1. 3,6 мкг pMT3-плазмиды, кодирующей разные варианты канала Kv10.2 и 0,4 мкг pEGFP;
2. 2 мкг pMT3-плазмиды, кодирующей дикий тип Kv10.2 и 2 мкг pIRES2-EGFP плазмиды, кодирующей S4-S5L пептид;
3. 2 мкг pCDNA6-плазмиды, кодирующей разные варианты канала Kv10.2 и 2 мкг pIRES2-EGFP-плазмиды кодирующей пептид, соответствующий N-Cap.

Электрофизиологические исследования производили через день после трансфекции. Во время измерения клетки находились в растворе Тироде (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 0.2 mM Na₂HPO₄, 12 mM NaHCO₃, 5.5 mM D-глюкоза) при температуре 22°C. Установка состояла из инвертированного светового микроскопа; стимуляцию и запись результатов производили с использованием прибора Axon pClamp 10 с аналоговым преобразователем (Digidata 1440A) с использованием Axopatch 200B. Пипетки для пэтч-клампа имели сопротивление 2-3 МОм, их вытягивали из капилляра из натриево-известкового стекла (Kimble-Chase). Кривые активации были получены из хвостовых токов и аппроксимированы при помощи уравнения Больцмана.

Очистка рекомбинантного белка Kv10.2 ΔPAS.

Для очистки использовали цианогенбромид-активированную агарозу (Sigma) с ковалентно-прикрепленными к ней антителами против 1D4 аффинного тага (Миннеаполис, США).

Приготовление аффинной колонки было произведено, как описано в [168]. Растворяли лиофилизированные антитела в 0,5 М фосфате натрия до концентрации 10 мг/мл. Промывали цианогенбромид-активированную агарозу холодным 1 mM HCl 30 мин. Промывали смолу дистиллированной водой 5-10 объемов, затем промывали связывающим буфером (0,1 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl), к смоле добавляли раствор 1D4 антител в соотношении один к одному объему колонки. Инкубировали с раствором антител при комнатной температуре и постоянном покачивании в течение двух часов. Промывали колонку буфером для связывания в течение 15 минут. Для блокировки непрореагировавших групп инкубировали колонку в 1 M этанолаmine в течение 2 часов при комнатной температуре. Промывали одним объемом буфера для связывания и одним объемом 0,1 M ацетатного буфера. Повторяли последний пункт 3-4 раза.

Экспрессированный белок канала Kv10.2 очищали в соответствии со следующим протоколом:

Буфер для растворения клеток содержал 40 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 20 мМ Hepes, 2,5 % CHAPS. Во все буферы были добавлены ингибиторы протеаз (Roche), все действия производили на ледяной бане или при +4°C. Для растворения клеток с чашки диаметром 10 см при 90 % оптического покрытия использовали 1 мл буфера для растворения. Для более полного лизирования клеток и максимального выхода мембранных белков в раствор, клетки снимали с чашек и помещали в 15 мл пробирку, инкубировали при постоянном покачивании 12 часов. Для осаждения клеточного дебриса центрифугировали полученный раствор при 12000 оборотах в минуту, 10 мин. Супернатант отбирали в чистую пробирку. К супернатанту добавляли предварительно уравновешенную буфером для растворения смолу с антителами к 1D4 аффинному тагу. Для уменьшения неспецифического взаимодействия добавляли 10 мкл 5 М NaCl и 55,6 мкл 90 % глицерина на один миллилитр супернатанта.

Связывание белка канала производили при постоянном помешивании в течение 2-х часов. Для связывания использовали 1% смолы от общего объема лизата. После смесь помещали в колонки Micro Bio-Spin Chromatography Column (Bio-Rad). Промывали колонку 30 объемами высокосолевого буфера для снятия неспецифически-связанных белков. Высокосолевой буфер для промывки содержал 40 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 20 мМ Hepes, 333 мМ NaCl, 0,7 % CHAPS. Для элюции использовали раствор 1D4-пептида (Миннеаполис, США) 0,5 мг/мл, растворенного в высокосолеваем буфере для промывки. Объем элюции составлял от 1 до 0,3 объемов колонки. Производили инкубацию с элюирующим раствором в течение 0,5-1 часа, при небольшом покачивании. На всех этапах отбирали пробы для ПААГ электрофореза и дальнейшего проведения процедуры иммуноблоттинга.

Приготовление образцов для электронной микроскопии.

Приготовление сеток

Для гидрофилизации медные сетки, покрытые углеродной подложкой (Ted Pella, США) помещали в аппарат Emitech K100X (Великобритания), обрабатывали в режиме тлеющего разряда электрическим током с силой тока 20 мА в течение 45 сек.

Нанесение образца на сетки

1. Свежеприготовленный раствор белка калиевого канала в количестве 3 мкл наносили на обработанную сетку, выдерживали в течение 30 сек при комнатной температуре. Избыток раствора удаляли с помощью фильтровальной бумаги.

2. Сетки промывали два раза на каплях (40 мкл) по 30 сек. Избыток раствора удаляли с помощью фильтровальной бумаги.

3. Негативную окраску осуществляли 1 % водным раствором уранилацетата. Для этого сетку клали стороной с белком на каплю раствора (40 мкл) и выдерживали в течении 30 сек. Избыток раствора удаляли с помощью фильтровальной бумаги.

4. Сетки промывали два раза на каплях (40 мкл) буферного раствора по 30 сек. Избыток раствора удаляли с помощью фильтровальной бумаги.

5. Готовые сетки высушивали на воздухе и хранили в пластиковом контейнере.

Электронная микроскопия.

Исследование полученных образцов производилось на просвечивающем электронном микроскопе JEOL-2100 (JEOL) с цифровой фотокамерой GATAN ES500W, работающей под управлением программы Digital Micrograph (GATAN) на базе Межфакультетской лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Использовалось ускоряющее напряжение 200 кВ. Изображения были получены с увеличением 40 000х и дефокусом 1,4 – 1,9 мкм.

Отдельные изображения каналов отбирали с использованием программы BOXER [169]. Для отбора отдельных изображений использовали квадрат с размером 64×64 пикселей. Размер пикселя был $2,9 \text{ \AA}$. Всего было отобрано 4000 изображений отдельных каналов. Реконструкцию электронной плотности производили с при помощи программного пакета Eman2 [169].

Для реконструкции применяли следующую последовательность операций:

1. Изображение отфильтровывали от шумов и нормализовали, а затем выравнивали
2. Выровненные изображения были подвергнуты многомерному статистическому анализу без использования референса (reference-free).
3. Обработанные с помощью МСА изображения были разбиты на классы. В один класс входят изображения каналов, находящихся в одной ориентации. Их суммирование приводит к увеличению отношения сигнал/шум.
4. Классы лучшего качества, включающие большее количество изображений, использовались далее в качестве образцов для мульти-рефересного анализа (MPA).
5. Используя угловую реконструкцию, определили ориентации финальных усредненных классов.
6. Используя алгоритм обратного проецирования, рассчитывали первоначальные 3D структуры каналов.
7. Были получены проекции начальной трехмерной структуры (обратные проекции). Обратные проекции были использованы в качестве референсных для лучшего выравнивания частиц.
8. Для расчета окончательной структуры использовалась $C4$ симметрия.

Визуализация и измерение полученных трехмерных структур проводилось с помощью программы UCSF Chimera [170].

Фиттинг кристаллических структур в электронные плотности макромолекул проводили автоматически и вручную с помощью программы UCSF Chimera [170].

Криоэлектронная микроскопия липосом.

Для приготовления липосом использовали смесь холестерина из яичного желтка, 10 мг холестерина растворяли в 100 мкл содержащих 10 мкг грамицидина А, либо 10 мкг мутантного грамицидина А, либо обоих пептидов. Полученные липосомы замораживали в жидком этане с использованием установки Vitrobot Mark IV (FEI, Netherlands). Микрографии получали с использованием криоэлектронного микроскопа FEI Tecnai G2 Spirit TEM, 120 кВ ускоряющее напряжение, с увеличением 26000х, с ПЗС камерой Eagle с размером матрицы 4Кх4К пиксела. Съемку осуществляли в режиме малой дозы электронов, с дефокусом 2,5-3,5 мкм. Полученные микрографии обрабатывали в программе BOXER [169]. Небольшие участки липосом, размером 90×90 пикселей (размер пикселя 5,3Å), вырезали и использовали для дальнейшего анализа при помощи программы IMAGIC [171]. Изображение фильтровали и выравнивали относительно референсного изображения, окончательные классы получали после четырех итераций выравнивания. В качестве референсного изображения использовали прямоугольник с размерами, соответствующими участку мембраны.

Для оценки толщины получившихся усредненных изображений мембран строили профили интенсивности сигнала в программе ImageJ [167]. Для каждого профиля была рассчитана ширина сигнала на полувысоте.

Трехмерную реконструкцию кластеров, образованных мутантным грамицидином А, производили в программе IMAGIC [171]. Для построения реконструкции использовали C4-, C5- и C6-симметрию. Наименьшую ошибку реконструкция имела при симметрии C5. Фитинг молекулярной модели кластера в электронную плотность проводили вручную с помощью программы UCSF Chimera [170].

Глава 3. Результаты и обсуждение

Кластеризация мутантного грамицидина в модельных липосомах.

В первой части работы была получена структура кластера, образованного в липосомах мутантным грамицидином А с заменой аргинина на лизин в положении 3: [Lys3]gA1. Для данного мутанта была показана anomalous поведение при введении в состав модельных липосом (рис. 21).

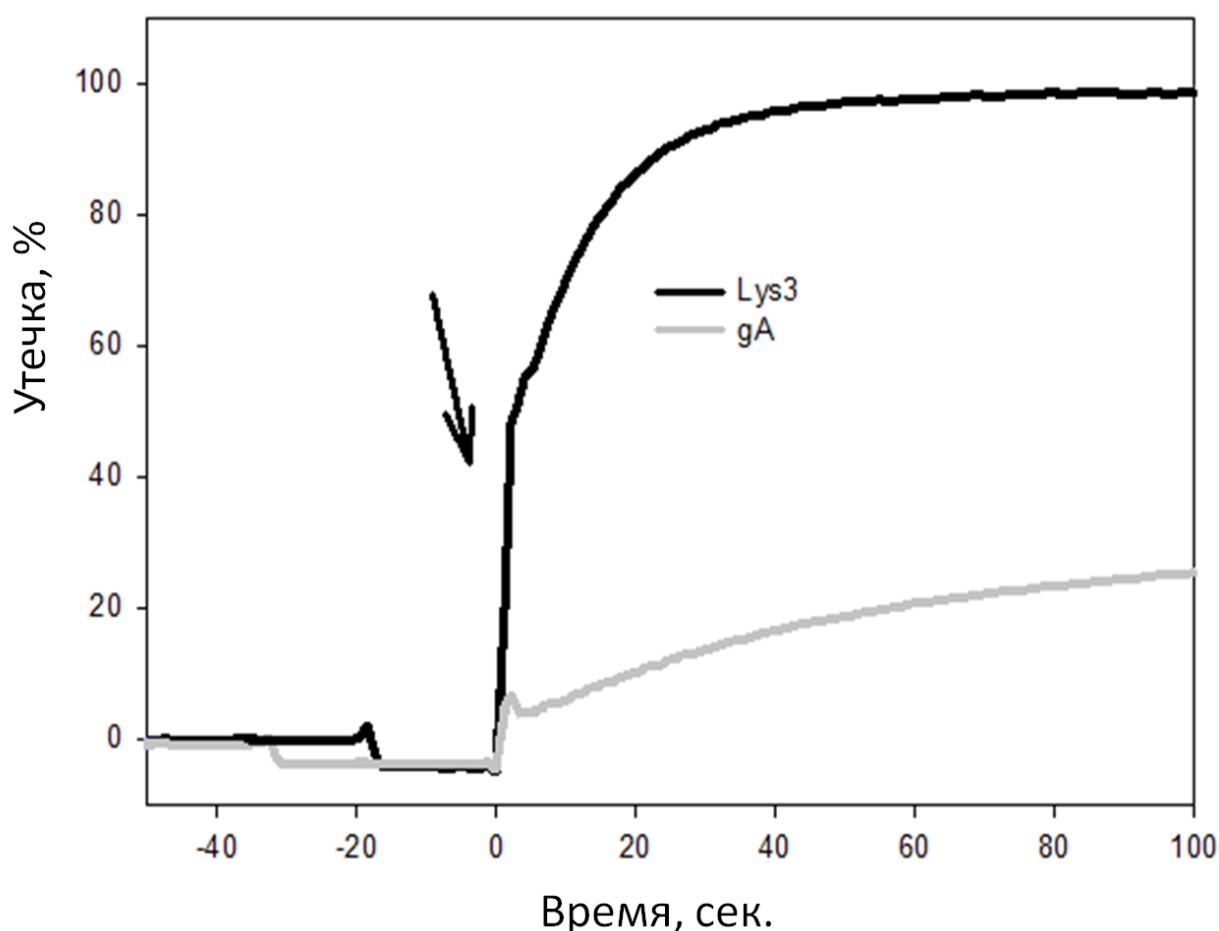


Рисунок 21 Утечка карбоксифлюоресцина из липосом после добавления различных пептидов (момент добавления пептида отмечено стрелкой), gA – грамицидин А, Lys3 – мутантный грамицидин А [172].

В отличие от нативного грамицидина, который имеет селективность только для одновалентных катионов [145], модификация липосом мутантным

¹ Работы проводились в сотрудничестве с д.б.н. Ю.Н. Антоненко, МГУ

белком приводила к выходу высокомолекулярных красок, таких как карбоксифлуоресцеин (CF) (рис. 21) сульфородамин В (SRB) и декстран с молекулярной массой 3кДа. В качестве модельной мембраны использовали липосомы, состоящие из смеси фосфотидилхолина яичного желтка (EggPC).

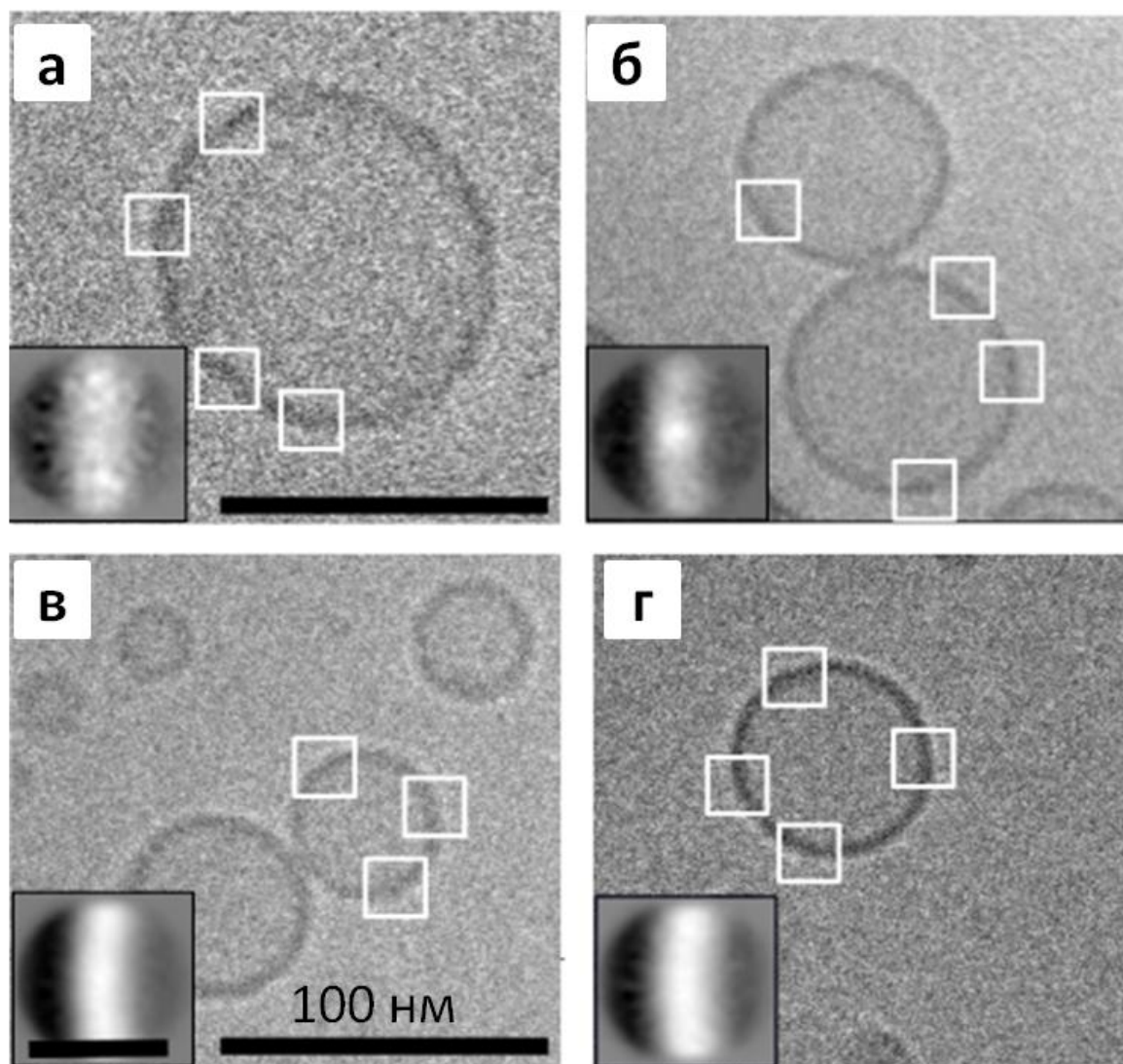


Рисунок 22 Микрографии липосом, полученных при помощи криоэлектронной микроскопии. а - липосомы без пептида, б- липосомы с мутантным грамицидином А ([Lys3]gA) в - липосомы с грамицидином А дикого типа; г - смесь мутантного грамицидина и грамицидина дикого типа. Белыми квадратами показаны примеры участков, использованных для дальнейшей обработки. В нижнем левом углу каждого изображения представлены классовые суммы, полученные при выравнивании отдельных участков. Длина масштабного отрезка 100нм [172].

Микрофотографии липосом со встроенными пептидами были получены с использованием криоэлектронной микроскопии (рис. 22). Вырезанные в

программе BOXER изображения небольших участков билипидного слоя липосомы выравнивали относительно единого референсного изображения и классифицировали.

Выровненные изображения пустых липидных мембран и мембран с различными видами грамицидина А сравнивали между собой. В результате оказалось, что грамицидин А дикого типа распределен в мембране равномерно, а мутантный грамицидин А образует кластеры (рис. 23, в). Наличие в одной липосоме смеси мутантного грамицидина А и грамицидина А дикого типа, приводит к отсутствию кластеризации (рис. 23, г). Данный результат хорошо виден при оценке профиля интенсивности электронной плотности в выровненных участках липосом (красные графики на рис. 23).

Путем вычитания электронной плотности пустых липосом из электронной плотности липосом с добавлением различных вариантов грамицидина А (рис. 23) удалось увеличить соотношение сигнал\шум и получить изображения отдельных кластеров мутантного грамицидина А, а так же определить их размеры. Размер кластеров составил порядка 4 нм.

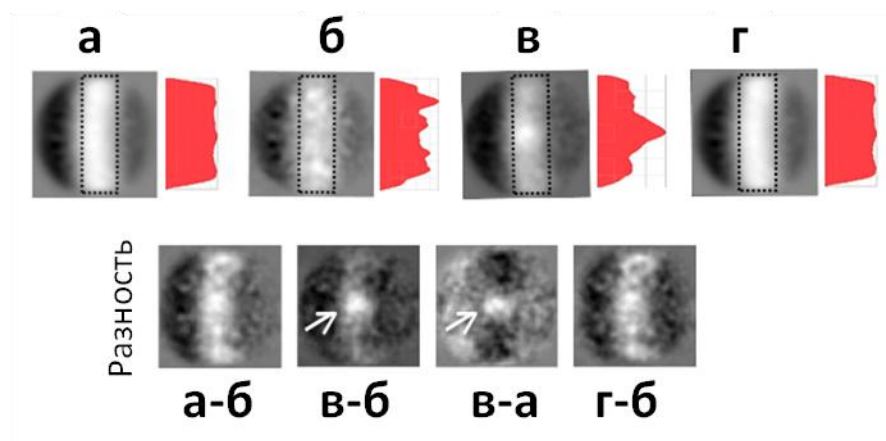


Рисунок 23. Сравнение классовых сумм участков мембран, содержащих грамицидин А: а – не мутантный; б - контрольные липосомы без грамицидина; в - с мутацией [Lys3]gA; г - смесь мутантного и не мутантного грамицидина А; Справа - графики распределения интенсивности сигнала внутри прямоугольника, содержащего мембрану. Нижний ряд: разностные изображения. Стрелка указывает на кластер грамицидинов [172].

Интересно отметить, что включение мутантного грамицидина А в липосомы приводило к уменьшению толщины липидного бислоя липосомы на 20% (с 5,3 нм до 4,5 нм). Для грамицидина дикого типа и смеси мутантного и грамицидина дикого типа наблюдалось несколько меньшее уменьшение, 10% от толщины липидного бислоя (рис. 24). Подобные изменения характерны для липидных мембран с интеркалированными в них белками [173]. Это также свидетельствует в пользу кластеризации мутантного грамицидина в мембране. Липиды могут упорядочиваться вокруг кластеров за счет гидрофобных взаимодействий.

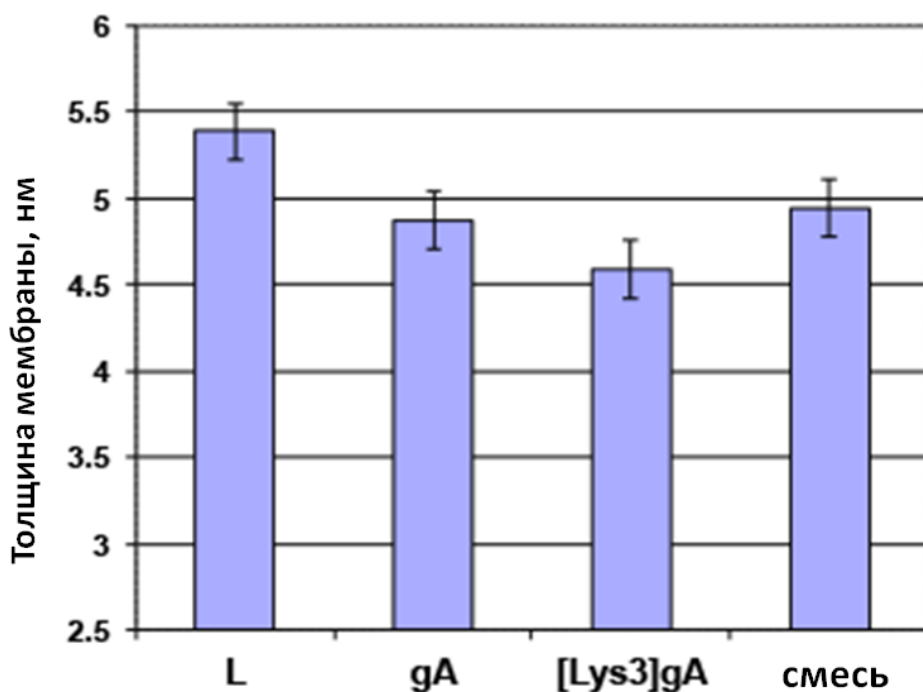


Рисунок 24 Толщина липидного бислоя для липосом с разными вариантами пептидов грамицидина А и без него [172].

Для выявления структурных особенностей, полученные изображения кластеров подвергли структурному анализу. При расчете трехмерных реконструкций для кластера с разным типом симметрии, наименьшая ошибка была получена для структур с C_5 симметрией (рис. 25). Это свидетельствует о том, что мутантный грамицидин А с заменой аланина на лизин в третьем положении образует пентамерные структуры в липидном бислое. В середине кластера при таком типе симметрии образуется неселективная пора

диаметром более 16 Å. Диаметр поры достаточен для выхода из липосом, содержащих мутантный грамицидин А, высокомолекулярных красок. Диаметр карбоксифлуоресцеина - 0,7 Å, сульфородамина В – 16 Å [174].

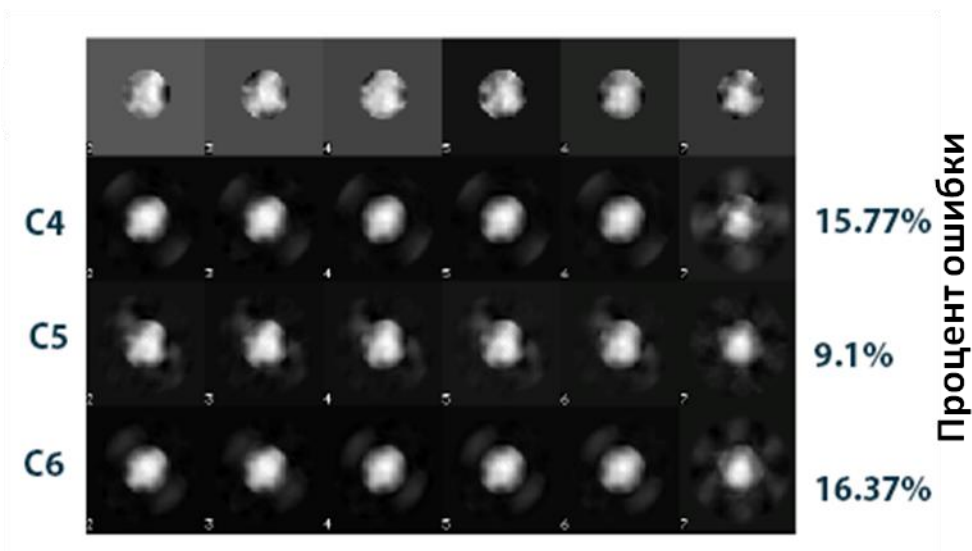


Рисунок 25 Определение оптимальной симметрии на основе рассчитанной ошибки полученных реконструкций кластеров грамицидина А [172].

С использованием молекулярного моделирования была создана структура пентаметра с неселективной порой, состоящего из антипараллельных правозакрученных двухцепочечных димеров (рис. 26). Фиттинг этой модели в полученную нами электронную плотность показал хорошую корреляцию. Моделирование показало, что олигомерные структуры стабилизированы взаимодействиями триптофанов в 13 и 15 положении одного пептида с лизином в положении 3 соседнего пептида за счет катионного π -взаимодействия индолового остатка триптофана и протонированного $-NH_2$ остатка лизина. При этом добавление грамицидина А дикого типа приводит к нарушению этих взаимодействий и ингибированию олигомеризации.

Так как канал дикого типа представляет собой димер, всего в состав пентамера должно входить 10 пептидов грамицидина.

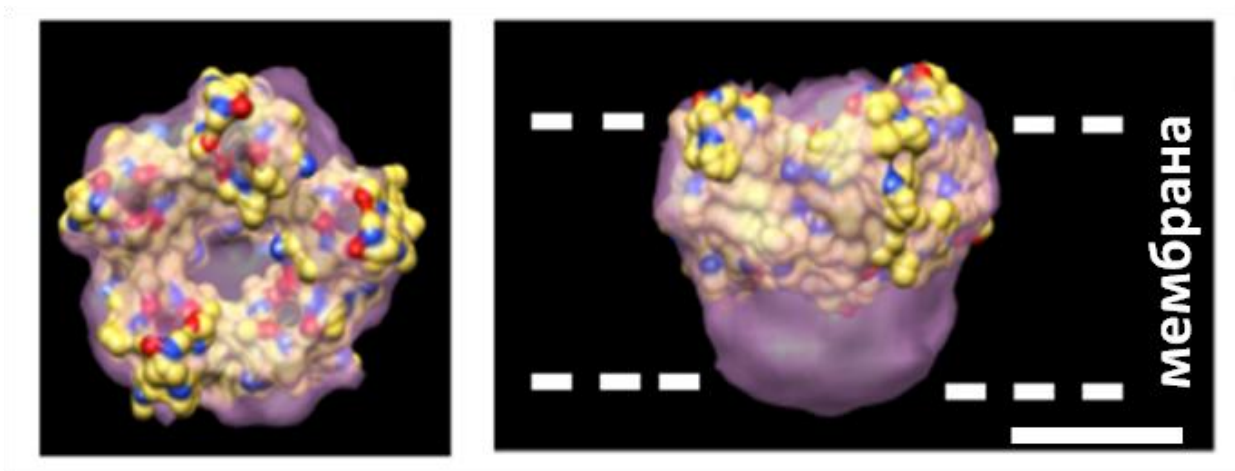


Рисунок 26. Реконструкция электронной плотности кластера мутантных грамицидинов А с использованием симметрии C_5 и фиттингом моделированной пентамерной структуры олигомерного комплекса [172]. Слева – вид сверху; справа – вид сбоку. Положение мембраны отмечено пунктирной линией. Масштабный отрезок - 2нм

Таким образом, в первой части работы была показана возможность образования белковых кластеров мутантным грамицидином А в модельных липидных мембранах с образованием олигомерных структур с C_5 симметрией за счет катионных π -взаимодействий.

Клонирование ДНК каналов Kv10.2 с удаленными N-концевыми доменами.

Для получения мутантных потенциал-зависимых каналов была использована конструкция полноразмерного канала Kv10.2 с аффинным 1D4-тагом на С-конце (рис. 27).



Рисунок 27. Схематичное представление полученных конструкций мутантных каналов Kv10.2

Результаты солюбилизации каналов в детергенте приведены на рис. 28. В ходе экспериментов удалось экспрессировать все виды мутантных каналов.

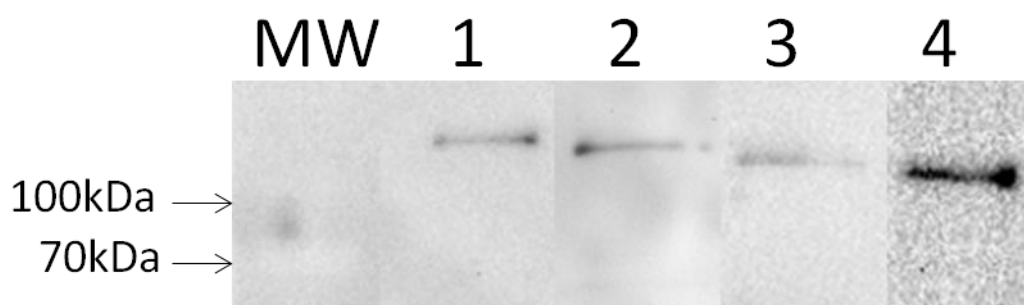


Рисунок 28. Анализ методом иммуноблотинга образцов, полученных в ходе трансфекции клеток COS-1 вектором, содержащим последовательность различных форм канала Kv10.2 с 1D4 тагом. (MW) – маркер молекулярных масс; иммуноокрашивание клеточного лизата клеток, экспрессирующих (1) полноразмерную форму канала, (2) транскрированную форму канала $\Delta 2-24$ (3) транскрированную форму канала ΔPAS ($\Delta 24-134$) (4) транскрированную форму канала $\Delta 2-134$.

Влияние N-концевого домена на электрофизиологические характеристики и транспорта каналов Kv10.2 к поверхности клетки.

Внемембранные домены потенциал-зависимых калиевых каналов играют огромную роль в функционировании каналов, и, зачастую,

определяют специфические характеристики конкретных семейств каналов [40]. В данной работе было исследовано влияние N-концевых доменов на функционирование каналов Kv10.2.

Для определения активности каналов использовали метод локальной фиксации потенциала (пэтч-кламп). В нашем исследовании использовалось полноклеточное измерение (whole cell) токов. Преимущество этого метода измерения перед другими способами измерения заключается в том, что данная методика позволяет сохранять клеточное окружение каналов и структуры клетки, при этом дает возможность эффективно контролировать разность потенциалов на мембране. При этом токи фиксируются от всех каналов клетки суммарно [175].

В ходе электрофизиологических исследований² было показано, что внесение аффинного тага на С-конец экспрессионной конструкции не влияет на работу полноразмерного канала Kv10.2, и его активность соответствует активности канала дикого типа [176], сохраняются основные показатели, время активации и деактивации, амплитуда ответа и потенциал при котором происходит открытие канала (рис. 29).

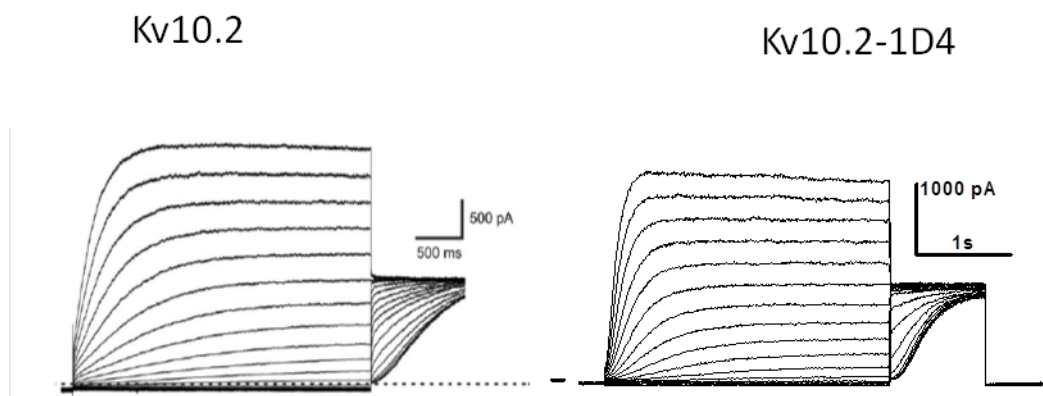


Рисунок 29. Вольтамперные характеристики канала Kv10.2 дикого типа (слева, из Yang et al, 2013) и полноразмерного канала Kv10.2 с 1D4 тагом на С-конце (справа).

Как показано в литературе [17,40,177,178], у канала Kv11 (HERG) человека с отсутствующим N-Сар или с транкированным EAG-доменом (N-Сар + PAS), экспрессированного в ооцитах *Xenopus*, наблюдались

² Электрофизиологические эксперименты проводили в сотрудничестве с др. Ж.Лоссарном и О.Малак, CNRS

устойчивые токи. При этом скорость деактивации канала была выше в пять раз и как следствие при экспрессии в клетках млекопитающих каналов с удаленным EAG домена не нарушался транспорт каналов к мембране клетки, [179,180].

При этом, для канала Kv10.1, родственного изучаемому нами каналу Kv10.2, полное удаление N-концевого участка (hEag1 Δ 2-190) сохраняет его функции, но происходит сильное изменение электрофизиологического профиля срабатывания канала. Характерным изменением является снижение порога активации на -75 мВ и медленной деактивации канала [47].

Основываясь на этих наблюдениях, мы предположили, что удаление доменов N-Cap и PAS в Kv10.2 должно привести к появлению функциональных каналов с измененной деактивационной кинетикой, как в исследованиях на Kv11.1 и Kv10.1 в клетках млекопитающих [47,180].

Однако у всех мутантных каналов Kv10.2 Δ 2-24, Kv10.2 Δ 25-135, Kv10.2 Δ 2-134, в аналогичных условиях измерения, ионные токи отсутствовали (рис. 30).

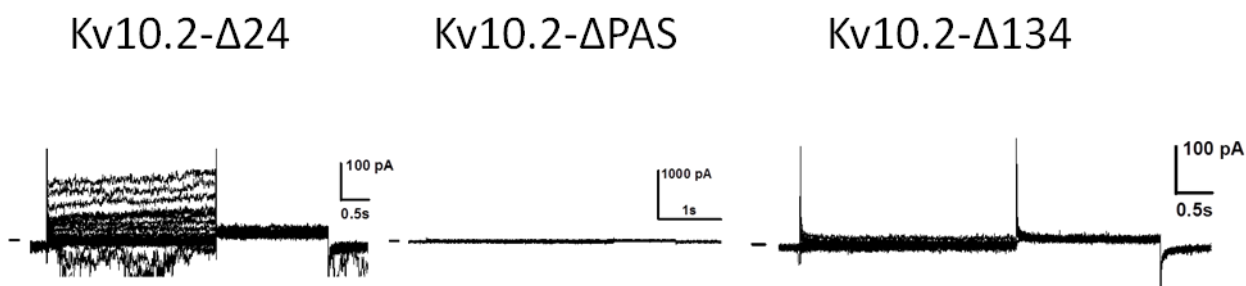


Рисунок 30. Результаты экспериментов по записи токов для для клеток, экспрессирующих каналы Kv10.2 Δ 2-24, Kv10.2 Δ 25-135, Kv10.2 Δ 2-134. Токи отсутствовали.

Следует заметить, что все мутантные каналы успешно экспрессировались клетками COS-1 и COS-7, что подтверждают данные иммуноблоттинга (рис. 28), а также иммуоокрашивание клеток (рис. 31).

Отсутствие ионных токов у каналов возможно из-за различных причин. К таким причинам можно отнести нарушение работы селективного фильтра, [181] или ворот канала, вследствие чего происходит нарушение проведения

ионов через канал. Нарушение сборки субъединиц канала, удаление последовательности мембранной локализации, нарушение взаимодействия белка канала с белками переносчиками либо нарушение транспорта каналов к мембране клетки так же приводит к отсутствию ионных токов [69,182].

N-концевая последовательность имеет существенное значение для транспорта мембранных белков [183]. Показано, что делеции N-концевой последовательности у канала Kv7.1 и точечные мутации в аминокислотах Y111C, L114P и P117L приводят к нарушению экспонирования канала в мембрану клетки. [124]. Для канала Kv11.1 так же найдены мутации, приводящие к нарушению транспорта канала: Y611H и V822M [184]. Подобные нарушения характерны и для других калиевых каналов [182].

Таким образом, отсутствие тока у N-концевых мутантов, которое мы наблюдали, видимо, происходит вследствие нарушения транспорта канала к мембране клетки.

Для проверки данной гипотезы нами были проведены эксперименты по изучению субклеточного распределения белка канала с использованием конфокальной микроскопии (рис. 31). Для окраски мембран использовали WGA (агглютинин проростков пшеницы), он связывает N-ацетилглюкозаминовые и N-ацетилнейраминовые кислоты (сиаловые кислоты), в клеточных мембранах. Окраску канала осуществляли с использованием антител против C-концевого 1D4-тага.

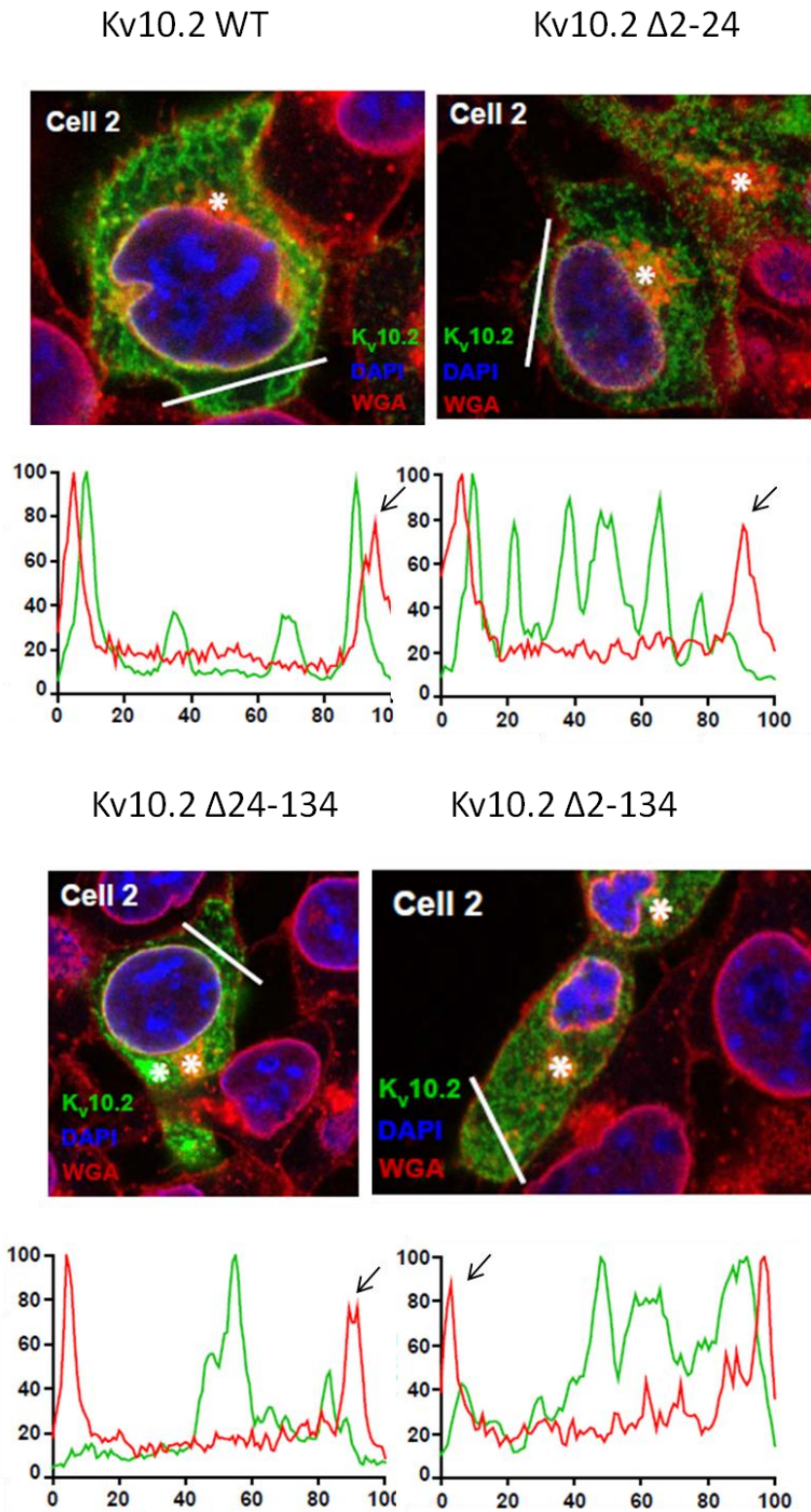


Рисунок 31. Верхний ряд - изображение клеток, полученные с использованием конфокальной микроскопии после иммуноокрашивания (каналы окрашены с использованием мышиных антител к 1D4-тагу, вторичные антитела конъюгированы с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 - зеленый; мечение мембраны с помощью WGA - красный; окраска ядер DAPI - синий). Нижний ряд - денситограммы интенсивности флуоресценции поперек цитоплазмы клетки. Все измерения даны в условных единицах. WT – дикий тип каналов Kv10.2; 2-24, 2-134, 25-134 – каналы с делециями соответствующих а.к. в N-концевом домене.

Для полноразмерного канала распределения флуоресцентных сигналов WGA и AlexaFluor288 совпадали в области мембраны, а для мутантных – наблюдался устойчивый сигнал AlexaFluor288 в цитоплазме (рис. 31). Приведенные данные показывают, что удаление доменов: N-CAP, PAS, а также двух доменов одновременно (домен EAG) приводит к нарушению транспорта каналов Kv10.2 к мембране.

В транспорте мембранных белков к поверхности клетки существенную роль играет цитоскелет и белки, ответственные за движение везикул по цитоскелету [185].

Нами была выдвинута гипотеза, что подобные изменения возникают вследствие отсутствия взаимодействия N-концевого участка канала с элементами цитоскелета.

Участие N-концевого домена канала Kv10.2 во взаимодействии с цитоскелетом.

Как известно из литературных данных, многие потенциал-зависимые каналы взаимодействуют с элементами цитоскелета [20,186,187]. В данной работе исследовался актин, как один из основных белков цитоскелета клетки, а так же как наиболее встречающийся компонент цитоскелета, участвующий во взаимодействии с каналами.

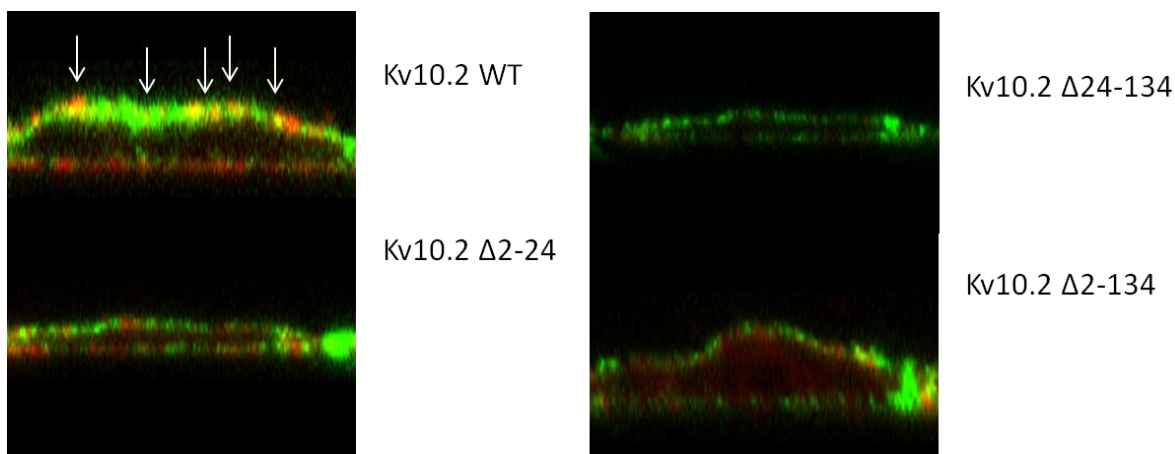


Рисунок 32. Латеральные срезы реконструированных трехмерных изображений клеток COS-1, экспрессирующих мутантные каналы Kv10.2 и каналы дикого типа (WT). Конфокальная микроскопия. Каналы окрашены с использованием мышиных антител к 1D4-тагу, вторичные антитела конъюгированы с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 - зеленый; мечение актинового цитоскелета с помощью Фаллоидина конъюгированного с Alexa 546 - красный. Стрелки указывают на солокализацию каналов с актином (желтое окрашивание).

Для проверки гипотезы о нарушении взаимодействия актиновых филаментов с мутантными ионными каналами Kv10.2 были произведены исследования с одновременным иммуноокрашиванием актина и канала Kv10.2 в клетках COS³ (рис. 32). Как видно из рисунка, перекрывание сигнала для окрашенных канала и актина (соответствующее желтому цвету на изображении) наблюдается только для каналов Kv10.2 дикого типа. Для мутантов солокализации не наблюдается. Помимо визуальной оценки солокализации, нами были выполнены расчеты в программе ImageJ и произведена визуализация солокализации (рис. 33).

³ Конфокальная микроскопия проводилась в сотрудничестве с к.б.н., К.С. Кудряшовой, МГУ

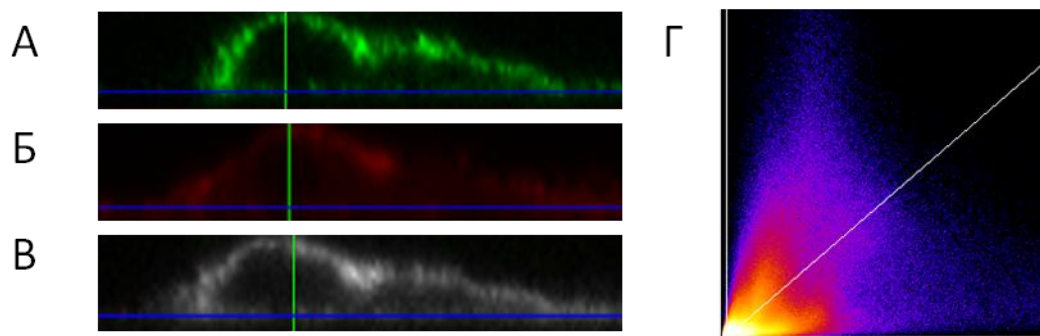


Рисунок 33. Солокализация канала Kv10.2 с актином. А - латеральный срез распределение сигнала от канала, окраска антител к 1D4 тагу, вторичные антитела конъюгированы с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488; Б - латеральный срез распределение сигнала от актина, окраска фалоидин конъюгированные с Аксеха. В - латеральный срез показывающий область перекрывание сигналов от данных красителей. Г - Двухмерная гистограмма распределения корреляции интенсивности между сигналами полученными от красителей к полноразмерному каналу и актиновому цитоскелету.

В ходе обработки изображений в программе ImageJ были получены численные значения коэффициента Пирсона. Исходя из значения данного параметра можно сделать вывод, что у полноразмерного канала наблюдается частичная солокализация с актином, тогда как у мутантных форм канала солокализация с актином отсутствует (таблица 1).

Таблица1. Солокализации интенсивностей флуоресценции для каналов Kv10.2 и актина, значение коэффициента Пирсона

| Канал | Коэффициент Пирсона |
|-----------------------------|---------------------|
| Kv10.2 | 0.32** |
| Kv10.2 Δ 25-135(PAS) | 0.1 |
| Kv10.2 Δ 2-24 | 0.05 |
| Kv10.2 Δ 2-135 | 0.08 |

Частичная солокализация свидетельствует о том, что взаимодействие канала с актином происходит не напрямую, а через один или несколько белков-посредников. При этом взаимодействие осуществляется именно с N-

концевой последовательностью (рис. 34). Подобное взаимодействие характерно и для других представителей потенциал зависимых каналов [187].

Модель взаимодействия канала с цитоскелетом

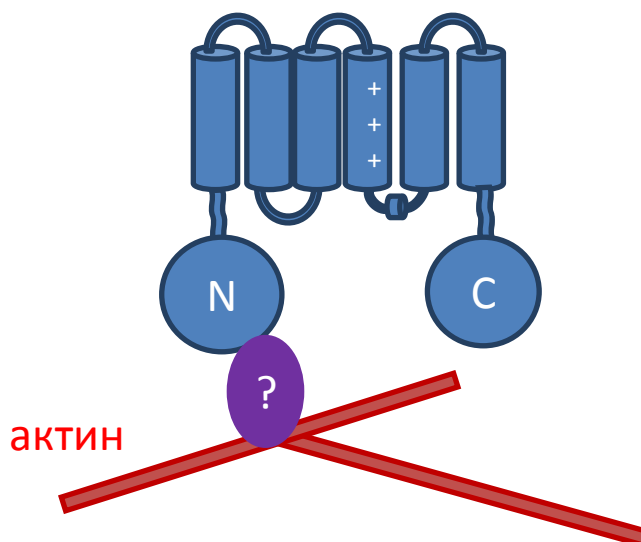


Рисунок 34. Схема взаимодействия с актиновым цитоскелетом канала Kv10.2. Знаком вопроса отмечен неизвестный белок-посредник, обеспечивающий взаимодействие актина и канала Kv10.2.

Для калиевых потенциал-зависимых каналов Kv3.3 характерно взаимодействие с актином через белки-посредники к которым относятся Arp2/3 (белок участвующий в ветвлении актиновых филаментов), Naх-1 (антиаптотический белок), Rac (малая ГТФаза) и кортаксин [187]. Подобные взаимодействия важны для потенциал-зависимых каналов, так как для многих их типов наблюдается строгая субклеточная локализация. Примером данной локализации может служить распределение потенциал-зависимых каналов в области вокруг перехвата Ранвье и их четкая миграция в процессе онтогенеза нервных клеток, покрытых миелиновой оболочкой [188,189]

Мы предполагаем, что для канала Kv10.2 возможен аналогичный механизм взаимодействия с актином, обеспечивающий его субклеточную локализацию.

Кластеризация мутантных каналов.

Ранее было установлено, что полноразмерные каналы Kv10.2 способны формировать небольшие кластеры в мембране диаметром от 0,5 до 1 мкм [186]. В данной работе мы обнаружили, что мутантные Kv10.2 каналы формируют значительно более крупные (до 2 мкм) кластеры, отстоящие друг от друга на большое расстояние (рис. 35). Между этими кластерами флуоресцентный сигнал практически не детектировался, свидетельствуя о том, что при удалении N-концевых доменов концентрация свободных активных каналов в клетке значительно снижается.

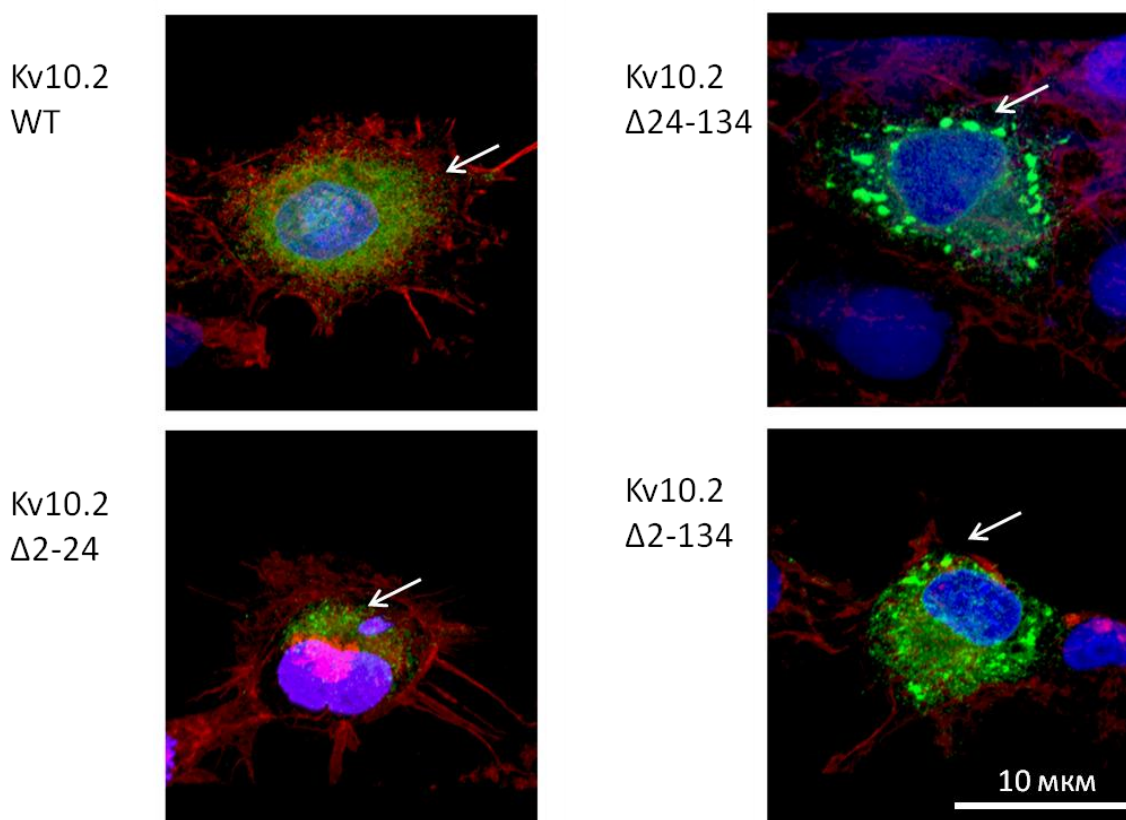


Рисунок 35. Распределение сигнала в клетке от полноразмерного и мутантных каналов. Каналы окрашены первичными антителами к аффинному тагу 1D4, вторичные антитела конъюгированы с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488. Ядра окрашены DAPI, стрелки указывают на кластеры каналов.

Таким образом, во второй части работы мы показали, что удаление цитоплазматических N-концевых участков приводит к изменению экспрессии канала Kv10.2 на поверхности клетки и организации каналов в

кластеры, что указывает на то, что функция кластеризации может осуществляться последовательностью, расположенной на С-конце белка канала Kv10.

Структура канала Kv10.2 с удаленным доменом PAS.

Для определения взаимодействия С- и N-концевых доменов в канале и конформационных изменений при удалении N-концевой последовательности, мы получили трехмерную структуру мутантного канала с удаленным PAS-доменом (Kv10.2 Δ 24-134).

Очищенный белок канала нанесли на сетку и подвергли электронно-микроскопическому анализу. Так как концентрация образца была ~50 нг (а для криоэлектронной микроскопии нужна концентрация белка порядка мкг), мы использовали электронную микроскопию с негативным контрастированием. Мы получили более 200 микрографий каналов Kv10.2 Δ PAS (рис. 36).

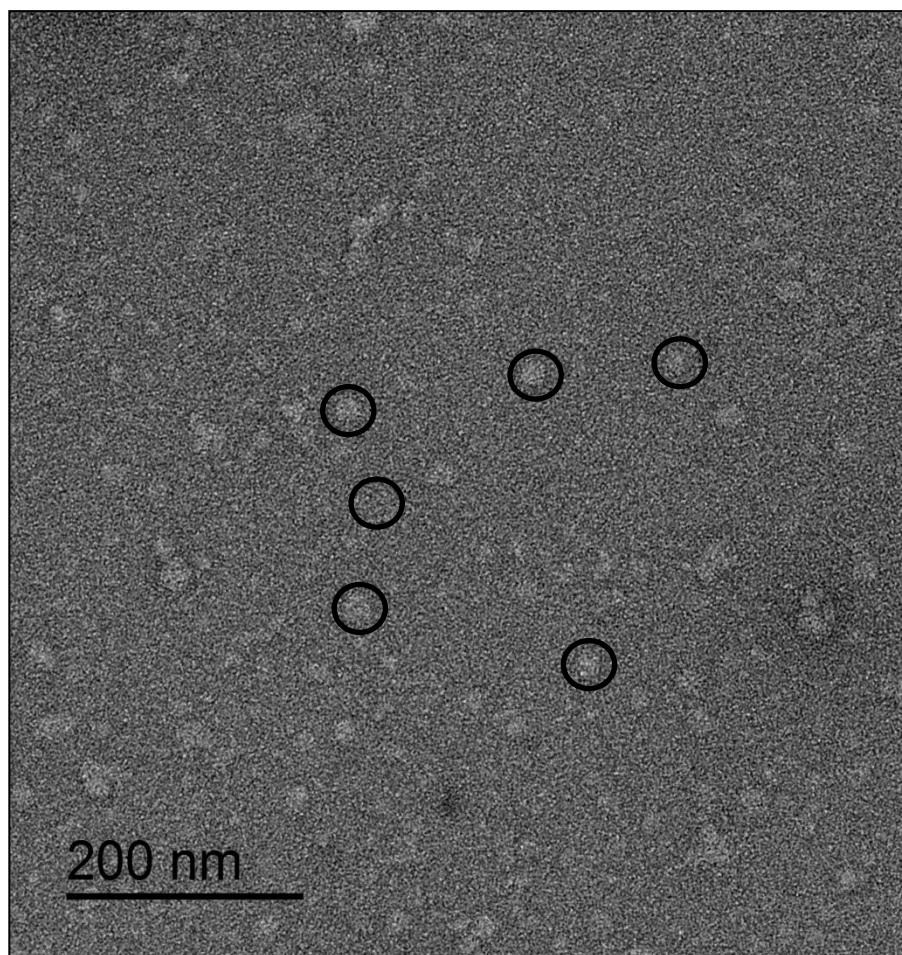


Рисунок 36. Электронная микрофотография канала Kv10.2. Негативная окраска, увеличение 40000 раз. Молекулы каналов отмечены кругами.

Реконструкцию производили как описано в методах. Для реконструкции было отобрано более 4000 частиц, которые подвергали выравниванию и суммированию (рис. 37).

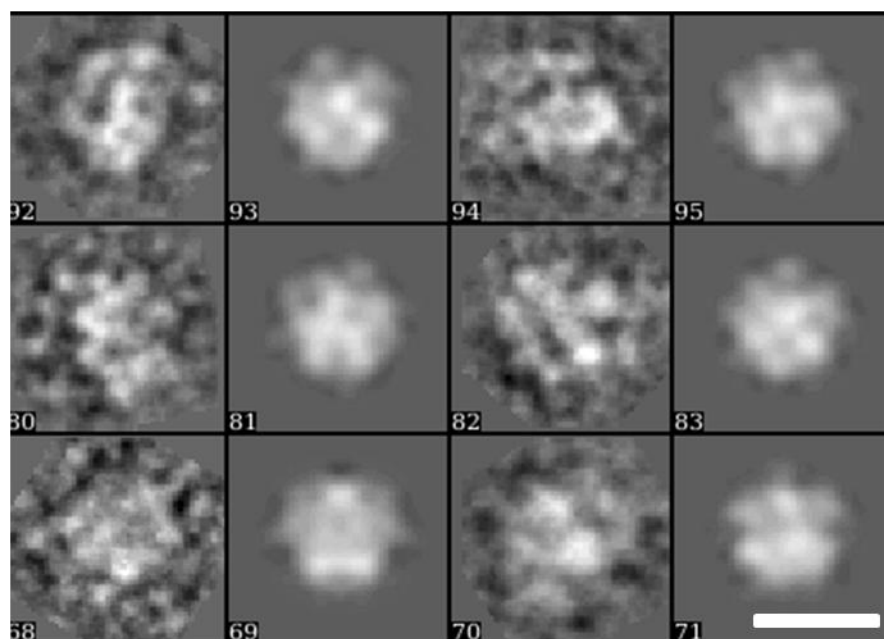


Рисунок 37. Классовые суммы (каждый нечетный ряд) и их репроекции (каждый четный ряд), использованные для создания трехмерной реконструкции. Классовые суммы слева, репроекции справа. Масштабный отрезок 10\AA

По итогам анализа изображений была рассчитана трехмерная структура изолированного в детергенте белка канала Kv10.2 Δ PAS (рис. 39). Реконструкция имеет разрешение 22\AA , рассчитанное по данным объемной корреляции Фурье (рис. 38).

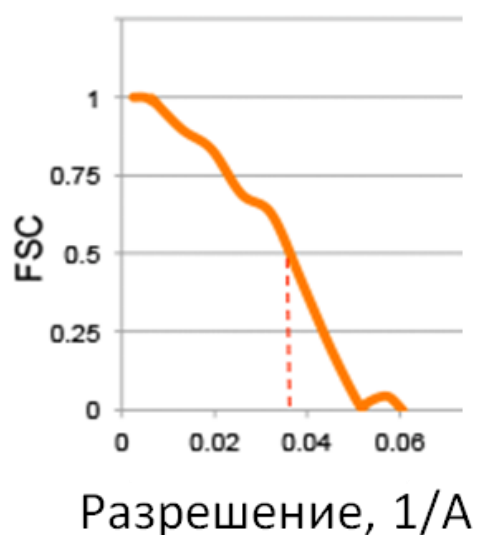


Рисунок 38. Определение реконструкции канала методом объемной корреляции Фурье.

Анализ трехмерной структуры выявил наличие в ней следующих доменов: трансмембранного с размерами $10 \times 10 \times 5$ нм и цитоплазматического с размерами $12 \times 12 \times 5$ нм. Фитинг кристаллических структур мембранного домена, полученного по гомологии с Kv1.2/Kv2.1 и CNBD-домена, полученного по гомологии с доменом цАМФ-зависимого канала HCN4 (PDB код 3OTF), в электронную плотность показал хорошую корреляцию (0,87) (рис. 39).

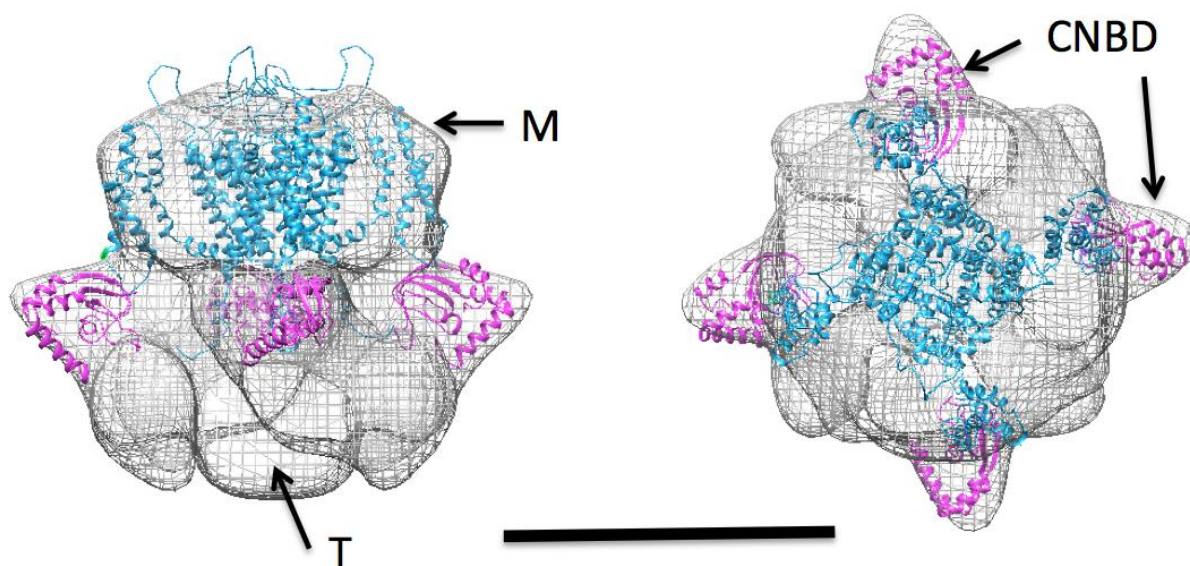


Рисунок 39. Интерпретация трехмерной структуры канала Kv10.2 Δ PAS с помощью фитинга модели трансмембранного домена в верхнюю часть реконструкции канала и cNBD-доменов в цитоплазматическую часть реконструкции: (а) – вид сбоку, отмечены трансмембранный домен (ТМ) и тетрамеризационный домен (Т); (б) – вид со стороны трансмембранного домена, отмечены CNBD-домены. Масштабный отрезок – 10 нм .

При сравнении полученной трехмерной структуры транкированного канала Kv10.2 Δ PAS со структурами полноразмерного канала Kv10.2 (рис. 40) [50] и родственного канала Kv10.1 с удаленным С-концом [54], мы обнаружили различия в положении цитоплазматических доменов. Удаление N-концевого PAS-домена приводит к изменению общей формы реконструкции.

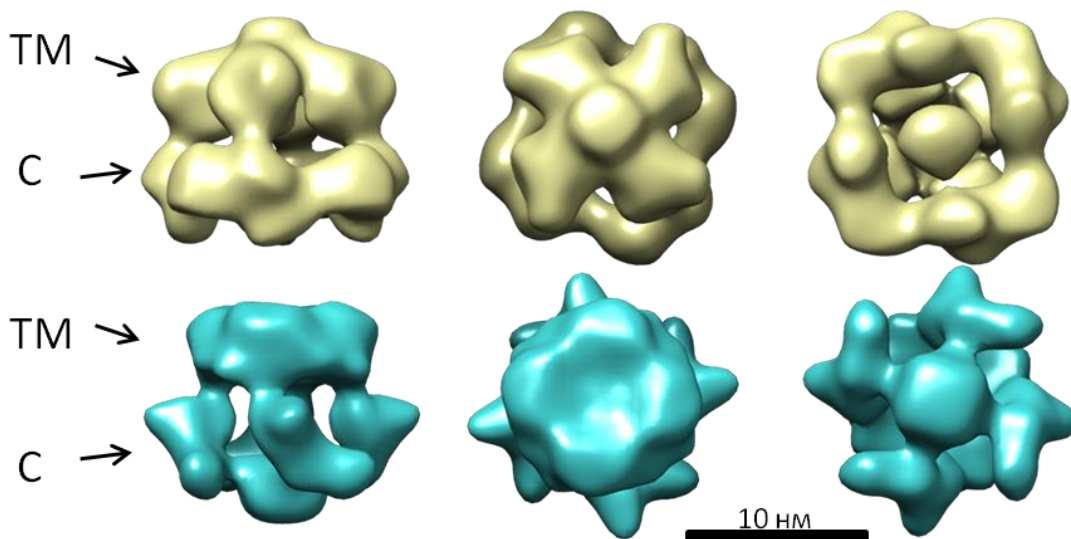


Рисунок 40. Сравнение трехмерных реконструкций каналов Kv10.2. Верхний ряд - полноразмерный канал. Нижний - канал с транкированным PAS-доменом. TM - трансмембранный домен, C - цитоплазматические домены.

Отдельные CNBD-домены в мутантном канале связаны с центральной плотностью (Т), находящейся на оси симметрии канала. Известно, что на С-конце канала Kv10 расположен тетрамеризационный CAD-домен. Мы предположили, что наблюдаемая нами центральная плотность представляет собой CAD-домен. В отсутствие N-концевого домена он также изменяет свое местоположение (рис. 39). В 2016 г была опубликована структура канала Kv10.1 [10], которая показала, что CaM связывает цитоплазматические домены PAS и CNBD. При удалении N-концевых последовательностей, CaM не может более соединять цитоплазматические домены, что приводит к перемещению С-концевых доменов ближе к мембранному домену (на $\sim 2\text{\AA}$). В результате они могут физически взаимодействовать со структурными элементами, ответственными за активацию каналов.

Влияние S4-S5 линкера в составе канала на его функциональное состояние.

Каналы Kv10 и Kv11 имеют сходную структуру (последовательности идентичны на 45%) [53,54] поэтому для исследования механизма активации канала Kv10.2 мы использовали имеющиеся данные об активации канала Kv11 [12,116,190]. В соответствии с предложенным ранее механизмом

активации каналов Kv11 по принципу лиганд/рецептор, в котором особую роль отводится взаимодействию S4-S5 линкера с С-концевым участком спирали S6 (S6T), мы провели выравнивание последовательностей каналов Kv10 и Kv11 и определили позиции, соответствующие наиболее близкому положению S4-S5 линкера и S6T (рис. 41).

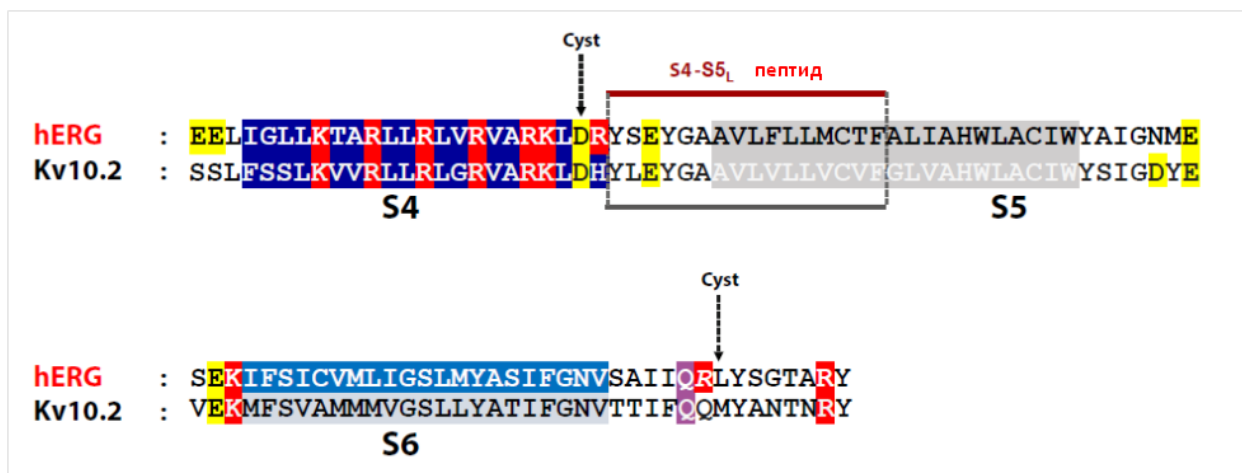


Рисунок 41. Выравнивание белковой последовательности канала Kv10.2 относительно последовательности канала Kv11.1.

По остаткам D339 и M474 в канале Kv10.2 были проведены точечные мутации с заменой аминокислот на цистеин. Мутантные каналы не проявляли отличий в электрофизиологии от канала дикого типа (рис. 42). При окислении цистеинов в позициях 339 и 474 с использованием реагента *tbNO2* (трет-Бутилгидропероксид) мутантные каналы переходили в закрытое состояние и ионных токов не проводили (рис. 42А). Это может происходить вследствие образование дисульфидных связей между близко расположенными цистеинами С339 в S4-S4 линкере и С474 в S6T. Стоит отметить, что *tbNO2* не имел эффекта на каналы дикого типа и каналы с одиночными мутациями, в положении D339C и M474C (рис. 42Д, Е).

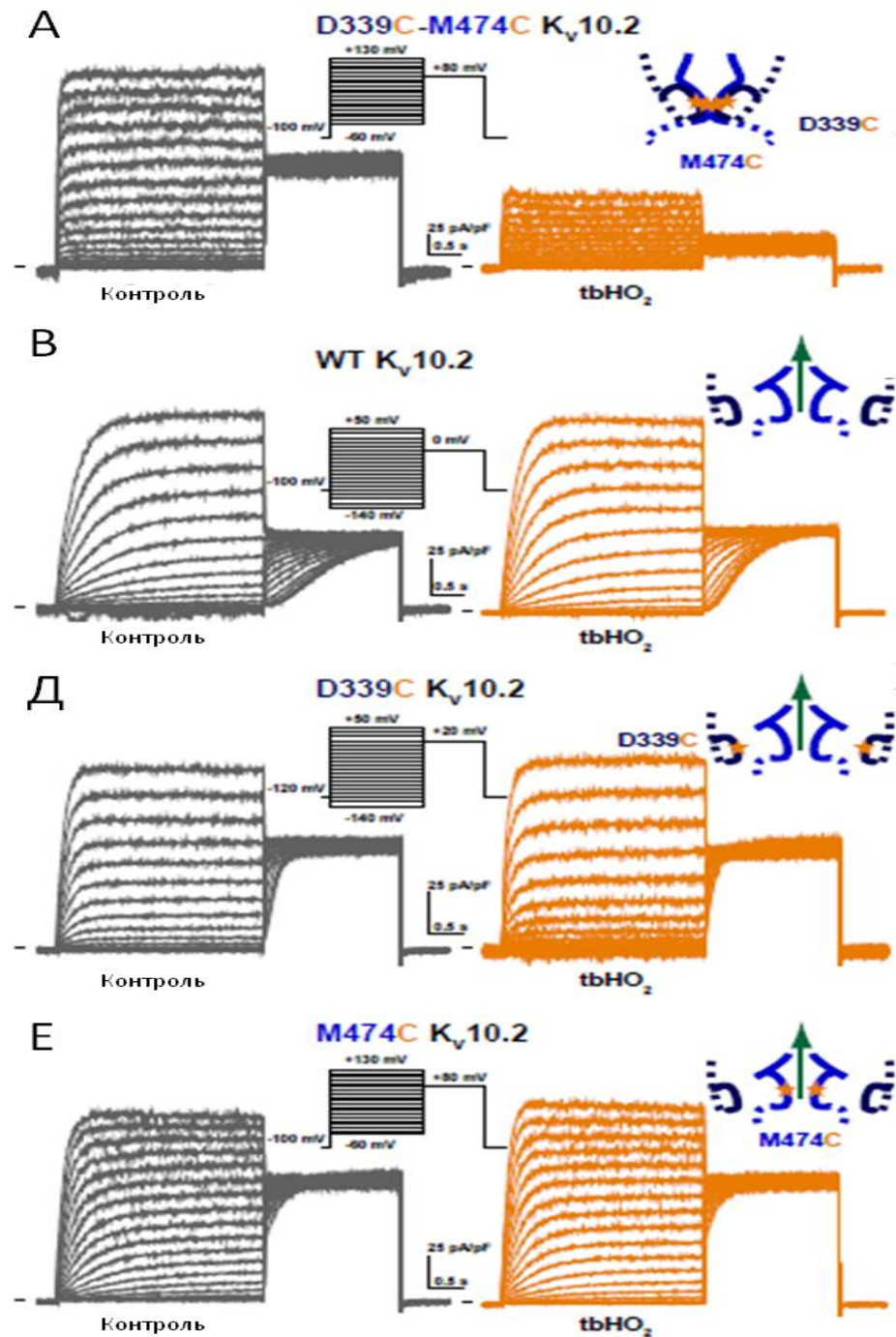


Рисунок 42. Влияние цистеиновых мутаций на канал Kv10.2. (А) сравнение тока через мутантный канал Kv10.2D339C/M474C до (контроль) и после обработки $tbHO_2$; (Б) плотность тока мутантный канал Kv10.2D339C/M474C до (контроль) и после обработки $tbHO_2$; (В) сравнение тока через канал дикого типа Kv10.2 до (контроль) и после обработки $tbHO_2$; (Г) тока канал дикого типа Kv10.2 до (контроль) и после обработки $tbHO_2$; (Д) сравнение тока через мутантный канал Kv10.2D339C до (контроль) и после обработки $tbHO_2$; (Ж) плотность тока мутантный канал Kv10.2D339C до (контроль) и после обработки $tbHO_2$; (Е) сравнение тока через мутантный канал Kv10.2M474C до (контроль) и после обработки $tbHO_2$; (К) плотность тока мутантный канал Kv10.2M474C до (контроль) и после обработки $tbHO_2$.

Для подтверждения лиганд/рецепторной модели активации и исходя из данных приведенных выше, мы проводили ко-экспрессию изолированного пептида S4-S5 (лиганда) с каналами Kv10.2 дикого типа. Последовательность изолированного пептида содержала S4-S5 линкер с участком S5 трансмембранной спирали и состояла из 15 аминокислотных остатков. При этом наблюдалось снижение плотности тока (рис. 43А).

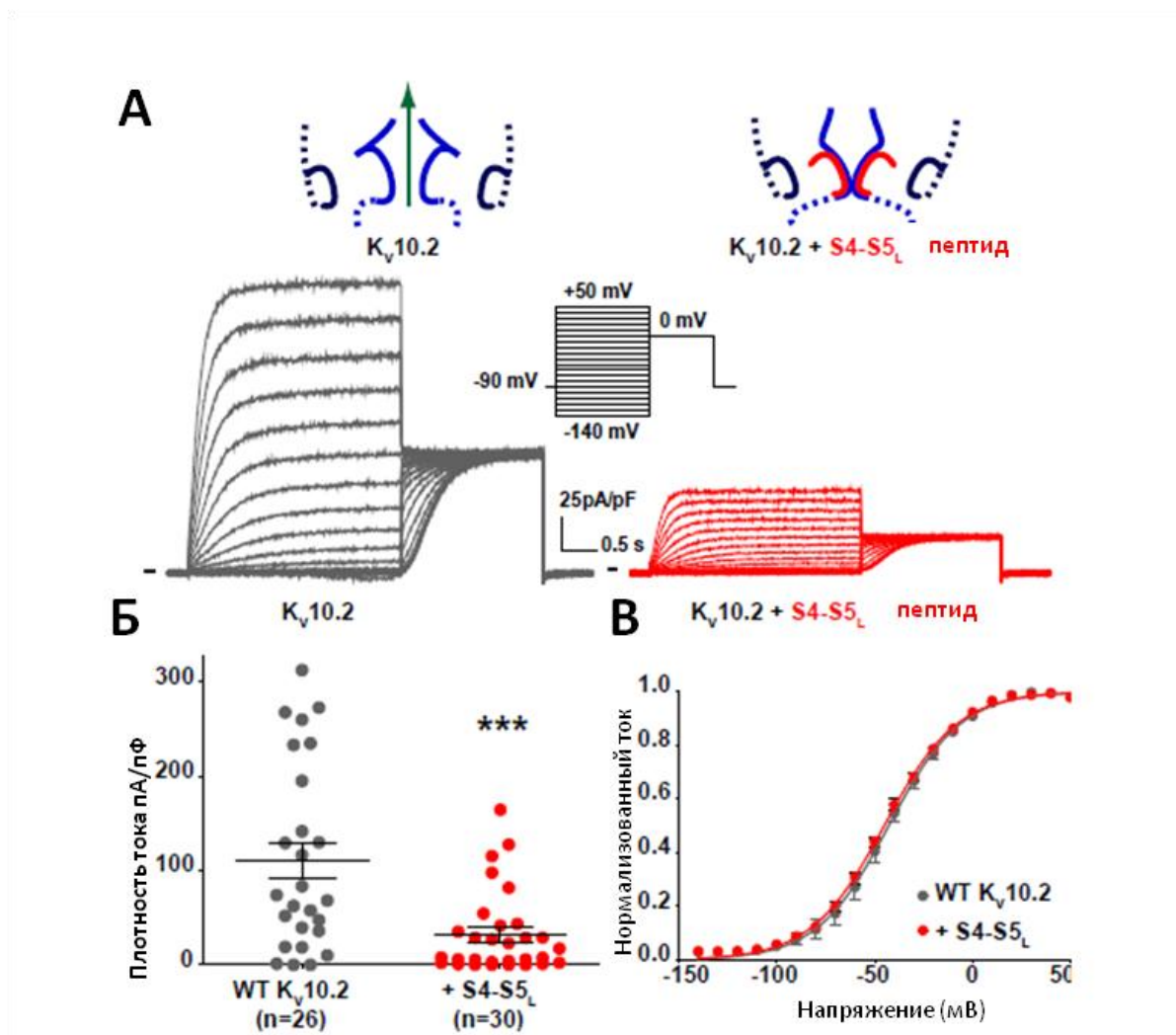


Рисунок 43. Воздействие коэкспрессии экзогенного пептида мимикрирующего под S4-S5 линкер на токи канала Kv10.2 дикого типа. (А) токи канала Kv10.2 дикого типа в клетках без (слева) и с коэкспрессией пептида (справа); (Б) плотность тока Kv10.2 дикого типа в клетках без (слева) и с коэкспрессией пептида; (С) График зависимости интенсивности тока от потенциала.

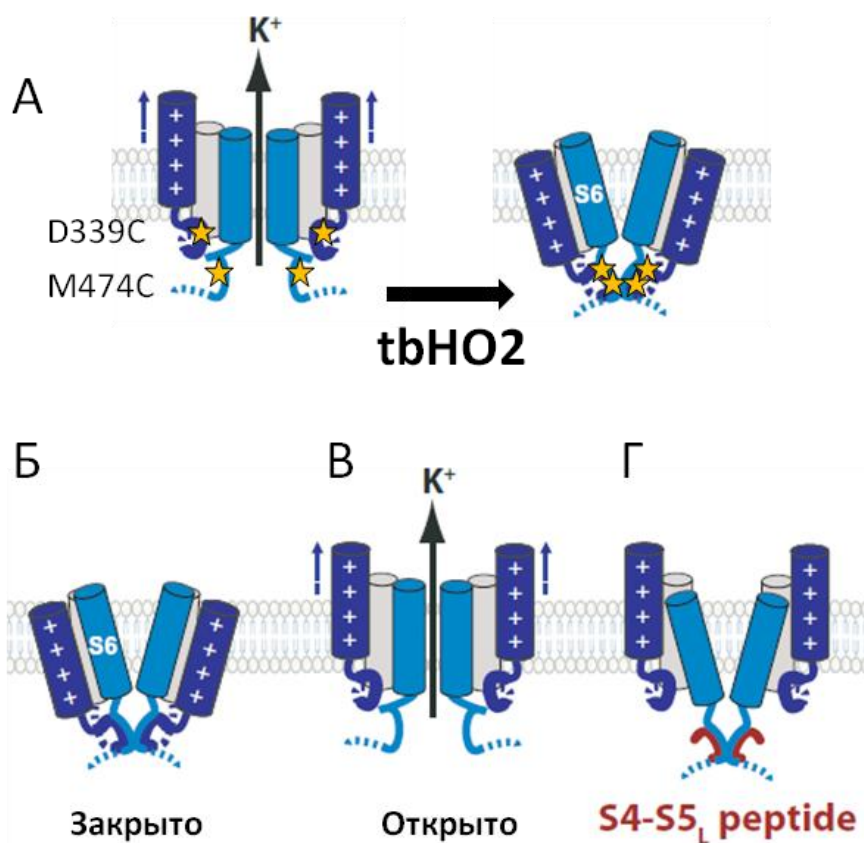


Рисунок 44. Лиганд-рецепторная модель активации канала Kv10.2. (А) влияние на стабилизацию канала в закрытом состоянии цистеиновых мутациями D339C/M474C канала Kv10.2; (Б) открытый канал с мутациями в S4-S5 линкере (лиганд) и S6T (рецептор); (В) при добавлении реагента tbHO2 канал закрывается; (Г) канал также закрывается без перемещения спиралей S4 при взаимодействии с внешним пептидом S4-S5 (стрелки).

До сих пор не было известно, по какой модели происходит активация каналов Kv10. Исходя из наших данных (рис. 44) и данных [12] можно сделать вывод что для каналов семейства EAG актуальной является лиганд-рецепторная модель активации канала. Для данной модели характерно не ковалентное взаимодействие S4-S5 линкера с S6 доменом, и стабилизация канал в закрытом состоянии. В пользу данной модели говорит и ограниченный размер S4-S5 линкера у каналов семейства eag по сравнению с остальными представителями семейств потенциал-зависимых каналов [54].

Модель активации канала Kv10.2.

Существуют два варианта взаимодействия между потенциал-чувствительным доменом и порой Kv канала. Первый предполагает непосредственную связь между положением S4 и состоянием поры, подобный вариант характерен для каналов семейства *Shaker* [8] и натриевых каналов [191]. Вторым вариантом (аллостерический) заключается в том, что пора может находиться в активированном состоянии, даже если S4-сегмент находится в нижнем (закрытом) положении [192–194] либо наоборот, S4 может находиться в верхнем (открытом) положении, а канал остается закрытым [115]. Подобная аллостерическая связь реализуется у каналов Kv11.1 [12] за счет лиганд-рецепторных взаимодействий, в которых S4-S5 выступает в роли лиганда а S6T в роли рецептора.

В данной работе, используя цистеиновые мутанты, мы показали, что аналогичным образом происходит регуляция активности у канала Kv10.2. Ко-экспрессия канала с экзогенным S4-S5 пептидом приводит к уменьшению плотности тока, но не приводит к изменению активационных кривых (рис 43). Это свидетельствует о медленной активации канала.

Известно, что взаимодействие между S4-S5 линкером и N-CAP, приводит к изменению времен активации и дезактивации каналов семейства EAG [10,21]. В работе [195] ко-экспрессия экзогенного N-CAP пептида (16 первых аминокислот) и транскрибированного по N-концевой последовательности канала Kv11.1 приводила к восстановлению правильной работы канала. В нашей работе также была проведена совместная экспрессия N-CAP пептида и транскрибированной формы канала Kv10.2, но восстановление активности канала и транспорта к мембране не последовало. То есть, роль доменов PAS и N-CAP различна для каналов Kv11 и Kv10. Для каналов Kv11 удаление данных доменов не влияет на транспорт канала к мембране, а лишь меняет деактивационные кривые. У канала Kv10.2 N-концевые домены помимо структурных функций играют важную роль в транспорте канала к мембране.

Таким образом, домены N-CAP и PAS у Kv10.2 и Kv11.1 играют разную роль в функционировании канала.

Структурная модель межбелковых взаимодействий при активации канала.

Исходя из полученной нами 3D структуры канала Kv10.2, можно предположить, что при делециях на N-концевом участке, CNBD-домен меняет свое расположение и поднимается к мембране (рис. 45). В результате S4-S5 линкер может взаимодействовать с S6T-участком.

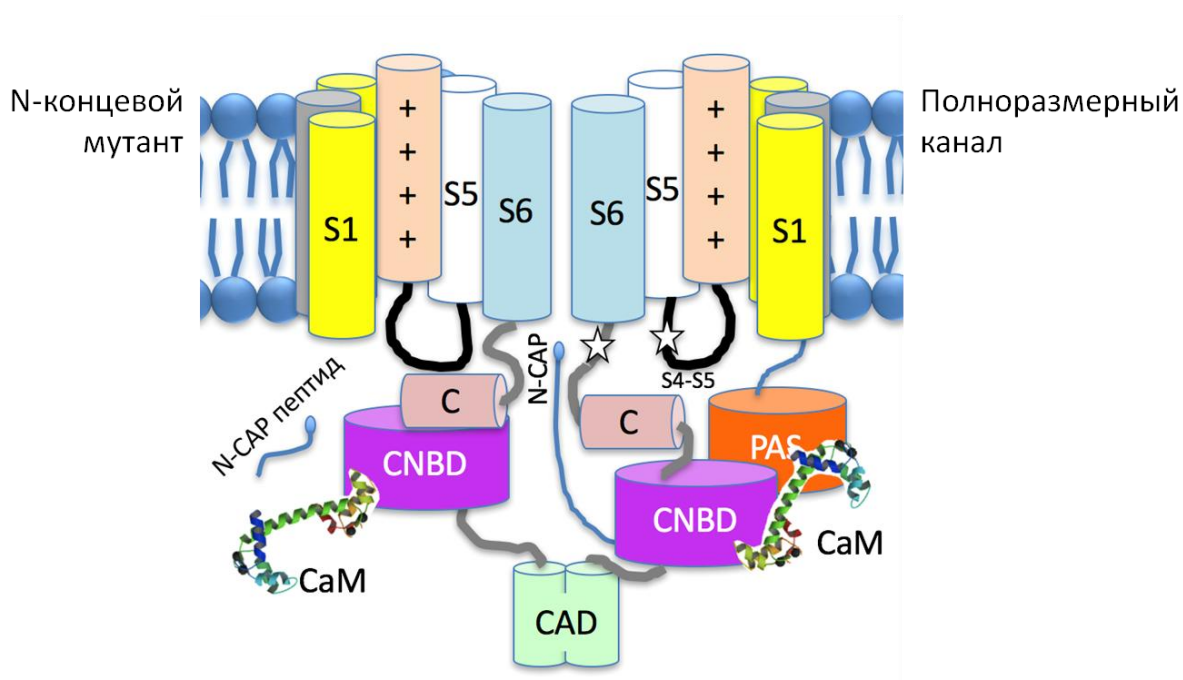


Рисунок 45. Схема доменных взаимодействий в канале Kv10.2. Отмечены трансмембранные спирали S1-S6, цитоплазматические домены: C-линкер, PAS, CNBD, CAD. CaM - кальмодулин. N-CAP – инактивационный пептид. Звездочками показаны места взаимодействия S4-S5 линкера с S6T.

Из экспериментов по образованию цистеиновых сшивок между аминокислотами D339C и M474C можно говорить о близком пространственном расположении S4-S5 линкера и S6 терминальной областью. Построенное на этих данных предположения, что в активации канала существенную роль играют не непосредственно механическая передача или смещение доменов за счет ковалентного взаимодействия между элементами полипептидной цепи, а вследствие взаимодействия отдельных

элементов канала по принципу лиганд/рецептор. В пользу этого говорят наши данные по коэкспрессии канала с экзогенными пептидами имитирующими S4-S5 линкер. Подобные результаты хорошо согласуются с другими работами произведенными на канале Kv11.

Восстановление работы при коэкспрессии с N-CAP пептидом канала Kv10.2 не произошло, так же как и транспорта канала к мембране. По всей видимости данный факт свидетельствует о вовлечении последовательности N-концевой во взаимодействие с элементами Цитоскелета и транспортной системы клетки у каналов Kv10.2 в отличии от других представителей семейства EAG.

Хотя роль кальмодулина в функционировании каналов Kv10.2 пока остается под вопросом, по аналогии с Kv10.1, отсутствие N-концевых доменов приводит и к нарушению этих взаимодействий.

Заключение.

В работе исследовалось влияние межбелковых взаимодействий на кластеризацию катионных каналов и их структурно-функциональные характеристики. На примере грамицидина А показали важность межбелковых взаимодействий в процессе кластеризации мутантных каналов, приводящей к формированию новой олигомерной структуры.

Установлено, что удаление цитоплазматического N-концевого участка у канала Kv10.2 приводит к изменению его экспрессии на поверхности клетки и организации каналов в кластеры, что указывает на то, что зависит от последовательности, расположенной на C-конце белка канала Kv10.2. При этом N-концевой участок, скорее всего, участвует во взаимодействии с цитоскелетом.

Мы доказали что межбелковые взаимодействия способствуют активации канала Kv10.2 по механизму лиганд/рецептер. Деактивация канала Kv10.2 за счет связывания экзогенных пептидов с C-концевым участком спирали S6.

На основании полученных результатов была предложена модель, согласно которой для нормального функционирования канала Kv10.2 необходимо ковалентное взаимодействие S4-S5 линкера и S6T. Это взаимодействие обеспечивает двухступенчатую активацию канала: в начале быстрое движение S4 вытягивает лиганд S4-S5 из его рецептора на S6T, а затем происходит медленное открытие ворот канала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (Соглашение №14.616.21.0044 от 09.10.15, уникальный номер проекта: RFMEFI61615X0044). Электронная микроскопия проводилась с использованием УНУ «Трехмерная электронная микроскопия и спектроскопия».

Выводы

1. Грамицидин А с заменой на лизин в третьем положении в модельных липосомах кластеризуется с образованием пентаметра с неселективной порой, состоящего из антипараллельных правозакрученных двухцепочечных димеров;
2. Отсутствие N-концевых доменов приводит к нарушению транспорта каналов Kv10.2 к мембране и нормального распределения каналов в клетке;
3. Транкирование в N-концевой области канала Kv10.2 приводят к нарушению взаимодействия с цитоскелетом, что свидетельствует о взаимодействии N-концевых доменов с актином;
4. Активация каналов Kv10.2 происходит согласно лиганд/рецепторной модели. При этом линкер S4-S5 нековалентно связывается с поровым доменом;
5. Введение мутаций приводит к изменению структуры и функциональных характеристик ионных каналов, а также к нарушению их транспорта к клеточной мембране.

Список публикаций по теме диссертации.

Публикации в журналах из перечня ВАК РФ:

1. Глухов Г.С., Попинако А.В., Гризель А.В., Шайтан К.В., Соколова О.С. Строение человеческого калиевого потенциал-зависимого канала Kv10.2 с удаленным цитоплазматическим доменом PAS // *Биофизика*. — 2016. — Т. 61, № 4. — С. 699–704.
2. Antonenko Y.N., **Gluhov G.S.**, Firsov A.M., Pogozheva I.D., Kovalchuk S.I., Pechnikova E.V., Kotova E.A., Sokolova O.S.. Gramicidin A disassembles large conductive clusters of its lysine-substituted derivatives in lipid membranes // *Physical Chemistry Chemical Physics*. — 2015. — Vol. 17. — P. 17461–17470.

3. Гризель А.В., Глухов Г.С., Соколова О.С. Механизмы активации потенциал-управляемых калиевых каналов // *Acta Naturae*. — 2014. — Т. 6, № 4. — С. 12–28.
4. Багров Д. В., Воскобойникова Н., Армеев Г. А., Мосслеи В., Глухов Г. С., Исмагулова Т. Т., Мулкиджанян А. Я., Кирпичников М. П., Штайнхофф Х-Ю, Шайтан К. В. Исследование липодисков, содержащих комплекс сенсорного родопсина ii с родственным белком-трансдюсером из *natronomonas pharaonis*.// *Биофизика*. — 2016. — Т. 61, №. 6. — с. 1139-1148.

Тезисы докладов

1. Kiprina A.A., Gluhov G.S., Sokolova O.S. Expression and purification cnbd domain of Kv10.2 channel // Российская международная конференция по криоэлектронной микроскопии RICSEM-2017, Москва, Россия, 6-8 июня 2017. — Р. 28
2. Glukhov G., Kudryashova K., Malak O., Loussouarn G., Sokolova O. The effect of the n-terminal region on the function of the heag2 channel // Российская международная конференция по криоэлектронной микроскопии RICSEM-2017, Москва, Россия, 6-8 июня 2017. — Р. 17.
3. Глухов Г.С., Кудряшова К.С., Новоселецкий В.Н., Соколова О.С. Потенциал-зависимые калиевые каналы kv10.2: экспрессия и структура // Первый Российский кристаллографический конгресс, Москва, Россия, 21-26 ноября 2016. — С. 232.
4. Багров Д.В., Воскобойникова Н., Армеев Г.А., Мосслеи В., Глухов Г.С., Исмагулова Т., Мулкиджанян А.Я., Кирпичников М.П., Штайнхофф Х-Ю, Шайтан К.В. Получение и исследование липодисков, содержащих комплекс сенсорного родопсина II с родственным белком-трансдьюсером из *Natronomonas pharaonis* // Первый Российский кристаллографический конгресс, Москва, Россия, 21-26 ноября 2016.

5. 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.
6. Глухов Г.С., Печникова Е.В., Антоненко Ю.Н., Соколова О.С. формирование кластеров [lys3]gA в составе липосом по данным криоэлектронной микроскопии // V Съезд биофизиков России, Ростов-на-Дону, Россия, 4-10 октября 2015. — С. 303.
7. Gluhov G.S., Grizel A.V., Popinako A.V., Karlova M.G., Sokolova O.S. Three-dimensional structure of human Kv10.2 ion channel suggests mechanism for its activation // 38th Congress of the Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Saint Petersburg, Россия, 6-11 июля 2013.
8. Glukhov G.S., Sokolova O.S. Potassium channel Kv10.2 structure and expression // Channelopathy Meeting, Paris, June 12-17 2016. — P. 76.
9. Glukhov G.S., Sokolova O.S. Potassium channel Kv10.2: structure and expression. International school-conference for students and young researchers on structure and functions of ion channels ISONIC2016. May 26-27 2016. — P. 11.
10. Glukhov G.S., Sokolova O.S. Three-dimensional structure of Kv10.2 on lacking cytoplasmic PAS domain. Biophysics, biophotonics, biotechnology Moscow 16-17 February 2016. — P. 44.

Список литературы

1. Hartmann H.A. et al. Exchange of conduction pathways between two related K⁺ channels. // *Science*. 1991. Vol. 251, № 5. P. 942–944.
2. Coetzee W.A. et al. Molecular diversity of K⁺ channels // *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1999. Vol. 868. P. 233–285.
3. Ludwig J. et al. Cloning and Functional Expression of Rat eag2, a New Member of the Ether-à-go-go Family of Potassium Channels and Comparison of Its Distribution with That of eag1 // *Mol. Cell. Neurosci*. 2000. Vol. 16, № 1. P. 59–70.
4. Saganich M.J., Machado E., Rudy B. Differential expression of genes encoding subthreshold-operating voltage-gated K⁺ channels in brain. // *J. Neurosci*. 2001. Vol. 21, № 13. P. 4609–4624.
5. Ju M., Wray D. Molecular identification and characterisation of the human eag2 potassium channel // *FEBS Lett*. 2002. Vol. 524, № 1–3. P. 204–210.
6. Huang X. et al. Voltage-gated potassium channel EAG2 controls mitotic entry and tumor growth in medulloblastoma via regulating cell volume dynamics // *Genes Dev*. 2012. Vol. 26. P. 1780–1796.
7. Gulbis J.M. et al. Structure of the cytoplasmic beta subunit-T1 assembly of voltage-dependent K⁺ channels. // *Science*. 2000. Vol. 289, № 5476. P. 123–127.
8. Long S.B., Campbell E.B., MacKinnon R. Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent Shaker Family K⁺ Channel // *Science* (80-.). 2005. Vol. 309, № 5736. P. 897–903.
9. Long S.B. et al. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment // *Nature*. 2007/11/16. 2007. Vol. 450, № 7168. P. 376–382.
10. Whicher J.R., MacKinnon R. Structure of the voltage-gated K⁺ channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism // *Science* (80-.). 2016. Vol. 353, № 6300. P. 664–669.
11. Wang W., Mackinnon Correspondence R., Mackinnon R. Cryo-EM Structure

- of the Open Human Ether-A-go-go-Related K⁺ Channel hERG // *Cell*. 2017. Vol. 169. P. 422–430.
12. Malak O.A., Es-Salah-Lamoureux Z., Loussouarn G. hERG S4-S5 linker acts as a voltage-dependent ligand that binds to the activation gate and locks it in a closed state // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7, № 1. P. 113.
 13. Lőrinczi Z. et al. Voltage-dependent gating of KCNH potassium channels lacking a covalent link between voltage-sensing and pore domains // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6.
 14. Chen I.-H. et al. Distal end of carboxyl terminus is not essential for the assembly of rat Eag1 potassium channels. // *J. Biol. Chem.* 2011. Vol. 286, № 31. P. 27183–27196.
 15. Haitin Y., Carlson A.E., Zagotta W.N. The structural mechanism of KCNH-channel regulation by the eag domain. // *Nature*. 2013. Vol. 501, № 7467. P. 444–448.
 16. Gong Q. et al. Defective assembly and trafficking of mutant HERG channels with C-terminal truncations in long QT syndrome // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2004. Vol. 37, № 6. P. 1225–1233.
 17. Morais Cabral J.H. et al. Crystal structure and functional analysis of the HERG potassium channel N terminus: a eukaryotic PAS domain. // *Cell*. 1998. Vol. 95, № 5. P. 649–655.
 18. Vilorio C.G. et al. Differential effects of amino-terminal distal and proximal domains in the regulation of human erg K⁺channel gating // *Biophys. J.* 2000. Vol. 79, № 1. P. 231–246.
 19. Tobelaim W.S. et al. Competition of calcified calmodulin N lobe and PIP₂ to an LQT mutation site in Kv7.1 channel. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2017. Vol. 114, № 5. P. E869–E878.
 20. Bracey K. et al. Tubulin as a binding partner of the heag2 voltage-gated potassium channel // *J. Membr. Biol.* 2008. Vol. 222, № 3. P. 115–125.
 21. Gustina A.S., Trudeau M.C. HERG potassium channel regulation by the N-terminal eag domain // *Cellular Signalling*. 2012. Vol. 24, № 8. P. 1592–

- 1598.
22. Stevens L., Ju M., Wray D. Roles of surface residues of intracellular domains of heag potassium channels. // *Eur. Biophys. J.* 2009. Vol. 38, № 4. P. 523–532.
 23. Seoh S.A., Busath D.D. Formamidinium-induced dimer stabilization and flicker block behavior in homo- and heterodimer channels formed by gramicidin A and N-acetyl gramicidin A // *Biophys. J.* 1993. Vol. 65, № 5. P. 1817–1827.
 24. Yu F.H. et al. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily // *Pharmacol Rev.* 2005/12/31. 2005. Vol. 57, № 4. P. 387–395.
 25. Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives // *Nature.* 2002/09/06. 2002. Vol. 419, № 6902. P. 35–42.
 26. Jelacic T.M., Sims S.M., Clapham D.E. Functional expression and characterization of G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels containing GIRK3. // *J. Membr. Biol.* 1999. Vol. 169, № 2. P. 123–129.
 27. Trautmann A., Delaporte C., Marty A. Voltage-dependent channels of human muscle cultures // *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* 1986. Vol. 406, № 2. P. 163–172.
 28. Hodgkin A.L., Huxley A.F. Hodgkin, Huxley - 1952 - Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*.pdf // *The Journal of physiology.* 1952.
 29. Sakmann B., Trube G. Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. // *J. Physiol.* 1984. Vol. 347. P. 641–657.
 30. Hagiwara S., Takahashi K. The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of a starfish egg cell // *J. Membr. Biol.* 1974. Vol. 18, № 1. P. 61–80.
 31. Lesage F., Lazdunski M. Molecular and functional properties of two-pore-domain potassium channels. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2000. Vol. 279,

- № 5. P. F793-801.
32. Kaupp U.B., Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82, № 3. P. 769–824.
 33. Craven K.B., Zagotta W.N. CNG AND HCN CHANNELS: Two Peas, One Pod // *Annu. Rev. Physiol.* 2006. Vol. 68, № 1. P. 375–401.
 34. Biel M., Michalakakis S. Cyclic nucleotide-gated channels // *Handb Exp Pharmacol.* 2009. № 191. P. 111–136.
 35. Gutman G. a et al. International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. // *Pharmacol. Rev.* 2005. Vol. 57, № 4. P. 473–508.
 36. Miller C. An overview of the potassium channel family. // *Genome Biol.* 2000. Vol. 1, № 4. P. REVIEWS0004.
 37. Baumann a et al. Structure of the voltage-dependent potassium channel is highly conserved from *Drosophila* to vertebrate central nervous systems. // *EMBO J.* 1988. Vol. 7, № 8. P. 2457–2463.
 38. Hodgkin A.L., Keynes R.D. The potassium permeability of a giant nerve fibre // *J. Physiol.* 1955. Vol. 128, № 1. P. 61–88.
 39. Roux B., Schulten K. Computational studies of membrane channels // *Structure.* 2004. Vol. 12, № 8. P. 1343–1351.
 40. Barros F., Domínguez P., de la Peña P. Cytoplasmic domains and voltage-dependent potassium channel gating // *Front. Pharmacol.* 2012. Vol. 3 MAR.
 41. Gulbis J.M., Mann S., MacKinnon R. Structure of a voltage-dependent K⁺ channel beta subunit // *Cell.* 1999. Vol. 97, № 7. P. 943–952.
 42. Kreuzsch A., Pfaffinger P.J., Choe S. the Shaker potassium channel // *Nature.* 1998. Vol. 392, № April. P. 945–948.
 43. Pischalnikova A. V., Sokolova O.S. The domain and conformational organization in potassium voltage-gated ion channels // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2009. Vol. 4. P. 71–82.
 44. Warmke J., Drysdale R., Ganetzky B. A distinct potassium channel polypeptide encoded by the *Drosophila* eag locus. // *Science.* 1991. Vol. 252,

- № 5012. P. 1560–1562.
45. Warmke J.W., Ganetzky B. A family of potassium channel genes related to eag in *Drosophila* and mammals. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994. Vol. 91, № 8. P. 3438–3442.
 46. Occhiodoro T. et al. Cloning of a human ether-a-go-go potassium channel expressed in myoblasts at the onset of fusion // *FEBS Lett.* 1998. Vol. 434. P. 177–182.
 47. Ziechner U. et al. Inhibition of human ether à go-go potassium channels by Ca²⁺/calmodulin binding to the cytosolic N- and C-termini // *FEBS J.* 2006. Vol. 273, № 5. P. 1074–1086.
 48. Schönherr R., Löber K., Heinemann S.H. Inhibition of human ether à go-go potassium channels by Ca(2+)/calmodulin. // *EMBO J.* 2000. Vol. 19, № 13. P. 3263–3271.
 49. Brelidze T.I. et al. Structure of the carboxy-terminal region of a KCNH channel. // *Nature.* 2012. Vol. 481, № 7382. P. 530–533.
 50. Sokolova O.S. et al. Three-Dimensional Structure of Human Voltage-Gated Ion Channel Kv10.2 Studied by Electron Microscopy of Macromolecules and Molecular Modeling // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2012. Vol. 38, № 2. P. 152–158.
 51. Kobertz W.R., Miller C. K⁺ channels lacking the “tetramerization” domain: Implications for pore structure // *Nat. Struct. Biol.* 1999. Vol. 6, № 12. P. 1122–1125.
 52. Lee C.H., MacKinnon R. Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel // *Cell.* 2017. Vol. 168, № 1–2. P. 111–120.e11.
 53. Wang W., Mackinnon R., Mackinnon R. Cryo-EM Structure of the Open Human Ether-A-go-go-Related K⁺ Channel hERG // *Cell.* 2017. Vol. 169. P. 422–430.
 54. Whicher J.R., MacKinnon R. Structure of the voltage-gated K⁺ channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism // *Science (80-.).* 2016. Vol. 353, № 6300. P. 664–669.

55. London B. et al. Two isoforms of the mouse ether-a-go-go-related gene coassemble to form channels with properties similar to the rapidly activating component of the cardiac delayed rectifier K⁺ current // *Circ Res.* 1997. Vol. 81, № 5. P. 870–878.
56. Lees-Miller J.P. et al. Electrophysiological characterization of an alternatively processed ERG K⁺ channel in mouse and human hearts // *Circ Res.* 1997. Vol. 81, № 5. P. 719–726.
57. Gustina A.S., Trudeau M.C. hERG potassium channel gating is mediated by N- and C-terminal region interactions // *J Gen Physiol.* 2011. Vol. 137, № 3. P. 315–325.
58. Terlau H. et al. Amino terminal-dependent gating of the potassium channel rat eag is compensated by a mutation in the S4 segment // *J. Physiol.* 1997. Vol. 502, № 3. P. 537–543.
59. Marques-Carvalho M.J. et al. Structural, biochemical, and functional characterization of the cyclic nucleotide binding homology domain from the mouse EAG1 potassium channel. // *J. Mol. Biol.* 2012. Vol. 423, № 1. P. 34–46.
60. Jenke M. et al. C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels // *EMBO J.* 2003. Vol. 22, № 3. P. 395–403.
61. Ludwig J., Owen D., Pongs O. Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-a-go-go potassium channel // *EMBO J.* 1997. Vol. 16, № 21. P. 6337–6345.
62. Lin T.F. et al. The subfamily-specific assembly of Eag and Erg K⁺ channels is determined by both the amino and the carboxyl recognition domains // *J. Biol. Chem.* 2014. Vol. 289, № 33. P. 22815–22834.
63. Chuang C.-C. et al. The punctate localization of rat Eag1 K⁺ channels is conferred by the proximal post-CNBHD region // *BMC Neurosci.* 2014. Vol. 15, № 1. P. 23.
64. Cushman S.J. et al. Voltage dependent activation of potassium channels is

- coupled to T1 domain structure // *Nat. Struct. Biol.* 2000. Vol. 7, № 5. P. 403–407.
65. Kobrinsky E. et al. Molecular rearrangements of the Kv2.1 potassium channel termini associated with voltage gating // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 28. P. 19233–19240.
 66. Haitin Y. et al. Intracellular domains interactions and gated motions of IKS potassium channel subunits // *EMBO J.* 2009. Vol. 28, № 14. P. 1994–2005.
 67. Paulussen A. et al. A novel mutation (T65P) in the PAS domain of the human potassium channel HERG results in the long QT syndrome by trafficking deficiency // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 50. P. 48610–48616.
 68. Ben-Johny M., Yue D.T. Calmodulin regulation (calmodulation) of voltage-gated calcium channels // *J. Gen. Physiol.* 2014. Vol. 143, № 6. P. 679–692.
 69. Zaydman M.A. et al. Kv7.1 ion channels require a lipid to couple voltage sensing to pore opening. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013. Vol. 110, № 32. P. 13180–13185.
 70. Gonçalves T.J., Stühmer W. Calmodulin interaction with heag1 visualized by fret microscopy // *PLoS One.* 2010. Vol. 5, № 5.
 71. Yellen G. The voltage-gated potassium channels and their relatives // *Nature.* 2002. Vol. 419, № 6902. P. 35–42.
 72. Hoshi T., Zagotta W.N., Aldrich R.W. Biophysical and molecular mechanisms of Shaker potassium channel inactivation. // *Science (80-.).* 1990. Vol. 250, № 4980. P. 533–538.
 73. Rasmusson R.L. et al. Inactivation of voltage-gated cardiac K⁺ channels // *Circ Res.* 1998. Vol. 82, № 7. P. 739–750.
 74. Goldstein S.A., Miller C. A point mutation in a Shaker K⁺ channel changes its charybdotoxin binding site from low to high affinity // *Biophys. J.* 1992/04/01. 1992. Vol. 62, № 1. P. 5–7.
 75. Gandhi C.S., Isacoff E.Y. Molecular models of voltage sensing // *J. Gen. Physiol.* 2002/10/03. 2002. Vol. 120, № 4. P. 455–463.
 76. Li-Smerin Y., Hackos D.H., Swartz K.J. A localized interaction surface for

- voltage-sensing domains on the pore domain of a K⁺ channel // *Neuron*. 2000/03/17. 2000. Vol. 25, № 2. P. 411–423.
77. Schonherr R. et al. Conformational switch between slow and fast gating modes: allosteric regulation of voltage sensor mobility in the EAG K⁺ channel // *Neuron*. 2002/10/10. 2002. Vol. 35, № 5. P. 935–949.
 78. Schoppa N.E. et al. The size of gating charge in wild-type and mutant Shaker potassium channels // *Science* (80-). 1992/03/27. 1992. Vol. 255, № 5052. P. 1712–1715.
 79. Seoh S.A. et al. Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel // *Neuron*. 1996/06/01. 1996. Vol. 16, № 6. P. 1159–1167.
 80. Aggarwal S.K., MacKinnon R. Contribution of the S4 segment to gating charge in the Shaker K⁺ channel // *Neuron*. 1996/06/01. 1996. Vol. 16, № 6. P. 1169–1177.
 81. Starace D.M., Stefani E., Bezanilla F. Voltage-dependent proton transport by the voltage sensor of the Shaker K⁺ channel // *Neuron*. 1998/01/14. 1997. Vol. 19, № 6. P. 1319–1327.
 82. Starace D.M., Bezanilla F. Histidine scanning mutagenesis of basic residues of the S4 segment of the shaker k⁺ channel // *J. Gen. Physiol.* 2001/05/02. 2001. Vol. 117, № 5. P. 469–490.
 83. Larsson H.P. et al. Transmembrane movement of the shaker K⁺ channel S4 // *Neuron*. 1996/02/01. 1996. Vol. 16, № 2. P. 387–397.
 84. Baker O.S. et al. Three transmembrane conformations and sequence-dependent displacement of the S4 domain in shaker K⁺ channel gating // *Neuron*. 1998/07/09. 1998. Vol. 20, № 6. P. 1283–1294.
 85. Papazian D.M. et al. Electrostatic interactions of S4 voltage sensor in Shaker K⁺ channel // *Neuron*. 1995/06/01. 1995. Vol. 14, № 6. P. 1293–1301.
 86. Tiwari-Woodruff S.K. et al. Electrostatic interactions between transmembrane segments mediate folding of Shaker K⁺ channel subunits // *Biophys. J.* 1997/04/01. 1997. Vol. 72, № 4. P. 1489–1500.

87. Tiwari-Woodruff S.K. et al. Voltage-dependent structural interactions in the Shaker K(+) channel // *J. Gen. Physiol.* 2000/02/02. 2000. Vol. 115, № 2. P. 123–138.
88. Li-Smerin Y., Hackos D.H., Swartz K.J. alpha-helical structural elements within the voltage-sensing domains of a K(+) channel // *J. Gen. Physiol.* 1999/12/30. 2000. Vol. 115, № 1. P. 33–50.
89. Gandhi C.S. et al. The orientation and molecular movement of a k(+) channel voltage-sensing domain // *Neuron.* 2003/12/04. 2003. Vol. 40, № 3. P. 515–525.
90. Elinder F., Mannikko R., Larsson H.P. S4 charges move close to residues in the pore domain during activation in a K channel // *J. Gen. Physiol.* 2001/06/29. 2001. Vol. 118, № 1. P. 1–10.
91. Elinder F., Arhem P., Larsson H.P. Localization of the extracellular end of the voltage sensor S4 in a potassium channel // *Biophys. J.* 2001/03/22. 2001. Vol. 80, № 4. P. 1802–1809.
92. Laine M. et al. Atomic proximity between S4 segment and pore domain in Shaker potassium channels // *Neuron.* 2003/08/05. 2003. Vol. 39, № 3. P. 467–481.
93. Mannuzzu L.M., Moronne M.M., Isacoff E.Y. Direct physical measure of conformational rearrangement underlying potassium channel gating // *Science* (80-.). 1996/01/12. 1996. Vol. 271, № 5246. P. 213–216.
94. Yusaf S.P., Wray D., Sivaprasadarao A. Measurement of the movement of the S4 segment during the activation of a voltage-gated potassium channel // *Pflugers Arch.* 1996/11/01. 1996. Vol. 433, № 1–2. P. 91–97.
95. Cha A. et al. Voltage sensors in domains III and IV, but not I and II, are immobilized by Na⁺ channel fast inactivation // *Neuron.* 1999/02/23. 1999. Vol. 22, № 1. P. 73–87.
96. Glauner K.S. et al. Spectroscopic mapping of voltage sensor movement in the Shaker potassium channel // *Nature.* 2000/01/05. 1999. Vol. 402, № 6763. P. 813–817.

97. Bezanilla F., Perozo E., Stefani E. Gating of Shaker K⁺ channels: II. The components of gating currents and a model of channel activation // *Biophys. J.* 1994/04/01. 1994. Vol. 66, № 4. P. 1011–1021.
98. Chen X. et al. Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010/06/11. 2010. Vol. 107, № 25. P. 11352–11357.
99. Pathak M.M. et al. Closing in on the resting state of the Shaker K(+) channel // *Neuron.* 2007/10/09. 2007. Vol. 56, № 1. P. 124–140.
100. Horn R., Ding S., Gruber H.J. Immobilizing the moving parts of voltage-gated ion channels // *J. Gen. Physiol.* 2000/08/30. 2000. Vol. 116, № 3. P. 461–476.
101. del Camino D., Kanevsky M., Yellen G. Status of the intracellular gate in the activated-not-open state of shaker K⁺ channels // *J. Gen. Physiol.* 2005/11/02. 2005. Vol. 126, № 5. P. 419–428.
102. Pathak M. et al. The cooperative voltage sensor motion that gates a potassium channel // *J. Gen. Physiol.* 2004/12/30. 2005. Vol. 125, № 1. P. 57–69.
103. Zagotta W.N., Hoshi T., Aldrich R.W. Shaker potassium channel gating. III: Evaluation of kinetic models for activation // *J. Gen. Physiol.* 1994/02/01. 1994. Vol. 103, № 2. P. 321–362.
104. Tao J., Huang X.G., Zhu J.H. A wavelength demultiplexing structure based on metal-dielectric-metal plasmonic nano-capillary resonators // *Opt Express.* 2010/07/01. 2010. Vol. 18, № 11. P. 11111–11116.
105. Tao X. et al. A gating charge transfer center in voltage sensors // *Science (80-)*. 2010/04/03. 2010. Vol. 328, № 5974. P. 67–73.
106. Delemotte L. et al. Intermediate states of the Kv1.2 voltage sensor from atomistic molecular dynamics simulations // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2011/03/30. 2011. Vol. 108, № 15. P. 6109–6114.
107. Jensen M.O. et al. Mechanism of voltage gating in potassium channels // *Science (80-)*. 2012/04/14. 2012. Vol. 336, № 6078. P. 229–233.

108. Tao X., MacKinnon R. Functional analysis of Kv1.2 and paddle chimera Kv channels in planar lipid bilayers // *J. Mol. Biol.* 2008/07/22. 2008. Vol. 382, № 1. P. 24–33.
109. Thomas D. et al. Inhibition of human ether-a-go-go-related gene potassium channels by alpha 1-adrenoceptor antagonists prazosin, doxazosin, and terazosin // *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 2004/04/21. 2004. Vol. 369, № 5. P. 462–472.
110. Ikeda M. et al. Identification of novel candidate genes for treatment response to risperidone and susceptibility for schizophrenia: integrated analysis among pharmacogenomics, mouse expression, and genetic case-control association approaches // *Biol. Psychiatry.* 2009/10/24. 2010. Vol. 67, № 3. P. 263–269.
111. Watanabe H. et al. Disruption of the epilepsy KCNQ2 gene results in neural hyperexcitability // *J Neurochem.* 2000. Vol. 75, № 1. P. 28–33.
112. Madin K. et al. Formation of circular polyribosomes in wheat germ cell-free protein synthesis system // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 562, № 1–3. P. 155–159.
113. Jensen M.O. et al. Principles of conduction and hydrophobic gating in K⁺ channels // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2010/03/17. 2010. Vol. 107, № 13. P. 5833–5838.
114. Schwarz T.L. et al. Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the Shaker locus in *Drosophila* // *Nature.* 1988/01/14. 1988. Vol. 331, № 6152. P. 137–142.
115. Sun J., MacKinnon R. Cryo-EM Structure of a KCNQ1/CaM Complex Reveals Insights into Congenital Long QT Syndrome // *Cell.* 2017. Vol. 169, № 6. P. 1042–1050.e9.
116. Ferrer T. et al. The S4-S5 linker directly couples voltage sensor movement to the activation gate in the human ether-a'-go-go-related gene (hERG) K⁺ channel // *J. Biol. Chem.* 2006. Vol. 281, № 18. P. 12858–12864.
117. Vandenberg J.I. et al. hERG K⁺ Channels: Structure, Function, and Clinical Significance // *Physiol. Rev.* 2012. Vol. 92, № 3. P. 1393–1478.
118. Zhang K.P., Yang B.F., Li B.X. Translational toxicology and rescue

- strategies of the hERG channel dysfunction: Biochemical and molecular mechanistic aspects // *Acta Pharmacologica Sinica*. 2014. Vol. 35, № 12. P. 1473–1484.
119. Delisle B.P. et al. Small GTPase determinants for the golgi processing and plasmalemmal expression of human ether-a-go-go related (hERG) K⁺ channels // *J. Biol. Chem.* 2009. Vol. 284, № 5. P. 2844–2853.
 120. Walker V.E. et al. Hsp40 chaperones promote degradation of the hERG potassium channel // *J. Biol. Chem.* 2010. Vol. 285, № 5. P. 3319–3329.
 121. Ficker E. et al. Role of the cytosolic chaperones Hsp70 and Hsp90 in maturation of the cardiac potassium channel HERG. // *Circ. Res.* 2003. Vol. 92, № 12. P. e87-100.
 122. Kupersmidt S. et al. Defective human ether-à-go-go-related gene trafficking linked to an endoplasmic reticulum retention signal in the C terminus // *J. Biol. Chem.* 2002. Vol. 277, № 30. P. 27442–27448.
 123. Gong Q. Pharmacological rescue of trafficking defective HERG channels formed by coassembly of wild-type and long QT mutant N470D subunits // *AJP Hear. Circ. Physiol.* 2004. Vol. 287, № 2. P. H652–H658.
 124. Dahimène S. et al. The N-terminal juxtamembranous domain of KCNQ1 is critical for channel surface expression: Implications in the Romano-Ward LQT1 syndrome // *Circ. Res.* 2006. Vol. 99, № 10. P. 1076–1083.
 125. Akhavan A., Atanasiu R., Shrier A. Identification of a COOH-terminal segment involved in maturation and stability of human ether-a-go-go-related gene potassium channels // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 41. P. 40105–40112.
 126. Fox P.D., Loftus R.J., Tamkun M.M. Regulation of Kv2.1 K⁺ Conductance by Cell Surface Channel Density // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33, № 3. P. 1259–1270.
 127. Rasband M.N., Trimmer J.S. Developmental clustering of ion channels at and near the node of Ranvier. // *Dev. Biol.* 2001. Vol. 236, № 1. P. 5–16.
 128. Rasband M.N. et al. Dependence of nodal sodium channel clustering on

- paranodal axoglial contact in the developing CNS. // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19, № 17. P. 7516–7528.
129. Wang H. et al. Heteromultimeric K⁺ channels in terminal and juxtaparanodal regions of neurons. // *Nature.* 1993. Vol. 365, № 6441. P. 75–79.
130. Vabnick I. et al. Dynamic potassium channel distributions during axonal development prevent aberrant firing patterns. // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19, № 2. P. 747–758.
131. Baba H. et al. Completion of myelin compaction, but not the attachment of oligodendroglial processes triggers K(+) channel clustering. // *J. Neurosci. Res.* 1999. Vol. 58, № August. P. 752–764.
132. King A.N., Manning C.F., Trimmer J.S. A unique ion channel clustering domain on the axon initial segment of mammalian neurons // *J. Comp. Neurol.* 2014. Vol. 522, № 11. P. 2594–2608.
133. Zhou D. et al. Ankyrin(G) is required for clustering of voltage-gated Na channels at axon initial segments and for normal action potential firing // *J. Cell Biol.* 1998. Vol. 143, № 5. P. 1295–1304.
134. Gómez-Varela D. et al. Characterization of Eag1 channel lateral mobility in rat hippocampal cultures by single-particle-tracking with quantum dots // *PLoS One.* 2010. Vol. 5, № 1.
135. Bennett V., Baines A.J. Spectrin and Ankyrin-Based Pathways: Metazoan Inventions for Integrating Cells Into Tissues // *Physiol Rev.* 2001. Vol. 81, № 3. P. 1353–1392.
136. Tamkun M.M., O'connell K.M.S., Rolig A.S. A cytoskeletal-based perimeter fence selectively corrals a sub-population of cell surface Kv2.1 channels. // *J. Cell Sci.* 2007. Vol. 120, № Pt 14. P. 2413–2423.
137. Martin S. et al. Eag1 potassium channel immunohistochemistry in the CNS of adult rat and selected regions of human brain // *Neuroscience.* 2008. Vol. 155, № 3. P. 833–844.
138. Jow G.M., Jeng C.J. Differential localization of rat Eag1 and Eag2 potassium channels in the retina // *Neurosci. Lett.* 2008. Vol. 431, № 1. P. 12–16.

139. Wonderlin W.F., Strobl J.S. Potassium Channels, Proliferation and G1 Progression // *J. Membr. Biol. Membr. Biol.* 1996. Vol. 107. P. 91–107.
140. Meyer R., Heinemann S.H. Characterization of an eag-like potassium channel in human neuroblastoma cells. // *J. Physiol.* 1998. Vol. 508 (Pt 1. P. 49–56.
141. Crociani O. et al. Cell cycle-dependent expression of HERG1 and HERG1B isoforms in tumor cells // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 5. P. 2947–2955.
142. Hegle A.P., Marble D.D., Wilson G.F. A voltage-driven switch for ion-independent signaling by ether-à-go-go K⁺ channels. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006. Vol. 103, № 8. P. 2886–2891.
143. Miloshevsky G. V., Jordan P.C. Permeation in ion channels: The interplay of structure and theory // *Trends in Neurosciences.* 2004. Vol. 27, № 6. P. 308–314.
144. Koeppe R.E., Anderson O.S. Engineering the gramicidin channel. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1996. Vol. 25. P. 231–258.
145. Kelkar D.A., Chattopadhyay A. The gramicidin ion channel: A model membrane protein // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 2007. Vol. 1768, № 9. P. 2011–2025.
146. Kelkar D.A., Chattopadhyay A. Monitoring ion channel conformations in membranes utilizing a novel dual fluorescence quenching approach // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. Vol. 343, № 2. P. 483–488.
147. Lundbaek J.A. et al. Lipid bilayer regulation of membrane protein function: gramicidin channels as molecular force probes // *J. R. Soc. Interface.* 2010. Vol. 7, № 44. P. 373–395.
148. Kemp G., Jacobson K.A., Wenner C.E. Solution and interfacial properties of gramicidin pertinent to its effect on membranes // *BBA - Biomembr.* 1972. Vol. 255, № 2. P. 493–501.
149. Urry D.W. The Gramicidin A Transmembrane Channel: A Proposed 7r(L,D) Helix // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1971. Vol. 68, № 3. P. 672–676.
150. Prasad B.V.V., Chandrasekaran R. Conformation of polypeptide-chains

- containing both L-residues and D-residues .2. Double-helical structures of poly-LD-peptides // International Journal of Peptide and Protein Research. 1977. Vol. 10, № 2. P. 129–138.
151. Wallace B.A. Structure of gramicidin A // Biophys. J. 1986. Vol. 49, № 1. P. 295–306.
152. Bamberg E., Apell H.J., Alpes H. Structure of the gramicidin A channel: Discrimination between the $\pi(L,D)$ and the β helix by electrical measurements with lipid bilayer membranes // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1977. Vol. 74, № 6. P. 2402–2406.
153. Myers V.B., Haydon D.A. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. II. The ion selectivity // BBA - Biomembr. 1972. Vol. 274, № 2. P. 313–322.
154. Arseniev A.S. et al. ¹H-NMR study of gramicidin A transmembrane ion channel. Head-to-head right-handed, single-stranded helices // FEBS Lett. 1985. Vol. 186, № 2. P. 168–174.
155. Killian J.A. et al. The Membrane as an Environment of Minimal Interconversion: A Circular Dichroism Study on the Solvent Dependence of the Conformational Behavior of Gramicidin in Diacylphosphatidylcholine Model Membranes // Biochemistry. 1988. Vol. 27, № 13. P. 4848–4855.
156. Zein M., Winter R. Effect of temperature, pressure and lipid acyl chain length on the structure and phase behaviour of phospholipid–gramicidin bilayers // Phys. Chem. Chem. Phys. 2000. Vol. 2, № 20. P. 4545–4551.
157. Burley S.K., Petsko G.A. Aromatic-aromatic interaction: a mechanism of protein structure stabilization. // Science (80-.). 1985. Vol. 229, № 4708. P. 23–28.
158. Burley S.K., Petsko G.A. Weakly Polar Interactions In Proteins // Adv. Protein Chem. 1988. Vol. 39, № C. P. 125–189.
159. Cotten M., Xu F., Cross T.A. Protein stability and conformational rearrangements in lipid bilayers: Linear gramicidin, a model system // Biophys. J. 1997. Vol. 73, № 2. P. 614–623.

160. O'Connell A., Koeppe R., Andersen O. Kinetics of gramicidin channel formation in lipid bilayers: transmembrane monomer association // *Science* (80-.). 1990. Vol. 250, № 4985. P. 1256–1259.
161. Elliott J.R. et al. The effects of bilayer thickness and tension on gramicidin single-channel lifetime // *BBA - Biomembr.* 1983. Vol. 735, № 1. P. 95–103.
162. Lundbæk J.A. et al. Membrane stiffness and channel function // *Biochemistry.* 1996. Vol. 35, № 12. P. 3825–3830.
163. Huang H.W. Deformation free energy of bilayer membrane and its effect on gramicidin channel lifetime // *Biophys. J.* 1986. Vol. 50, № 6. P. 1061–1070.
164. Wallace B.A. Common structural features in gramicidin and other ion channels. // *Bioessays.* 2000. Vol. 22, № 3. P. 227–234.
165. Wallace B.A. X-ray crystallographic structures of gramicidin and their relation to the *Streptomyces lividans* potassium channel structure // *Novartis.Found.Symp.* 1999. Vol. 225, № 1528–2511 (Print) LA–eng PT–Comparative Study PT–Journal Article PT–Review RN–0 (Anti–Bacterial Agents) RN–0 (Potassium Channels) RN–1405–97–6 (Gramicidin) SB–IM. P. 23–32.
166. Valiyaveetil F.I. et al. Glycine as a D-amino acid surrogate in the K⁺-selectivity filter // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101, № 49. P. 17045–17049.
167. Schindelin J. et al. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis // *Nature Methods.* 2012. Vol. 9, № 7. P. 676–682.
168. Sokolova O., Kolmakova-Partensky L., Grigorieff N. Three-dimensional structure of a voltage-gated potassium channel at 2.5 nm resolution // *Structure.* 2001. Vol. 9, № 3. P. 215–220.
169. Bell J.M. et al. High resolution single particle refinement in EMAN2.1 // *Methods.* 2016. Vol. 100. P. 25–34.
170. Goddard T.D., Huang C.C., Ferrin T.E. Visualizing density maps with UCSF Chimera // *J. Struct. Biol.* 2007. Vol. 157, № 1. P. 281–287.
171. van Heel M. et al. A new generation of the IMAGIC image processing

- system. // *J. Struct. Biol.* 1996. Vol. 116, № 1. P. 17–24.
172. Antonenko Y.N. et al. Gramicidin A disassembles large conductive clusters of its lysine-substituted derivatives in lipid membranes // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2015. Vol. 17, № 26. P. 17461–17470.
173. Jensen M., Mouritsen O.G. Lipids do influence protein function - The hydrophobic matching hypothesis revisited // *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes.* 2004. Vol. 1666, № 1–2. P. 205–226.
174. Cvetkovic A. et al. Relation between pore sizes of protein crystals and anisotropic solute diffusivities // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. Vol. 127, № 3. P. 875–879.
175. Zhao Y. et al. Patch clamp technique: review of the current state of the art and potential contributions from nanoengineering // *Proc. Inst. Mech. Eng. Part N J. Nanoeng. Nanosyst.* 2009. Vol. 222, № 1. P. 1–11.
176. Yang Y. et al. Multistate Structural Modeling and Voltage-Clamp Analysis of Epilepsy/Autism Mutation Kv10.2-R327H Demonstrate the Role of This Residue in Stabilizing the Channel Closed State // *J. Neurosci.* 2013. Vol. 33, № 42. P. 16586–16593.
177. Smart S.L. et al. Deletion of the K(V)1.1 potassium channel causes epilepsy in mice. // *Neuron.* 1998. Vol. 20, № 4. P. 809–819.
178. Wang J., Myers C.D., Robertson G. a. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K(+) channels. // *J. Gen. Physiol.* 2000. Vol. 115, № 6. P. 749–758.
179. Ke Y. et al. (7) Trafficking defects in PAS domain mutant Kv11.1 channels: roles of reduced domain stability and altered domain-domain interactions // *Biochem J.* 2013. Vol. 454, № 1. P. 69–77.
180. Fernández-Trillo J. et al. Molecular determinants of interactions between the N-terminal domain and the transmembrane core that modulate hERG K⁺ channel gating // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 9.
181. D'Avanzo N., Pekhletski R., Backx P.H. P-loop residues critical for selectivity in K⁺ channels fail to confer selectivity to rabbit HCN4 channels

- // PLoS One. 2009. Vol. 4, № 11.
182. Cubeddu L.X. Drug-induced Inhibition and Trafficking Disruption of ion Channels: Pathogenesis of QT Abnormalities and Drug-induced Fatal Arrhythmias. // *Curr. Cardiol. Rev.* 2016. Vol. 12, № 2. P. 141–154.
 183. Kanner E.M., Friedlander M., Simon S.M. Co-translational targeting and translocation of the amino terminus of opsin across the endoplasmic membrane requires GTP but not ATP // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 10. P. 7920–7926.
 184. Zhou Z. et al. HERG channel dysfunction in human long QT syndrome. Intracellular transport and functional defects // *J. Biol. Chem.* 1998. Vol. 273, № 33. P. 21061–21066.
 185. Jürgens G. MEMBRANE TRAFFICKING IN PLANTS // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004. Vol. 20, № 1. P. 481–504.
 186. Karlova M.G. et al. In vitro fluorescence assay to study the folding of Kv ion channels // *Biophysics (Oxf).* 2011. Vol. 56, № 2. P. 243–249.
 187. Zhang Y. et al. Kv3.3 Channels Bind Hax-1 and Arp2/3 to Assemble a Stable Local Actin Network that Regulates Channel Gating // *Cell.* 2016. Vol. 165, № 2. P. 434–448.
 188. Hill A.S. et al. Ion channel clustering at the axon initial segment and node of ranvier evolved sequentially in early chordates // *PLoS Genet.* 2008. Vol. 4, № 12.
 189. Pan Z. et al. A common ankyrin-G-based mechanism retains KCNQ and NaV channels at electrically active domains of the axon. // *J. Neurosci.* 2006. Vol. 26, № 10. P. 2599–2613.
 190. Choveau F.S. et al. Opposite effects of the S4-S5 linker and PIP2 on voltage-gated channel function: KCNQ1/KCNE1 and other channels // *Front. Pharmacol.* 2012. Vol. 3 JUL.
 191. Shen H. et al. Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution // *Science (80-.).* 2017. Vol. 355, № 6328. P. eaal4326.
 192. Ma L.J., Ohmert I., Vardanyan V. Allosteric features of KCNQ1 gating

- revealed by alanine scanning mutagenesis // *Biophys. J.* 2011. Vol. 100, № 4. P. 885–894.
193. Osteen J.D. et al. Allosteric gating mechanism underlies the flexible gating of KCNQ1 potassium channels // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Vol. 109, № 18. P. 7103–7108.
194. Vardanyan V., Pongs O. Coupling of voltage-sensors to the channel pore: A comparative view // *Front. Pharmacol.* 2012. Vol. 3 JUL.
195. Wang J., Myers C.D., Robertson G.A. Dynamic control of deactivation gating by a soluble amino-terminal domain in HERG K(+) channels. // *J. Gen. Physiol.* 2000. Vol. 115, № 6. P. 749–758.