

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 577.322

## МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ СТРУКТУРЫ ТЕТРАМЕРИЗАЦИОННОГО ДОМЕНА КАЛИЕВОГО КАНАЛА Kv10.2 ЧЕЛОВЕКА В РАЗЛИЧНЫХ ОЛИГОМЕРНЫХ СОСТОЯНИЯХ

В.Н. Новоселецкий\*, А.Д. Волынцева, К.В. Шайтан, О.С. Соколова

Кафедра биоинженерии, биологический факультет,  
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
\*e-mail: valeryns@gmail.com

Потенциал-управляемый калиевый канал Kv10.2 экспрессируется в нервной системе, однако его функции и участие в развитии болезней человека остаются мало изученными. Мутации канала Kv10.2 были обнаружены при эпилептической энцефалопатии и аутизме. Моделирование пространственной структуры канала является важным инструментом для получения информации о молекулярных аспектах его функционирования и механизмах, ответственных за патогенез. В настоящей работе выполнено молекулярное моделирование спирального фрагмента С-концевого домена канала Kv10.2 человека (hEAG2) в димерной, тримерной и тетрамерной формах. Стабильность всех форм подтверждена расчётами методом молекулярной динамики. Выявлены контакты и взаимодействия, стабилизирующие структуру.

**Ключевые слова:** потенциал-управляемый калиевый канал Kv10.2, олигомеризация, лейциновая застёжка, суперспираль, молекулярное моделирование, молекулярная динамика

Потенциал-управляемые калиевые каналы контролируют перенос ионов  $K^+$  через клеточную мембрану и играют ключевую роль в возбудимых и невозбудимых клетках. Канал Kv10.2 (кодируемый геном *KCNH5*) принадлежит семейству ether-a-go-go (EAG) и экспрессируется в нервной системе [1].

Мутации каналов семейства EAG вызывают нарушение синаптической пластичности и памяти [2]. Нарушения функционирования канала Kv10.2 наблюдались при развитии эпилептической энцефалопатии и аутистических расстройствах [3], а также в процессе возникновения и развития опухолей [2]. Несмотря на предпринятые попытки исследования канала Kv10.2, его функционирование в нервной системе и вовлеченность в развитие заболеваний человека остаются недостаточно изученными [3, 4].

Анализ гена *KCNH5*, клонированного незадолго до завершения проекта “Геном человека” [5, 6], показал, что канал Kv10.2 обладает топологией, сходной с другими калиевыми потенциал-управляемыми каналами (Kv): шесть трансмембранных спиралей в каждой из четырёх субъединиц. Структура цитоплазматического домена потенциал-управляемых каналов сильно варьирует между различными семействами [7]. С-концевой домен необходим для корректной сборки тетрамерного канала [8], причём межспиральные взаимодействия определяют не только стабильность, но и селективность мультимеризации [9]. Показано, что С-концевой домен канала Kv7.1, гомологичного семейству EAG, имеет две функциональные части, причём проксимальная половина ответственна за экспрессию, сво-

рачивание и проницаемость канала, а дистальная — за направление сворачивания и специфичность связывания с партнерами [10].

Информация о пространственной структуре мембранных белков, в т.ч. ионных каналов, а также их комплексов с различными лигандами является важным условием для понимания механизмов функционирования этих белков. До недавнего времени структура калиевых каналов семейства EAG была неизвестна, хотя и был предпринят ряд попыток моделирования [3, 11–13]. Теперь же ситуация коренным образом изменилась, поскольку была расшифрована структура большей части гомологичного канала Kv10.1 (EAG1) [14], которая может быть использована для моделирования взаимодействия каналов семейства EAG с блокаторами [15]. В то же время, структура протяженного С-концевого участка канала EAG2 (723–988 а.о.) по-прежнему остается неизвестной. Ранее мы показали, что полноразмерные каналы Kv10.2 образуют кластеры, которые солокализуются с актиновым цитоскелетом [7]. Недавно мы установили, что каналы Kv10.2 с удаленным N-концевым доменом также способны к кластеризации [16]. Логично предположить, что во взаимодействии с актином принимают участие С-концевые фрагменты каналов.

Для того, чтобы понять, как спиральные фрагменты С-концевого домена канала Kv10.2 олигомеризуются в составе полноразмерного канала, мы провели моделирование структуры этого фрагмента в димерной, тримерной и тетрамерной формах. Для анализа стабильности полученных олигомеров

использовали расчёты методом молекулярной динамики (МД), что позволило установить контакты и взаимодействия, стабилизирующие структуру олигомеров. Результаты проведенной работы могут быть использованы для анализа влияния возникающих мутаций на структуру и функционирование канала EAG2.

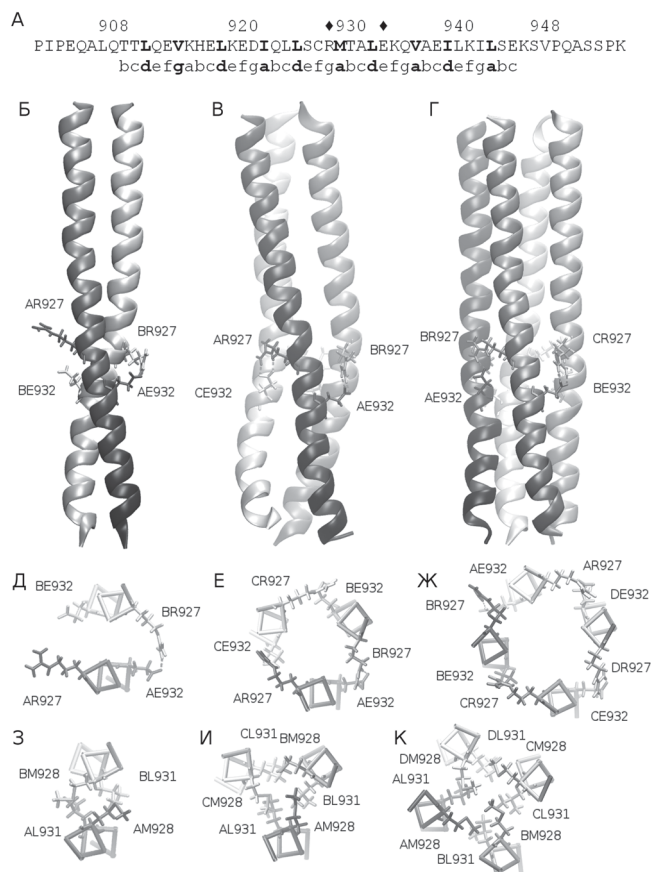
### Материалы и методы

Построение идеальных  $\alpha$ -спиралей, сборка пучков параллельных спиралей и визуализация структур выполнены в программе Maestro (Schrodinger, LLC). Расчёты методом МД выполнены в программе Gromacs [17] с использованием силового поля CHARMM22. Конформеры извлечены из равновесного участка траектории с шагом 100 пс. Для каждого конформера выполнены расчёты параметров суперспиралей с помощью программы TWISTER [18] и энергии взаимодействия с помощью программ APBS [19] и FoldX [20]. Для предсказания олигомерного состояния суперспирали на основе её аминокислотной последовательности использован веб-сервис LOGICOIL [21].

### Результаты и обсуждение

C-концевой спиральный фрагмент внутриклеточного домена канала Kv10.2 (EAG2) содержит пять гептадных повторов, характерных для суперспиралей (рисунок, А). Для анализа степени олигомеризации этого фрагмента мы использовали методы молекулярного моделирования. Структурные модели фрагмента в конформации  $\alpha$ -спирали были построены *de novo*, а затем объединены с образованием димера, тримера и тетрамера. Для полученных моделей была проведена оптимизация и последующий расчёт методом МД в водном растворе в течение 15 нс. Во всех случаях произошло образование стабильных левозакрученных суперспиралей (рисунок, Б, В, Г).

Геометрические параметры суперспиралей являются характеристиками плотности их упаковки и стабильности. Мы сопоставили параметры модельных суперспиралей с параметрами аналогичных суперспиралей, пространственная структура которых известна: димерной формой тропомиозина (pdb-код 3u1a [22]), а также тримерной (pdb-код 3hfe [23]) и тетрамерной (pdb-код 3bj4 [10]) формами C-концевого спирального фрагмента калиевого канала Kv7.1 (табл. 1). Хорошее соответствие радиусов модельных суперспиралей радиусам суперспиралей в экспериментально полученных структурах говорит о достижении плотной упаковки модельных спиралей в процессе расчёта. В то же время такие параметры суперспирали, как шаг и вычисляемое на его основе число остатков на виток, в модельных суперспиралях демонстрируют значительно большие значения по сравнению с экспериментально полученными. Гораздо большим



**Рисунок.** Структура C-концевого спирального фрагмента внутриклеточного домена канала Kv10.2 (hEAG2) (908–948 а.о.). Первичная структура и обозначения остатков по суперспиральному регистру (гидрофобные остатки и соответствующие позиции, преимущественно *a* и *d*, показаны жирным шрифтом) (А). Остатки R и E из мотива R-h-x-x-h-E (см. текст) отмечены ромбами. Представлены общий вид пространственной структуры (Б, В, Г), ионные и водородные связи остатков Arg927 и Glu932 (Д, Е, Ж) и контакты остатков Met928 и Leu931 (З, И, К) для димерной, тримерной и тетрамерной суперспиралей соответственно. В обозначении остатков первая буква соответствует субъединице

оказывается и разброс этих параметров, причиной которого, по-видимому, является несимметричность отдельных конформеров модельных суперспиралей, вызванная значительной подвижностью суперспиралей в процессе расчёта. Как и в случае с тримерной и тетрамерной формами канала Kv7.1, меньший шаг суперспирали позволяет предположить, что тримерная форма канала Kv10.2 имеет более плотную закрутку вокруг оси суперспирали. Между тем параметры индивидуальных  $\alpha$ -спиралей (число остатков на виток, шаг спиралей и т.п.) во всех моделях являются практически идентичными.

Поддержание стабильности олигомерной структуры суперспиралей обеспечивается большим количеством полярных и ионных взаимодействий и гидрофобных контактов. Последние обусловлены гидрофобными остатками мотива “лейциновой застёжки” (Leu910, Val913, Leu917, Ile921, Leu924, Met928, Leu931, Val935, Leu939, Leu942) (рисунок, А), и их стремление минимизировать свои контакты

Таблица 1

Параметры ряда суперспиралей, рассчитанные с помощью программы TWISTER, и значения энергии взаимодействия (ккал/моль) в олигомерах С-концевого спирального фрагмента канала Kv10.2 в расчёте на одну субъединицу, рассчитанные с помощью программ APBS и FoldX (среднее  $\pm$  стандартное отклонение)

|  | Димеры          |                 | Тримеры       |                 | Тетрамеры       |                 |
|--|-----------------|-----------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|  | Kv10.2          | Тропомоизин     | Kv10.2        | Kv7.1           | Kv10.2          | Kv7.1           |
| Геометрические параметры суперспиралей         |                 |                 |               |                 |                 |                 |
| Радиус суперспирали (Å)                        | 5,0 $\pm$ 0,4   | 4,7 $\pm$ 0,6   | 6,5 $\pm$ 0,2 | 6,2 $\pm$ 0,2   | 7,3 $\pm$ 0,7   | 7,5 $\pm$ 0,2   |
| Число остатков на виток суперспирали           | 90 $\pm$ 80     | 100 $\pm$ 20    | 120 $\pm$ 80  | 85 $\pm$ 12     | 180 $\pm$ 100   | 125 $\pm$ 20    |
| Шаг суперспирали (Å)                           | 140 $\pm$ 120   | 150 $\pm$ 30    | 180 $\pm$ 120 | 125 $\pm$ 20    | 270 $\pm$ 150   | 181 $\pm$ 20    |
| Геометрические параметры спиралей              |                 |                 |               |                 |                 |                 |
| Радиус спирали (Å)                             | 2,27 $\pm$ 0,12 | 2,29 $\pm$ 0,03 | 2,3 $\pm$ 0,2 | 2,29 $\pm$ 0,04 | 2,28 $\pm$ 0,08 | 2,30 $\pm$ 0,03 |
| Число остатков на виток спирали                | 3,65 $\pm$ 0,12 | 3,62 $\pm$ 0,05 | 3,7 $\pm$ 0,2 | 3,62 $\pm$ 0,05 | 3,66 $\pm$ 0,09 | 3,61 $\pm$ 0,05 |
| Значения энергии в расчёте на одну субъединицу |                 |                 |               |                 |                 |                 |
| APBS   | -22 $\pm$ 10    |                 | -39 $\pm$ 13  |                 | -36 $\pm$ 13    |                 |
| FoldX  | -32 $\pm$ 4     |                 | -35 $\pm$ 5   |                 | -45 $\pm$ 6     |                 |

с полярным растворителем является движущей силой олигомеризации. Водородные и ионные связи образуются между заряженными остатками спиралей, в число которых входят Glu912, Lys914, Glu916, Lys918, Glu920, Arg927 и Glu932 (рисунок, А). Нужно заметить, что образование таких связей в димерах бывает стерически затруднено ввиду расположения объёмных гидрофобных остатков между заряженными (Рисунок, Д, З).

Непосредственной характеристикой, позволяющей оценить стабильность той или иной олигомерной формы, является энергия взаимодействия в олигомере в расчёте на один мономер. Результаты расчёта этой энергии, выполненные с помощью программ APBS [19] и FoldX [20] (табл. 1), не позволяют отдать предпочтение какой-либо из форм. Представляется достоверной лишь меньшая энергия взаимодействия в димере по сравнению с тетрамером, что согласуется с большей экспонированностью гидрофобных остатков и затрудненным образованием водородных и ионных связей между спиральями в димере.

Аналогичный результат на качественном уровне может быть получен на основе анализа самой аминокислотной последовательности (табл. 2). Меньшая степень олигомеризации в сочетании с меньшей длиной вовлеченной  $\alpha$ -спирали ранее была обнаружена и для аналогичного фрагмента канала Kv7.1 [23].

Ранее предполагалось, что признаком склонности спиралей к тримеризации является наличие мотива R-h-x-h-E (где R – остаток аргинина, h – гидрофобный остаток, x – произвольный остаток, E – остаток глутамата), консервативного среди суперспиралей, для которых характерно тримерное

состояние [24] (рисунок, А). В то же время, к настоящему времени известно как минимум две структуры, содержащие мотив R-h-x-h-E и закристаллизованные в тетрамерном состоянии – это структуры фрагмента канала Kv7.1 (pdb-код 3bj4 [10]) и Kv7.4 (pdb-код 2ovc [25]).

Таблица 2

Зависимость предсказываемой степени олигомеризации С-концевого спирального фрагмента канала Kv10.2 от порогового значения вероятности суперспирализации (по данным веб-сервиса LOGICOIL)

| Значение порога | Вероятная длина спирали, вовлеченной в суперспирализацию, а.о. | Наиболее вероятные состояния |                        |
|-----------------|--|------------------------------|------------------------|
|                 |  | Первое                       | Второе                 |
| 10%             | 44   | Тетрамер                     | Параллельный димер     |
| 50%             | 37   | Тетрамер                     | Тример                 |
| 90%             | 28   | Тример                       | Антипараллельный димер |

Проведенное в данной работе моделирование показывает, что С-концевой спиральный фрагмент канала Kv10.2 (EAG2) может образовывать стабильные димерные, тримерные и тетрамерные суперспирали, причём наибольший вклад в их стабилизацию вносят гидрофобные контакты. Созданная нами модель выявляет детали взаимодействия субъединиц и может быть использована для выявления роли аминокислотных замен, наблюдаемых в ряде патологий. Отметим, что для определения степени олигомеризации цитоплазматических участков каналов семейства EAG необходимо расшифровать структуру полноразмерного канала.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (грант №14.616.21.004 от 09.10.15, про-

ект RFMEFI61615X0044) с использованием ресурсов суперкомпьютерного комплекса МГУ имени М.В. Ломоносова [26].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saganich M.J., Vega-Saenz de Miera E., Nadal M.S., Baker H., Coetzee W.A., Rudy B. Cloning of components of a novel subthreshold-activating K(+) channel with a unique pattern of expression in the cerebral cortex // *J. Neurosci.* 1999. Vol. 19. N 24. P. 10789–10802.
2. Asher V., Sowter H., Shaw R., Bali A., Khan R. Eag and HERG potassium channels as novel therapeutic targets in cancer // *World J. Surg. Oncol.* 2010. Vol. 8. N 1. P. 113.
3. Yang Y., Vasylyev D.V., Dib-Hajj F., Veeramah K.R., Hammer M.F., Dib-Hajj S.D., Waxman S.G. 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. N 42. P. 16586–16593.
4. Wulff H., Pardo L.A., Castle N.A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009. Vol. 8. N 12. P. 982–1001.
5. Ju M., Wray D. Molecular identification and characterization of the human eag2 potassium channel // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 524. N 1–3. P. 204–210.
6. Schönherr R., Gessner G., Löber K., Heinemann S.H. Functional distinction of human EAG1 and EAG2 potassium channels // *FEBS Lett.* 2002. Vol. 514. N 2–3. P. 204–208.
7. Karlova M.G., Pischalnikova A.V., Ramonova A.A., Moisenovich M.M., Sokolova O.S., Shaitan K.V. In vitro fluorescence assay to study the folding of Kv ion channels // *Biophysics.* 2011. Vol. 56. N 2. P. 243–249.
8. Ludwig J., Owen D., Pongs O. Carboxy-terminal domain mediates assembly of the voltage-gated rat ether-à-go-go potassium channel // *EMBO J.* 1997. Vol. 16. N 21. P. 6337–6345.
9. Jenke M., Sánchez A., Monje F., Stühmer W., Wessloh R.M., Pardo L.A. C-terminal domains implicated in the functional surface expression of potassium channels // *EMBO J.* 2003. Vol. 22. N 3. P. 395–403.
10. Wiener R., Haitin Y., Shamgar L., Fernández-Alonso M.C., Martos A., Chomsky-Hecht O., Rivas G., Attali B., Hirsch J.A. The KCNQ1 (Kv7.1) COOH terminus, a multi-tiered scaffold for subunit assembly and protein interaction // *J. Biol. Chem.* 2008. Vol. 283. N 9. P. 5815–5830.
11. Ju M., Wray D. Molecular regions responsible for differences in activation between heag channels // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. Vol. 342. N 4. P. 1088–1097.
12. Stevens L., Ju M., Wray D. Roles of surface residues of intracellular domains of heag potassium channels // *Eur. Biophys. J.* 2009. Vol. 38. N 4. P. 523–532.
13. Sokolova O.S., Shaitan K.V., Grizel A.V., Popinako A.V., Karlova M.G., Kirpichnikov M.P. 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. N 2. P. 152–158.
14. Whicher J.R., MacKinnon R. Structure of the voltage-gated K<sup>+</sup> channel Eag1 reveals an alternative voltage sensing mechanism // *Science.* 2016. Vol. 353. N 6300. P. 664–669.
15. Novoseletsky V.N., Volyntseva A.D., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Modeling of the binding of peptide blockers to voltage-gated potassium channels: Approaches and evidence // *Acta Naturae.* 2016. Vol. 8. N 2. P. 35–46.
16. Glukhov G.S., Popinako A.V., Grizel A.V., Shaitan K.V., Sokolova O.S. The structure of a human voltage-gated potassium Kv10.2 channel which lacks a cytoplasmic pas domain // *Biophysics.* 2016. Vol. 61. N 4. P. 591–595.
17. Van Der Spoel D., Lindahl E., Hess B., Groenhof G., Mark A.E., Berendsen H.J.C. GROMACS: Fast, flexible, and free // *J. Comp. Chem.* 2005. Vol. 26. N 16. P. 1701–1718.
18. Strelkov S.V., Burkhard P. Analysis of  $\alpha$ -helical coiled coils with the program TWISTER reveals a structural mechanism for stutter compensation // *J. Struct. Biol.* 2002. Vol. 137. N 1–2. P. 54–64.
19. Baker N.A., Sept D., Joseph S., Holst M.J., McCammon J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. Vol. 98. N 18. P. 10037–10041.
20. Schymkowitz J., Borg J., Stricher F., Nys R., Rousseau F., Serrano L. The FoldX web server: an online force field // *Nucleic Acids Res.* 2005. Vol. 33. Suppl. 2. P. W382–W388.
21. Vincent T.L., Green P.J., Woolfson D.N. LOGICOIL – multi-state prediction of coiled-coil oligomeric state // *Bioinformatics.* 2013. Vol. 29. N 1. P. 69–76.
22. Rao J.N., Rivera-Santiago R., Li X.E., Lehman W., Dominguez R. Structural analysis of smooth muscle tropomyosin  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms // *J. Biol. Chem.* 2012. Vol. 287. N 5. P. 3165–3174.
23. Xu Q., Minor D.L. Crystal structure of a trimeric form of the K(V)7.1 (KCNQ1) A-domain tail coiled-coil reveals structural plasticity and context dependent changes in a putative coiled-coil trimerization motif // *Protein Sci.* 2009. Vol. 18. N 10. P. 2100–2114.
24. Kammerer R., Kostrewa D., Progiás P., Honnappa S., Avila D., Lustig A., Winkler F.K., Pieters J., Steinmetz M.O. A conserved trimerization motif controls the topology of short coiled coils // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. Vol. 102. N 39. P. 13891–13896.
25. Howard R.J., Clark K.A., Holton J.M., Minor D.L. Structural insight into KCNQ (Kv7) channel assembly and channelopathy // *Neuron.* 2007. Vol. 53. N 5. P. 663–675.
26. Sadovnichy V., Tikhonravov A., Voevodin V., Opanasenko V. “Lomonosov”: Supercomputing at Moscow State University // *Contemporary High Performance Computing: From Petascale toward Exascale* / Ed. J.S. Vetter. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2013. P. 283–307.

Поступила в редакцию  
30.01.2017  
Принята в печать  
02.03.2017

## MOLECULAR BIOLOGY

## MOLECULAR MODELING OF TETRAMERIZATION DOMAIN OF HUMAN POTASSIUM CHANNEL Kv10.2 IN DIFFERENT OLIGOMERIC STATES

V.N. Novoseletsky\*, A.D. Volyntseva, K.V. Shaitan, O.S. Sokolova

Department of Bioengineering, School of Biology,  
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1-12, Moscow, 119234, Russia

\*e-mail: valeryns@gmail.com

Voltage-gated potassium channel Kv10.2 is expressed in the nervous system, but its functions and involvement in the development of human disease remain poorly understood. Mutant forms of Kv10.2 channel were found in patients with epileptic encephalopathy and autistic features. Molecular modeling of the channel spatial structure is an important tool for gaining knowledge about the molecular aspects of the channel functioning and mechanisms responsible for the pathogenesis. In the present work, we performed molecular modeling of the helical fragment of the human Kv10.2 (hEAG2) C-terminal domain in dimeric, trimeric and tetrameric forms. The stability of all forms was confirmed by molecular dynamics simulation. Contacts and interactions, stabilizing the structure, were identified.

**Keywords:** *voltage-gated potassium channel Kv10.2, oligomerization, leucine zipper, coiled coil, molecular modeling, molecular dynamics.*

**Сведения об авторах**

*Новоселецкий Валерий Николаевич* – канд. физ-мат. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: valeryns@gmail.com

*Волынцева Алёна Дмитриевна* – мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: alenkavolynceva@gmail.com

*Шайтан Константин Вольдемарович* – докт. физ-мат. наук, проф., зам. зав. кафедрой биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shaytan49@yandex.ru

*Соколова Ольга Сергеевна* - докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova184@gmail.com