

СТРОЕНИЕ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО КАЛИЕВОГО ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО КАНАЛА Kv10.2 С УДАЛЕННЫМ ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИМ ДОМЕНОМ PAS

© 2016 г. Г.С. Глухов*, А.В. Попинако**, А.В. Гризель***,
К.В. Шайтан* ****, О.С. Соколова*

*Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1;

**Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,
119071, Москва, Ленинский просп., 33/2;

***Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9;

****Институт химической физики им. Н.Н. Семенова, 119991, Москва, ул. Косыгина, 4

E-mail: shaytan49@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.04.16 г.

Изучено строение человеческого калиевого потенциал-зависимого канала Kv10.2 с удаленным цитоплазматическим N-концевым PAS-доменом, а также распределение его в культивируемых клетках. Белок канала был экспрессирован в клетках линии COS7 и очищен с помощью аффинной хроматографии. Распределение канала на поверхности клеток определяли иммунофлуоресцентным методом с помощью антител против его С-конца. Показано, что удаление PAS-домена приводит к уменьшению экспрессии канала на поверхности клеток. Для интерпретации расположения цитоплазматических доменов, канала структуру белка с удаленным PAS-доменом, рассчитанную по данным электронной микроскопии, сравнивали с полученной ранее структурой полноразмерного канала. Показано, что в канале Kv10.2 при отсутствии N-концевого PAS-домена С-концевой CNBD-домен подвергается конформационной перестройке.

Ключевые слова: ионный канал, электронная микроскопия, пространственная структура белков.

Ионные каналы отвечают за электрическую активность в различных типах клеток животных. Ионные каналы содержатся в клетках всех тканей человеческого организма, однако больше всего их в центральной нервной системе, сердце, мышцах. В различных тканях человека функционируют ионные каналы, имеющие различную структуру. С каждым годом число описанных ионных каналов увеличивается, а количество подтипов одного вида каналов с учетом особенностей их молекулярного строения и фармакологических свойств возрастает многократно.

К наиболее интенсивно изучаемым семействам каналов Kv относятся Kv1 (*Shaker*), Kv2 (*Shab*), Kv4 (*Shal*), Kv7 (KVLOQ) и Kv10-12 (*Ether-a-go-go*) [1]. Все Kv-каналы имеют сходную молекулярную архитектуру: это тетрамеры, каждая субъединица которого содержит шесть трансмембранных участков, S1–S6, включая сенсор мембранного потенциала S4 [2].

Субсемейство *Ether-a-go-go* (Kv10-12) характеризуется наличием длинных N- и С-концевых последовательностей, которые подразделяются

на несколько структурных доменов. На N-конце канала располагается PAS-домен (Per-Arnt-Sim) (135 а.о.). Его функция состоит в активации канала [3,4], этот домен также очень важен для изменения скорости дезактивации, возможно, путем непосредственного связывания с участком вблизи линкера S4–S5 [5–8]. Кристаллическая структура PAS-домена была определена для канала *herg* (Kv11) [5].

На С-конце расположен домен связывания циклических нуклеотидов (сNBD). Этот домен найден в других, более отдаленных по родству каналах: калиевых каналах растений ATK и KAT, и каналах, активируемых с помощью гиперполяризации и зависимых от циклических нуклеотидов (HCN). Недавно была определена трехмерная кристаллическая структура домена сNBD каналов HCN [9] и HCN1 [10]. Делеция С-конца приводит к синтезу нефункционального калиевого канала.

Ранее с помощью электронной микроскопии макромолекул мы определили трехмерную структуру полноразмерного канала Kv10.2 [11] и показали, что массивный цитоплазматический

домен каждого мономера включает два субдомена. Целью данной работы было выяснить расположение PAS- и CNBD-доменов в составе канала и изучить функции PAS-доменов в ходе экспрессии белка канала в эукариотических клетках.

МЕТОДЫ

Получение ДНК транскрированного канала. Нарботка плазмиды осуществлялась в штамме *DH5 α* . Выделение плазмид для транзientной трансфекции эукариотических клеток проводили с помощью стандартного метода щелочного лизиса [12]. Рабочая концентрация плазмид для трансформации составила от 5 до 9 мкг/мкл.

Экспрессия и очистка транскрированного канала. Для транзientной экспрессии калиевых каналов Kv10.2PAS была использована линия эукариотических клеток *COS7*. Клетки выращивали в чашках Петри на среде DMEM high glucose (HyClone, США) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Клетки трансфецировали плазмидой pDNA6 5V-his, кодирующей канал Kv10.2 с удаленным PAS-доменом, с помощью электропорации на аппарате Gene Pulser Xcell (BioRad, США) согласно инструкции производителя. Конечная концентрация плазмиды составила 50 мг/мл.

После трансфекции клетки культивировали в течение 48 ч, промывали холодным фосфатно-солевым буфером и добавляли лизис-буфер (20 mM HEPES, 2,5% CHAPS), все процедуры проводили на льду или при 4°C в присутствии ингибиторов протеаз (Roche, Швейцария). Очистку белка проводили с помощью аффинной хроматографии на активированной бромцианом агарозе с пришитыми 1D4 антителами, как описано в работе [11]. Элюцию белка осуществляли 1D4 пептидом (AmericanPeptide, США) в концентрации 2 мг/мл. Наличие в образце белка канала определяли методом вестерн-блоттинга при помощи антител против последовательности 1D4 (Abcam, Великобритания).

Флуоресцентная микроскопия. После электропорации клетки выращивали на круглых 24-мм покровных стеклах в шестилуночных планшетах (концентрация $1 \cdot 10^6$ клеток на лунку) в течение 22–24 ч в 2 мл среды DMEM high glucose с добавлением 10% фетальной сыворотки. Через 24 ч после трансфекции заменяли питательную среду свежей, инкубировали еще 24 ч. Спустя 48 ч после электропорации клетки фиксировали 2% параформальдегидом, мембраны пермеабелизовали 0,1% раствором тритона X-100. В качестве первичных антител использовали антитела к 1D4, вторичные антитела,

меченые AlexaFluor 488 (Abcam, Великобритания). Для детекции флуоресцентного сигнала применяли флуоресцентный микроскоп Axio Lab.A1 (Zeiss, Германия) с ПЗС-камерой (Nikon, Япония). Изображения обрабатывали с помощью программы ImageJ (<https://imagej.nih.gov>).

Электронная микроскопия макромолекул. Очищенный белок канала в количестве 3 мкл сразу же наносили на сеточки для электронной микроскопии, покрытые углеродной пленкой и обработанные в атмосфере тлеющего разряда, и окрашивали на каплях (40 мкл) 1% раствора уранилацетата два раза по 30 с.

Изображения Kv10.2PAS получали в электронном микроскопе JEOL 2100 (JEOL, Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения регистрировали с помощью ПЗС-камеры (Gatan, США) с увеличением 40000 и дефокусом 1,4–1,9 мкм.

Отбор изображений отдельных одиночных каналов проводили в полуавтоматическом режиме с помощью программы BOXER [13], при этом для каждой молекулы из электронной микрофотографии вырезали квадрат размером 64 × 64 пикселя, содержащий проекцию канала. Всего было отобрано 4000 изображений канала Kv10.2PAS. Изображения были отфильтрованы от шума, нормализованы и выровнены по центру, после чего разбиты на классы с помощью программы EMAN2 [13]. Каждый класс содержит находящиеся в одной ориентации изображения канала. Суммирование их в одно приводит к увеличению интенсивности сигнала и снижению шума. Суммированные изображения классов лучшего качества, включающие большее количество частиц каналов, были использованы для расчета начальной трехмерной структуры с помощью угловой реконструкции [14].

После создания предварительной трехмерной структуры были получены ее двухмерные проекции (обратные проекции) в различных ориентациях. При этом каждая обратная проекция была создана в той же ориентации, что и соответствующий класс, взятый для построения трехмерной структуры, т.е. в результате было получено такое же количество обратных проекций, что и использованных классов. Обратные проекции заменяют собой классы и используются для дальнейшего выравнивания и улучшения классификации частиц, выступая в качестве образцов при новом выравнивании и разбиении на классы всего массива частиц. Поскольку при классификации наблюдались классы с выраженной четырехсторонней симметри-



Рис. 1. Схема мономера канала Kv10.2. Отмечены: PAS-домен, cNBD-домен, трансмембранный участок, сегменты которого S1–S6 пронумерованы.

ей, при расчетах финальных трехмерных структур использовали этот тип симметрии.

Моделирование по гомологии. Для интерпретации полученной трехмерной структуры транкированного канала мы использовали кристаллические структуры гомологичных белков и моделирование по гомологии. Мембранный домен моделировали по гомологии с кристаллической структурой бактериального цАМФ-зависимого канала MloK1 (PDB-код 2KXL). Для идентификации шаблонов был использован сервер SWISS-MODEL [15]. Аминокислотные последовательности выравнивали с помощью программы T-COFFEE [16]. Построение моделей на основе выравнивания гомологичных аминокислотных последовательностей проводили в программе MODELLER [17]. Модели четвертичной тетрамерной структуры были составлены с учетом матрицы симметрии в программе UCSF Chimera [18]. Параметры матрицы симметрии в pdb-файле модели подбирали в соответствии гомологичным белкам. Фиттинг моделей проводили в полуавтоматическом режиме с помощью программы Situs [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Потенциал-зависимые калиевые каналы – чрезвычайно обширная и разнообразная группа белков, которая выполняет важные функции в организме животных и человека, в связи с чем Kv-каналы являются потенциальными терапевтическими мишенями при лечении многих заболеваний [20]. В настоящее время опубликовано мало данных об их четвертичном строении, что связано со сложностью получения, очистки и кристаллизации трансмембранных белков, имеющих обширные цитоплазматические части. Вместе с тем структурные данные имеют первостепенное значение для изучения особенностей функционирования, механизмов активации каналов и для дизайна новых лекарственных средств. Цитоплазматические части Kv-каналов играют первостепенную роль в регуляции их свойств, а также являются детерминантами отличительных особенностей каналов разных семейств. У канала Kv10.2 цитоплазматическая часть особенно велика [11]. Полипептидная цепь, кодирующая полноразмерную α -субъединицу канала Kv10.2 (рис. 1), имеет длину 988 а.о., что приблизительно соответ-

ствует молекулярному весу 120 кДа. PAS-домен включает около 100 а.о. (с 31 по 132 а.о.), мембранная часть канала состоит из шести трансмембранных сегментов S1–S6, которые занимают 144–550 а.о., С-конец содержит домен связывания циклических нуклеотидов (CNBD), имеющий размер 118 а.о. и расположенный на цитоплазматической стороне, как и N-концевой PAS-домен.

Главной функцией потенциал-зависимых калиевых каналов является проведение ионов калия через мембрану клетки. Соответственно, для осуществления этой функции после синтеза в цитоплазме клетки каналы должны быть транспортированы в цитоплазматическую мембрану, что контролируется рядом внутриклеточных механизмов [21]. Исследование методом флуоресцентной микроскопии с применением меченых антител против С-концевого 1D4 тага выявило, что потенциал-зависимые каналы Kv1.1 (*Shaker*) экспрессируются в мембране клеток COS7 с достаточно высокой плотностью (рис. 2а). Денситограмма показала, что каналы образуют множество небольших скоплений (кластеров) диаметром менее 0,5 мкм. Кроме этого, в мембране находится множество свободных, не организованных в кластеры каналов, образующих плотный «фон» на денситограмме. Эти каналы являются активными и выполняют свою функцию проведения ионов калия, как было показано нами ранее [22,23].

Каналы Kv10.2 формируют в мембране клетки кластеры диаметром от 0,5 до 1 мкм (рис. 2б). Это соответствует данным, полученным нами ранее [24] с использованием меченого токсина. В отличие от полноразмерного канала, транкированный канал Kv10.2 Δ PAS образует небольшое количество крупных (до 2 мкм) кластеров, отстоящих друг от друга на большое расстояние (рис. 2в). Между этими кластерами флуоресцентный сигнал практически не детектировался, свидетельствуя о том, что при удалении PAS-домена свободных активных каналов в мембране клетки нет.

Ранее было предположено, что кластеры представляют собой депо неактивных каналов, которое при понижении частоты генерирования потенциалов действия может рассеиваться на множество одиночных активных каналов [25]. Следовательно, удаление цитоплазматического

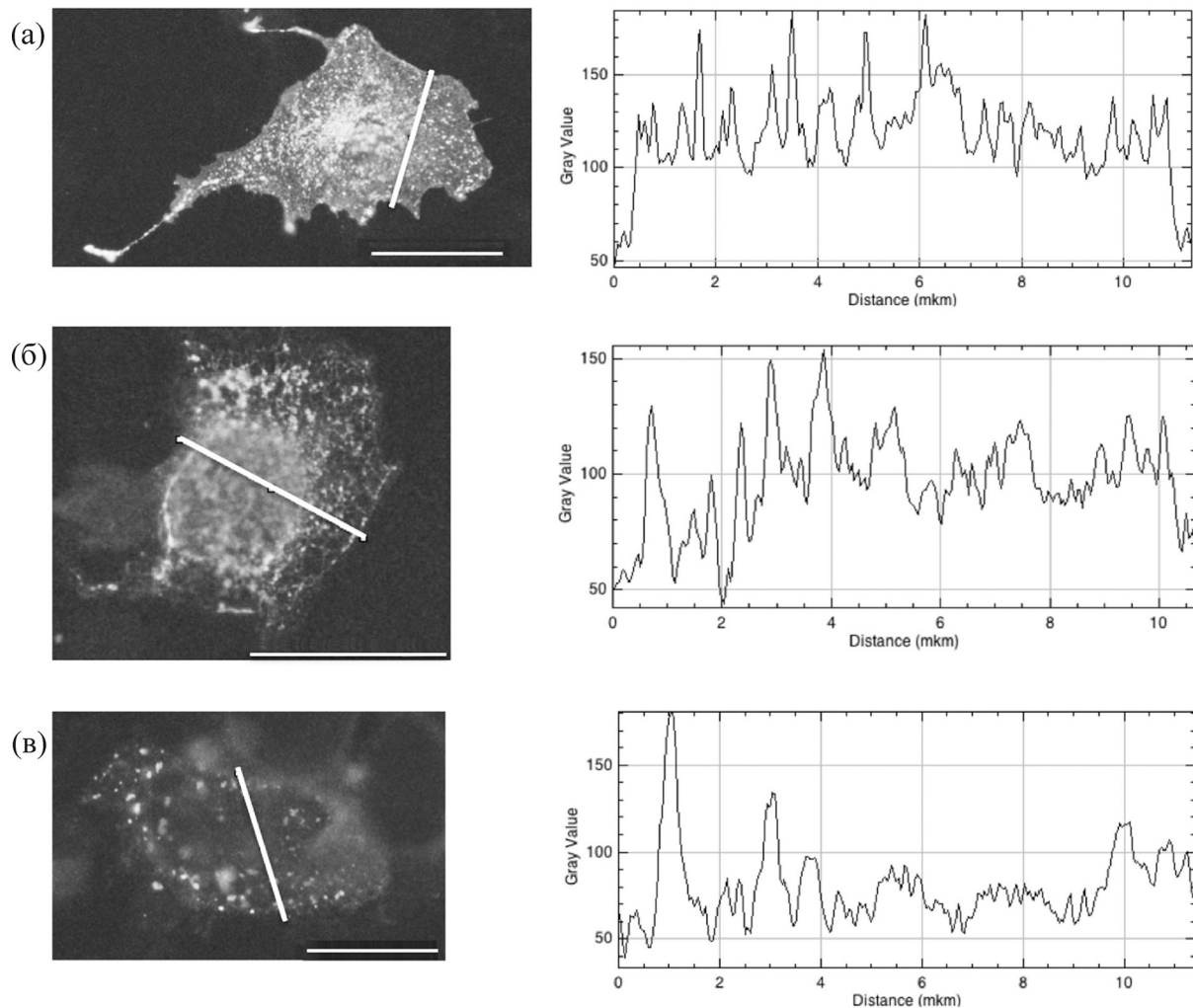


Рис. 2. Экспрессия ионных каналов в эукариотических клетках. Слева – флуоресцентное изображение каналов, меченных антителами против С-концевого ID4 тага, справа – профайлы интенсивности вдоль белой линии, пересекающей изображение. (а) – Канал Kv1.1 (Shaker), (б) – канал Kv10.2, (в) – канал Kv10.2ΔPAS. Масштабный отрезок – 10 мкм.

PAS-домена переводит каналы в неактивное состояние, вызывая их кластеризацию. Кроме этого, можно предположить, что удаление PAS-домена влияет на транспортировку каналов к мембране клетки.

В результате экспрессии и очистки белка Kv10.2ΔPAS было получено достаточное количество очищенного белка для исследования их структуры методом просвечивающей электронной микроскопии макромолекул с негативным окрашиванием. Для определения трехмерных структур очищенный белок каналов наносили на сетку, окрашивали 1% водным раствором уранилацетата, как описано в разделе «Методы», и исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

По результатам электронно-микроскопического исследования и обработки изображений

была получена трехмерная структура белка, представленная на рис. 3. Она имеет разрешение 22 Å. Анализ данной структуры выявил наличие в ней следующих доменов: трансмембранного с размерами 10 × 10 × 5 нм и цитоплазматического с размерами 12 × 12 × 5 нм.

Ранее мы опубликовали трехмерную структуру полноразмерного канала Kv10.2 [11] и продемонстрировали наличие взаимодействий между его цитоплазматическими PAS- и CNBD-доменами. Мы также показали, что расположение CNBD-доменов в полноразмерном канале отличается от их расположения в кристаллической структуре. Для исследования расположения цитоплазматических доменов в данной работе мы получили структуру канала с удаленными PAS-доменами. Так как, в отличие от каналов семейств Kv1-4, N-концевые PAS-до-

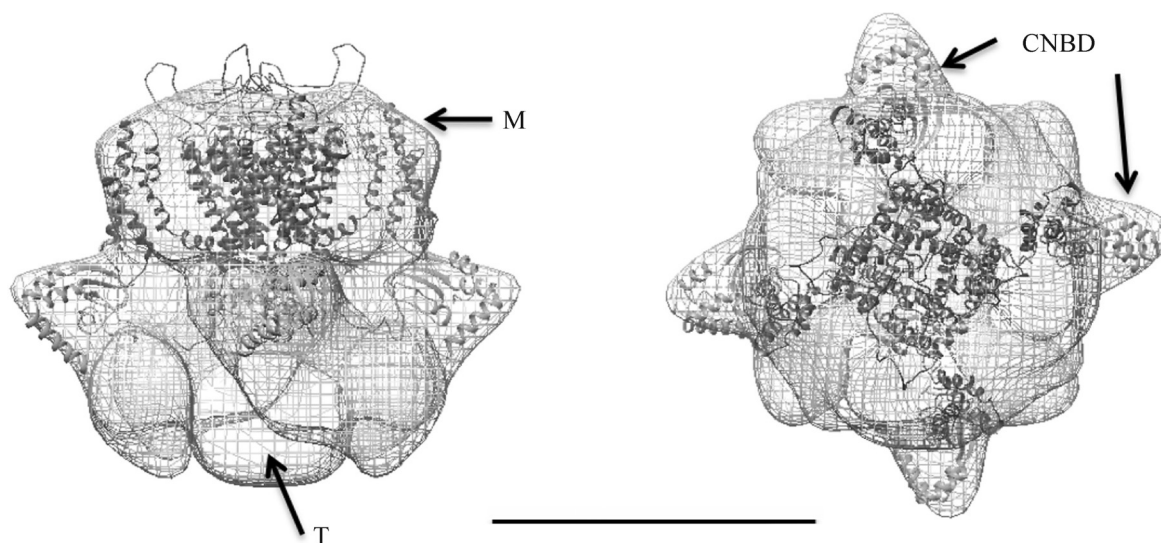


Рис. 3. Интерпретация трехмерной структуры канала Kv10.2ΔPAS с помощью фиттинга модели трансмембранного домена в верхнюю часть реконструкции канала (темно-серый цвет) и cNBD-доменов (светло-серый цвет) в цитоплазматическую часть реконструкции: (а) – вид сбоку, отмечены трансмембранный домен (ТМ) и тетрамеризационный домен (Т); (б) – вид со стороны трансмембранного домена, отмечены CNBD-домены. Масштабный отрезок – 10 нм.

мены у каналов Kv10 не являются тетрамеризационными [5], удаление этих доменов не нарушает тетрамерную структуру каналов и позволяет очистить белок с помощью С-концевого аффинного тага.

При сравнении полученной трехмерной структуры транкированного канала Kv10.2ΔPAS (рис. 3) со структурой полноразмерного канала [11] можно выделить различия в положении цитоплазматических доменов канала. Удаление N-концевого PAS-домена приводит к перемещению цитоплазматических CNBD-доменов к периферии и изменению общей формы реконструкции. Докинг кристаллической структуры CNBD-домена, полученной по гомологии с доменом цАМФ-зависимого канала HCN4 (PDB код 3OTF), в транкированный канал показал хорошую корреляцию (рис. 3). В отличие от полноразмерного канала цитоплазматические домены не образуют сплошного «пояса». Отдельные домены в транкированном канале связаны с центральной плотностью, находящейся на оси симметрии канала. Ранее мы наблюдали такую же центральную плотность в реконструкции полноразмерного канала [11]. Известно, что на С-конце канала Kv10 расположен тетрамеризационный CAD-домен. Делеция его приводит к синтезу нефункционального канала [9]. Мы предположили, что центральная плотность, которая остается при удалении N-концевого домена, может представлять собой С-

концевой тетрамеризационный домен (обозначен буквой «Т» на рис. 3а).

Таким образом, С-концевой домен в отсутствие N-концевого изменяет свое местоположение и подвергается значительному конформационному изменению, перемещаясь в положение, соответствующее мономерному состоянию CNBD-домена. Тетрамеризационная функция осуществляется С-концевым CAD-доменом канала Kv10 [9]. Помимо этого, мы показали, что удаление цитоплазматического N-концевого домена приводит к изменению экспрессии каналов на поверхности клетки и организации каналов в кластеры, что указывает на то, что функция кластеризации осуществляется последовательностью, расположенной на С-конце белка канала Kv10.

Авторы благодарят И.А. Демьяненко за помощь в редактировании статьи.

Электронно-микроскопические исследования каналов проведены в лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (идентификатор проекта RFMEFI61615X0044). Электронный микроскоп JEOL 2100 был приобретен в рамках Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. F. H. Yu, et al., *Pharmacol. Rev.* **57** (4), 387 (2005).
2. G. Yellen, *Nature* **419** (6902), 35 (2002).
3. D. Wray, *Eur. Biophys. J.* **38** (3), 271 (2009).
4. D. Wray, *Eur. Biophys. J.* **38** (3), 285 (2009).
5. J. H. Morais Cabral, et al., *Cell* **95** (5), 649 (1998).
6. Z. Wang, G. F. Wilson, and L. C. Griffith, *J. Biol. Chem.* **277** (27), 24022 (2002).
7. L. Restier, L. Cheng, and M. C. Sanguinetti, *J. Physiol.* **586** (17), 4179 (2008).
8. H. Terlau, et al., *J. Physiol.* **502** (3), 537 (1997).
9. W. N. Zagotta, et al., *Nature* **425** (6954), 200 (2003).
10. M. Lolicato, et al., *J. Biol. Chem.* **286** (52), 44811 (2011).
11. О. С. Соколова и др., *Биооргани. химия* **38** (2), 177 (2012).
12. H. C. Birnboim and J. Doly, *Nucl. Acids Res.* **7** (6), 1513 (1979).
13. S. J. Ludtke, P. R. Baldwin, and W. Chiu, *J. Struct. Biol.* **128** (1), 82 (1999).
14. M. van Heel, *Ultramicroscopy* **21**, 111 (1987).
15. F. Kiefer, et al., *Nucl. Acids Res.* **37** (Database issue), D387 (2009).
16. C. Notredame, D. G. Higgins, and J. Heringa, *J. Mol. Biol.* **302** (1), 205 (2000).
17. N. Eswar, B. Webb, M. A. Marti-Renom, et al., in *Current protocols in bioinformatics*, Ed. by A. D. Baxevanis, et al. (John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2006), p. Unit 5.6.
18. T. D. Goddard, C. C. Huang, and T. E. Ferrin, *J. Struct. Biol.* **157** (1), 281 (2007).
19. W. Wriggers, R. A. Milligan, and J. A. McCammon, *J. Struct. Biol.* **125** (2–3), 185 (1999).
20. A. V. Pischalnikova and O. S. Sokolova, *J. Neuroimmune Pharmacol.* **4** (1), 71 (2009).
21. H. Misonou and J. S. Trimmer, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39** (3), 125 (2004).
22. O. Sokolova, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (22), 12607 (2003).
23. O. Sokolova, L. Kolmakova-Partensky, and N. Grigorieff, *Structure* **9** (3), 215 (2001).
24. M. G. Karlova, et al., *Biofizika*, **56** (2), 272 (2011).
25. H. Misonou, D. P. Mohapatra, and J. S. Trimmer, *Neurotoxicology* **26** (5), 743 (2005).

Structure of the Human Voltage-Gated Potassium Channel Kv10.2 Lacking the Cytoplasmic PAS Domain

G.S. Glukhov*, **A.V. Popinako****, **A.V. Grizel*****, **K.V. Shaitan* ******, and **O.S. Sokolova***

**Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Moscow, 119991 Russia*

***Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Russian Academy of Sciences,
Leninsky prosp. 33/2, Moscow, 119071 Russia*

****St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

*****Semenov Institute of Chemical Physics, ul. Kosygina 4, Moscow, 119991 Russia*

We studied the structure of the human voltage-gated potassium channel Kv10.2 with a truncated cytoplasmic N-terminal PAS-domain and its distribution in cells. The channel protein was expressed in COS7 cells and purified using affinity chromatography. Channel expression on the cell surface was determined using fluorescent antibodies against the C-terminus of the channel. Removal of the PAS-domain leads to a reduction in channel expression on the cell surface. To interpret the location of the cytoplasmic domain in an ion channel structure, we compared the 3D structure of the truncated channel and the previously obtained full length channel structure. It was shown that in the absence of the N-terminal PAS domain, the C-terminal CNBD domain of the Kv10.2 channel undergoes conformational rearrangement.

Key words: ion channel, electron microscopy, spatial protein structure