

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

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2017

Работа выполнена на кафедре биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (зав. кафедрой – доктор биологических наук, академик РАН, М.П. Кирпичников).

Научный руководитель:

Соколова Ольга Сергеевна

доктор биологических наук, профессор РАН, доцент кафедры биоинженерии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Официальные оппоненты:

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

Чупин Владимир Викторович, доктор химических наук, профессор, руководитель лаборатории химии и физики липидов Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)».

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

Защита диссертации состоится «22» февраля 2018 г. в __.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertation_councils/councils/32241428/

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

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 (Hartmann et al., 1991, Coetzee et al., 1999). Мутации каналов приводят к наследуемым генетическим заболеваниям, получившим в современной литературе название «каналопатии» (Griggs and Nutt, 1995).

Семейство *ether-à-go-go* EAG включает три подсемейства: Eag (Kv10), Erg (Kv11) и Elk (Kv12). Канал Kv10.2 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 (Saganich et al., 1999; Ludwig et al., 2000; Saganich et al., 2001; Ju and Wray, 2002; Rowell et al., 2010; Huang et al., 2012). Роль канала в ЦНС остается не до конца изученной. Увеличение синтеза белка канала наблюдается при медуллобластоме, одном из распространенных онкологических заболеваний головного мозга (Huang et al., 2012).

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) (Gulbis et al. 2000; Long et al. 2005). Исходя из этих структур были предложены механистические модели активации потенциал-зависимых калиевых каналов (Gulbis et al. 2000; Long et al. 2005; Long et al. 2007). 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 (Malak, et al., 2017; Whicher and MacKinnon 2016).

Существенную регуляторную роль в функционировании ионных каналов играют цитоплазматические домены (Chen et al. 2011; Haitin, Carlson, and Zagotta 2013). Они взаимодействуют друг с другом и способствуют формированию функционального канала (Chen et al. 2011; Gong et al. 2004), а так же взаимодействуют с различными белками клеткис (Morais Cabral et al. 1998; Vilorio et al. 2000; Tobelaim et al. 2017; Bracey et al. 2008; Gustina and Trudeau 2012; Stevens, Ju, and Wray 2009). 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 (Busath 1993).

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 (Δ2-24, Δ2-134 Δ24-134) 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 и список литературы, состоящий из 195 наименований. Работа содержит 45 рисунков и 1 таблицу.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

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

Литературный обзор

В начале Литературного обзора рассмотрены строение и существующие механизмы активации ионных каналов, далее подробно описаны структурные модели каналов Eag и их отличие от других потенциал-зависимых каналов. Помимо этого, приведены имеющиеся данные о кластеризации, распределении в клетках разной этимологии и взаимодействии с цитоскелетом других родственных каналов. В конце описаны современные представления о грамицидине А и его применении в качестве модельного объекта для исследования биологических процессов, связанных с ионными каналами.

Материалы и методы

В данном разделе описаны экспериментальные процедуры работы: получение мутантных каналов методом ПЦР, молекулярное клонирование, экспрессия и очистка белка, подготовка образцов для оптической, лазерной конфокальной и электронной микроскопии, получение крио-изображений и построение реконструкции ионных каналов, солюбилизованных в детергенте и встроенных в липосомы.

Результаты и обсуждение

Кластеризация мутантного грамицидина в модельных липосомах

Грамицидин А (gA) является классическим объектом для исследования поведения ионных каналов в липидной мембране с хорошо изученными биофизическими свойствами. gA представляет собой пептид из 15 аминокислот и ведет себя как селективный катионный канал с одной порой (Busath 1993).

В первой части работы рассматривались функции и структура мутантного gA с заменой аланина на лизин в положении 3: [Lys3]gA¹. Для данного мутанта было показано anomальное поведение при введении в состав модельных липосом (рисунок 1).

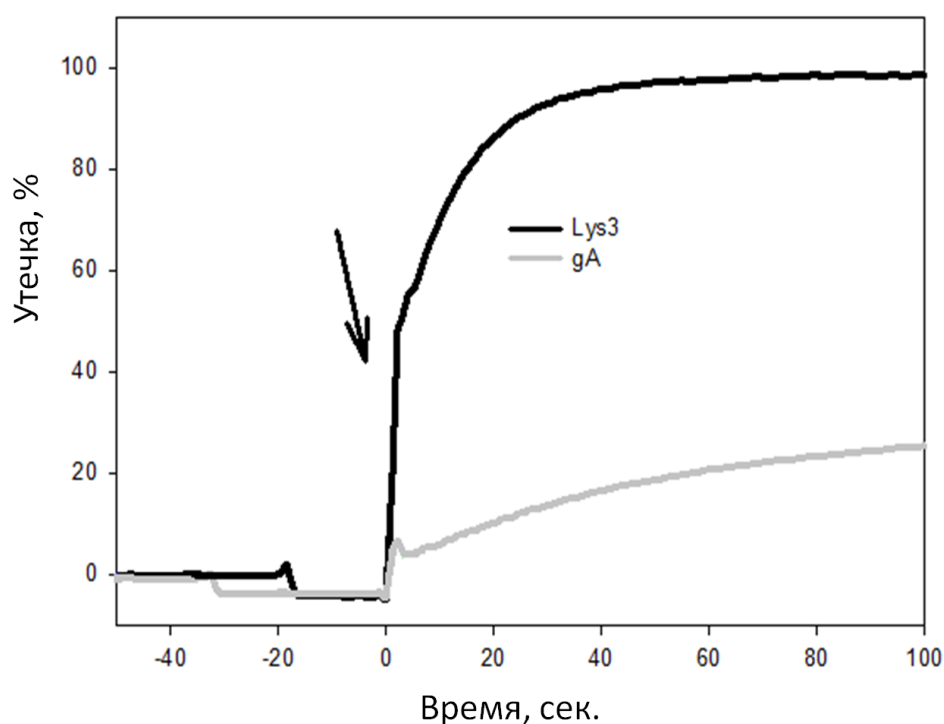


Рисунок 1. Выход карбоксифлюоресциина из липосом после добавления различных пептидов (момент добавления пептида отмечено стрелкой), gA – грамицидин А, Lys3 – мутантный gA.

В отличие от нативного gA, который имеет селективность только для одновалентных катионов, модификация липосом мутантным белком

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

приводила к выходу из них высокомолекулярных зондов: карбоксифлуоресцеин (CF), сульфородамин В (SRB) и декстран с молекулярной массой 3 кДа.

Микрофотографии липосом были получены с использованием криоэлектронной микроскопии (крио-ПЭМ). Полученные изображения обрабатывались с использованием программы ImageJ. В ходе обработки получали отдельные изображения небольших участков билипидного слоя липосомы, их выравнивали и классифицировали. Полученные электронные плотности для липосом и мембран с различными видами gA сравнивали между собой (рисунок 2).

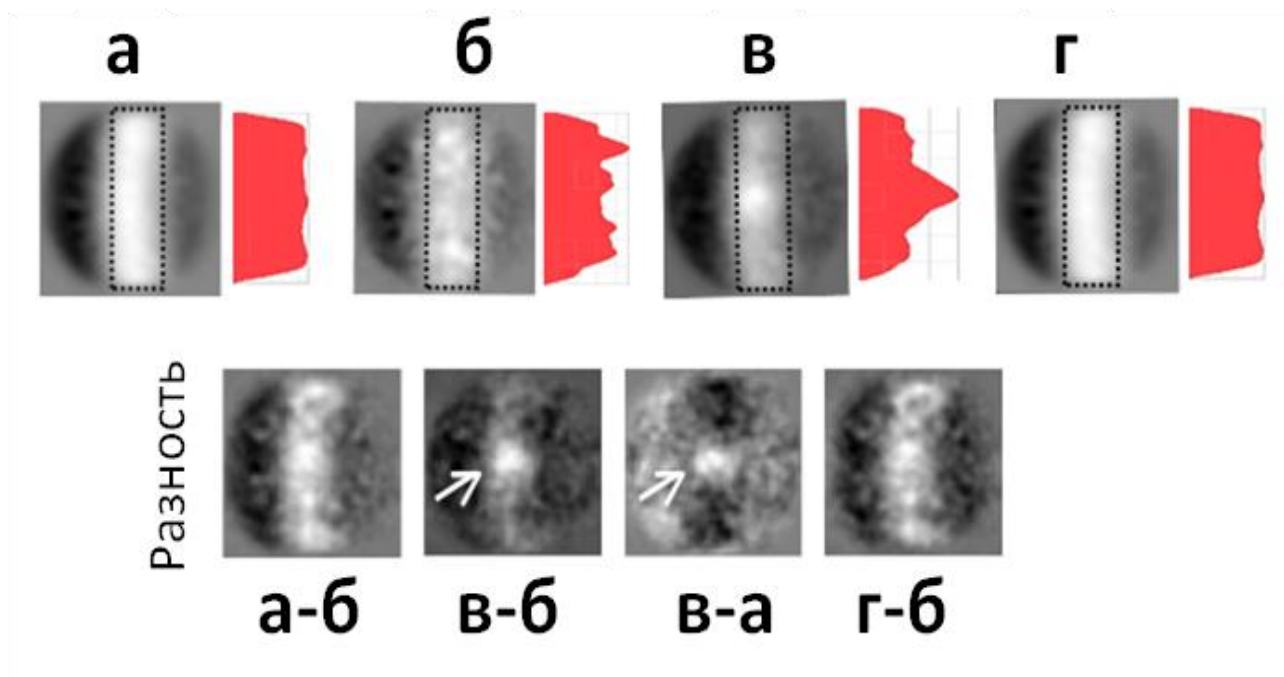


Рисунок 2. Сравнение электронной плотности участков мембран полученных методом кри-ПЭМ, содержащих gA: а – дикий тип; б - контрольные липосомы без белка; в - с мутацией [Lys3]gA; г - смесь дикого типа и [Lys3]gA; Справа - графики распределения интенсивности сигнала внутри прямоугольника, содержащего мембрану. Нижний ряд: разностные изображения. Стрелка указывает на кластер [Lys3]gA.

В ходе моделирования исследований было показано, что [Lys3]gA формирует в мембране пентамеры (рисунок 3) с неселективной порой

состоящие из антипаралельных правозакрученных двухцепочечных димеров. Всего в состав пентамера входит 10 пептидов грамицидина.

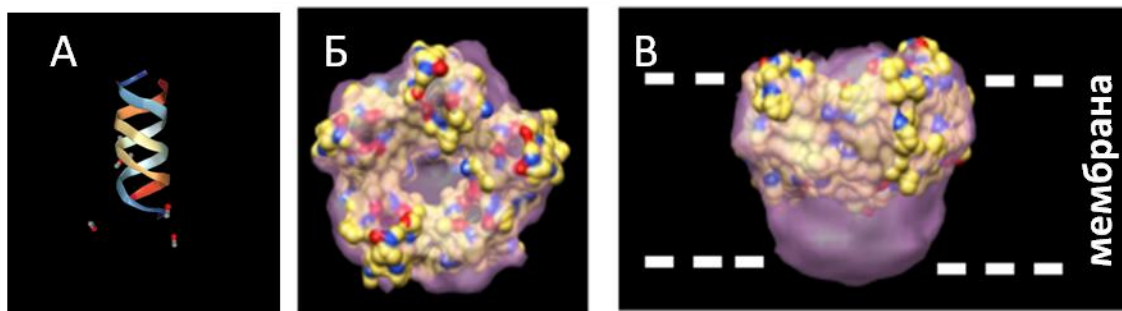


Рисунок 3. Кластеризация [Lys3]gA. (А) - структура димера грамицидина А (PDB ID: 2IZQ); Реконструкция электронной плотности кластера [Lys3]gA с использованием симметрии C_5 и фиттингом моделированной пентамерной структуры грамицидинового комплекса. (Б) вид сверху мембраны; (В) вид сбоку.

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 добавление gA дикого типа приводит к нарушению этих взаимодействий и ингибированию олигомеризации. Использование Грамицидина А, как модельного объекта, показало возможность использование методов электронной микроскопии для оценки образование олигомером потенциал-зависимых каналов.

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

Для каналов Kv10.2, функционирующих в норме как олигомеры (тетрамеры), образованные отдельными α -субъединицами, крайне важны межбелковые взаимодействия, которые определяют как непосредственно функции канала, так и взаимодействие канала с регуляторными белками клетки и элементами цитоскелета. Во второй части работы мы рассматривали значение N-концевых доменов канала Kv10.2 для его

функционирования. Для получения мутантных каналов Kv10.2 была использована конструкция полноразмерного канала с аффинным 1D4-тагом на С-конце (рисунок 4).



Рисунок 4 Схематичное представление использованных конструкций мутантных каналов Kv10.2

Были получены клетки COS-1, экспрессирующие различные варианты канала; результаты солюбилизации каналов в детергенте приведены на рисунке 5. В ходе экспериментов удалось экспрессировать все виды мутантных каналов.

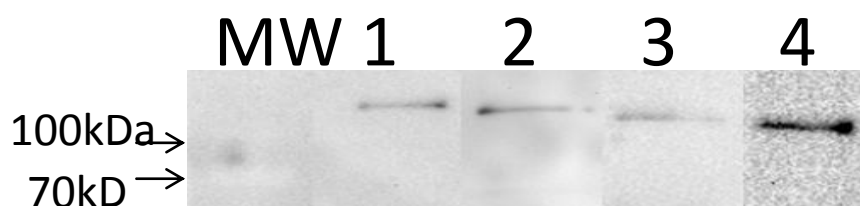


Рисунок 5 Анализ методом иммуноблотинга образцов, полученных в ходе трансфекции клеток COS-1 вектором, содержащим последовательность различных форм канала Kv10.2 с 1D4 тагом. (MW) – маркер молекулярных масс; иммуноокрашивание клеточного лизата клеток, экспрессирующих (1) полноразмерную форму канала и транскрированные формы канала (2) Δ2-24; (3) ΔPAS (Δ24-134); (4) Δ2-134.

Влияние N-концевого домена на электрофизиологические характеристики и транспорт каналов к поверхности клетки

В ходе электрофизиологических исследований² было показано, что внесение аффинной последовательности на С-конец экспрессионной конструкции не влияет на проводимость полноразмерного канала, его активность соответствует активности канала дикого типа, сохраняются основные показатели, время активации и деактивации, амплитуда ответа и потенциал при котором происходит активация канала (рисунок 6).

Kv10.2-1D4

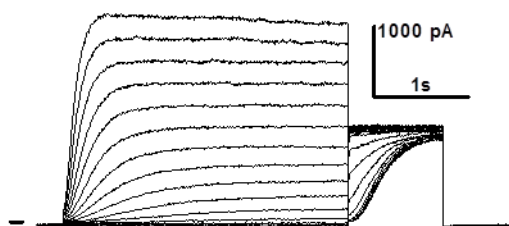


Рисунок 6 Ионные токи канала Kv10.2 с 1D4-тагом на С-конце, использованного в данной работе.

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. Следует заметить, что все мутантные каналы успешно экспрессировались клетками COS-1 и COS-7, хотя при этом нарушался транспорт каналов к мембране клетки (рисунки 7, 8).

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

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

Kv10.2 WT

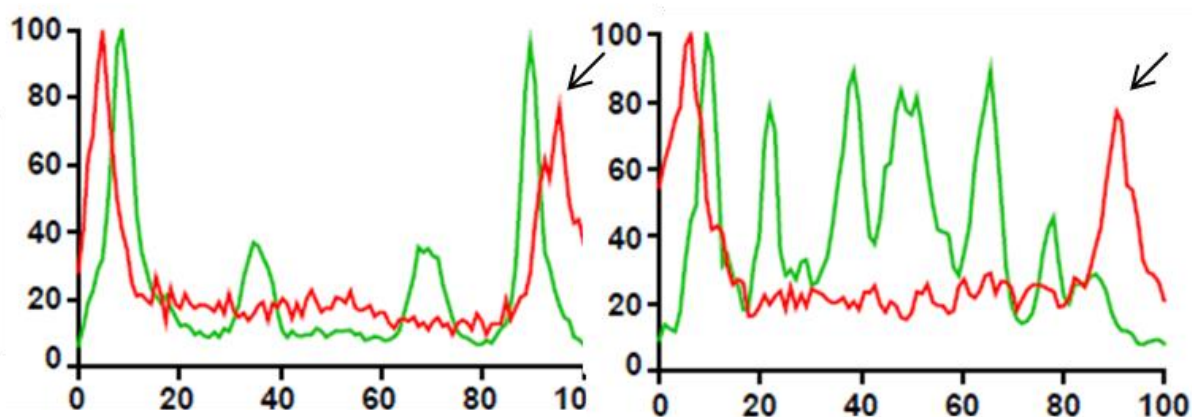
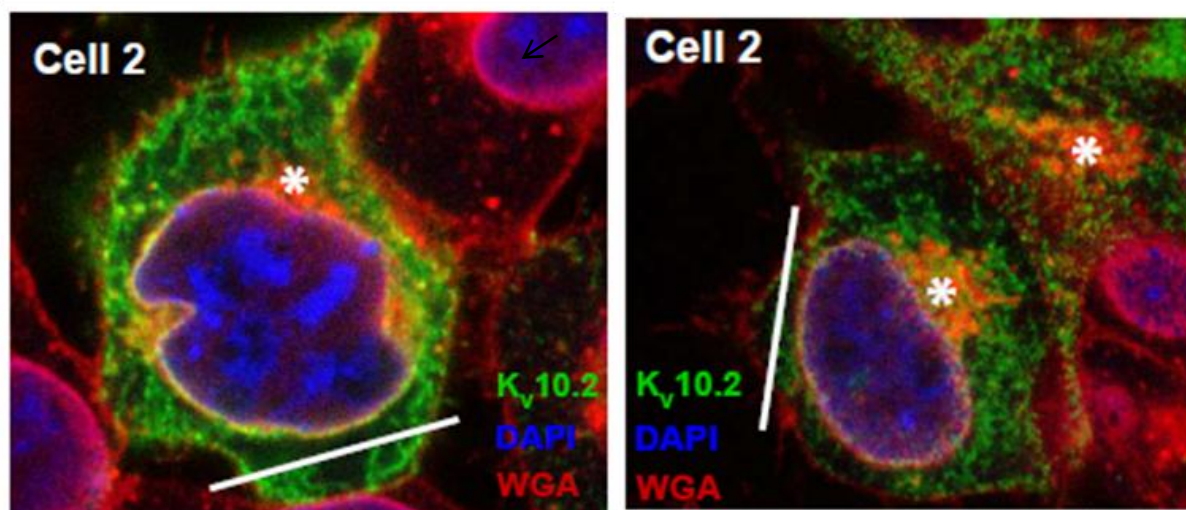
Kv10.2 $\Delta 2-24$ 

Рисунок 7 Верхний ряд - изображение клеток, полученные с использованием конфокальной микроскопии (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, поперечное сечение цитоплазмы клетки. Все измерения даны в условных единицах. Kv10.2 WT – дикий тип каналов; Kv10.2 $\Delta 2-24$ – мутанты с удаленным участком N-CAP. (По оси x - расстояния, по оси y - интенсивность флуоресценции).

Kv10.2 Δ 24-134

Kv10.2 Δ 2-134

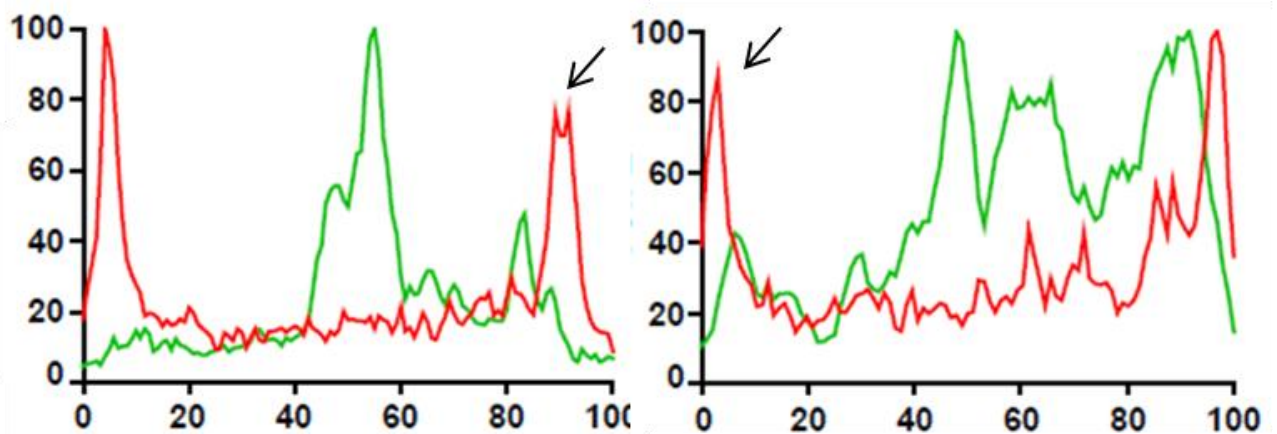
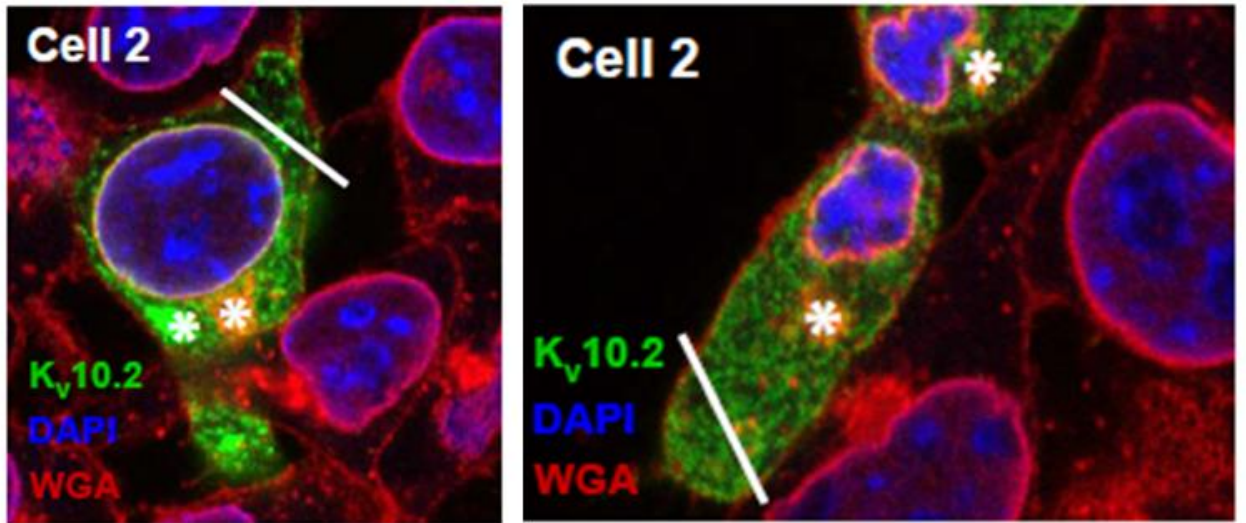


Рисунок 8. Kv10.2 Δ 24-134 – мутанты с удаленным доменом PAS; Kv10.2 Δ 2-134 – мутанты с удаленным доменом EAG. Остальные обозначения, как на рис. 7.

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

Известно, что многие потенциал-зависимые каналы взаимодействуют с элементами цитоскелета (Карлова с соавт., 2011; Bracey et al, 2008; Zhang et al, 2016). В данной работе исследовали взаимодействие канала с актином, как один из основных белков цитоскелета клетки.

Таблица 1 Солокализация сигнала флуоресценции для каналов дикого типа и мутантных каналов Kv10.2 с актином.

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

В ходе обработки изображений в программе ImageJ мы подтвердили, что у полноразмерного канала Kv10.2 наблюдается частичная солокализация с актином, тогда как у мутантных форм канала она отсутствует (таблица 1).

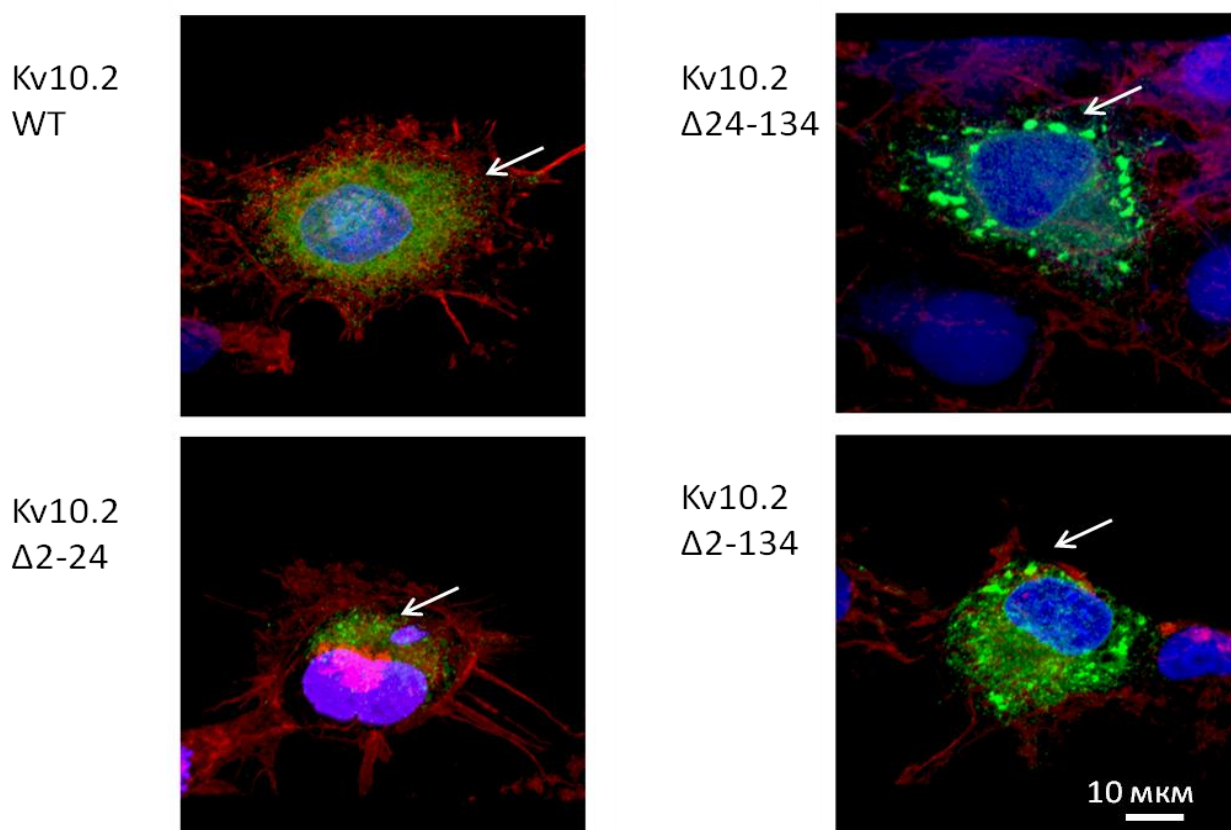


Рисунок 8 Распределение сигнала в клетке от полноразмерного и мутантных каналов. Каналы окрашены первичными антителами к аффинному тагу 1D4, вторичные антитела конъюгированы с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488. Ядра окрашены DAPI, стрелки указывают на кластеры каналов

Ранее было показано, что полноразмерные каналы Kv10.2 способны формировать в мембране небольшие кластеры диаметром от 0,5 до 1 мкм (Карлова с соавт., 2011). В данной работе мы показали, что мутантные Kv10.2 каналы формируют значительно более крупные (до 2 мкм) кластеры, отстоящие друг от друга на большое расстояние (рисунок 8). 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.

Таким образом, мы нашли, что удаление цитоплазматического N-концевого участка приводит к изменению транспорта канала Kv10.2 на поверхность клетки и организации каналов в кластеры, что указывает на то, что функция кластеризации может контролироваться последовательностью, расположенной на C-конце белка канала Kv10.2.

Структура канала Kv10.2 с удаленным доменом PAS

Для определения взаимодействия C- и N-концевых доменов в канале и конформационных изменений при удалении N-концевой последовательности, была рассчитана трехмерная структура изолированного в детергенте молекул белка канала Kv10.2 с использованием данных ПЭМ (рисунок 9). Реконструкция имеет разрешение 22Å. Анализ трехмерной структуры выявил наличие трансмембранного домена с размерами 10×10×5 нм и цитоплазматического с размерами 12×12×5 нм. Фиттинг кристаллической структуры CNBD-домена, полученной по гомологии с доменом цАМФ-зависимого канала HCN4 (PDB-код 3OTF), в электронную плотность транскрированного канала показал хорошую корреляцию (0,87).

При сравнении полученной трехмерной структуры транскрированного канала Kv10.2ΔPAS со структурами полноразмерного канала Kv10.2 (Соколова с соавт., 2012) и родственного канала Kv10.1 с удаленным C-

концом (Whicher and MacKinnon, 2016), мы обнаружили различия в положении цитоплазматических доменов.

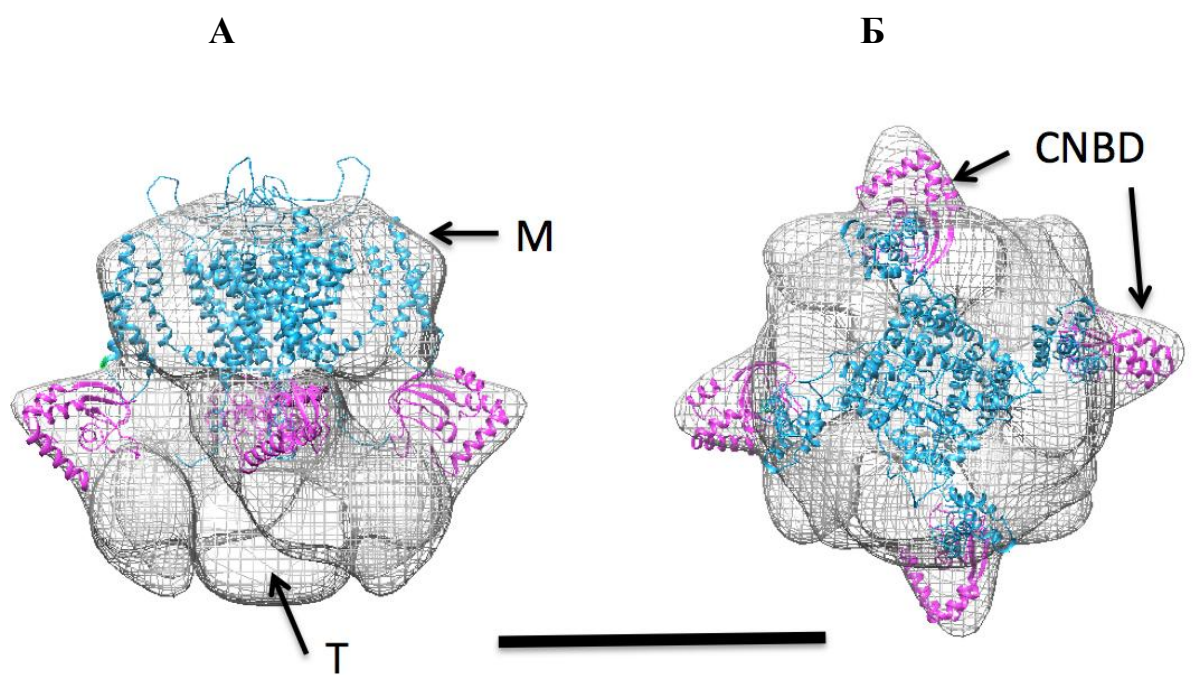


Рисунок 9 Интерпретация трехмерной структуры канала Kv10.2 Δ PAS с помощью фиттинга модели трансмембранного домена в верхнюю часть реконструкции канала и cNBD-доменов в цитоплазматическую часть реконструкции: (А) – вид сбоку, отмечены трансмембранный домен (ТМ) и тетрамеризационный домен (Т); (Б) – вид со стороны трансмембранного домена, отмечены CNBD-домены. Масштабный отрезок – 10 нм.

Удаление N-концевого PAS-домена приводит к изменению общей формы реконструкции. Отдельные CNBD-домены в мутантном канале связаны с центральной плотностью (Т), находящейся на оси симметрии канала (рисунок 9). Известно, что на С-конце канала Kv10 расположен тетрамеризационный CAD-домен, часть которого может являться центральной плотностью (Т). В отсутствие N-концевого домена он также изменяет свое местоположение (рисунок 9). Удаление N-концевых последовательностей у Kv10.2, приводит к перемещению С-концевых доменов ближе к мембранному домену (на $\sim 2\text{\AA}$). В результате они могут взаимодействовать со структурными элементами, ответственными за активацию каналов.

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

Третья часть работы была посвящена изучению механизма активации канала Kv10.2. В недавних работах (Malak et al, 2017; Choveau et al. 2011) был предложен механизм активации каналов *erg* (Kv11) по принципу лиганд/рецептор, в котором особая роль отводится взаимодействию S4-S5 линкера с С-концевым участком спирали S6 (S6T). До сих пор не было показано, что каналы *erg* также активируются по данному механизму.

Для проверки этого положения, мы провели выравнивание последовательностей каналов Kv10 и Kv11 и определили позиции, соответствующие наиболее близкому положению S4-S5 линкера и S6T. По этим позициям были проведены точечные мутации с заменой аминокислот на цистеин (D339C и M474C). При окислении цистеинов с помощью реагента $tbHO_2$ (трет-Бутилгидропероксид) каналы закрывались (рисунок 10А). При коэкспрессии пептида S4-S5 с каналами дикого типа (рисунок 10Б) каналы также закрывались.

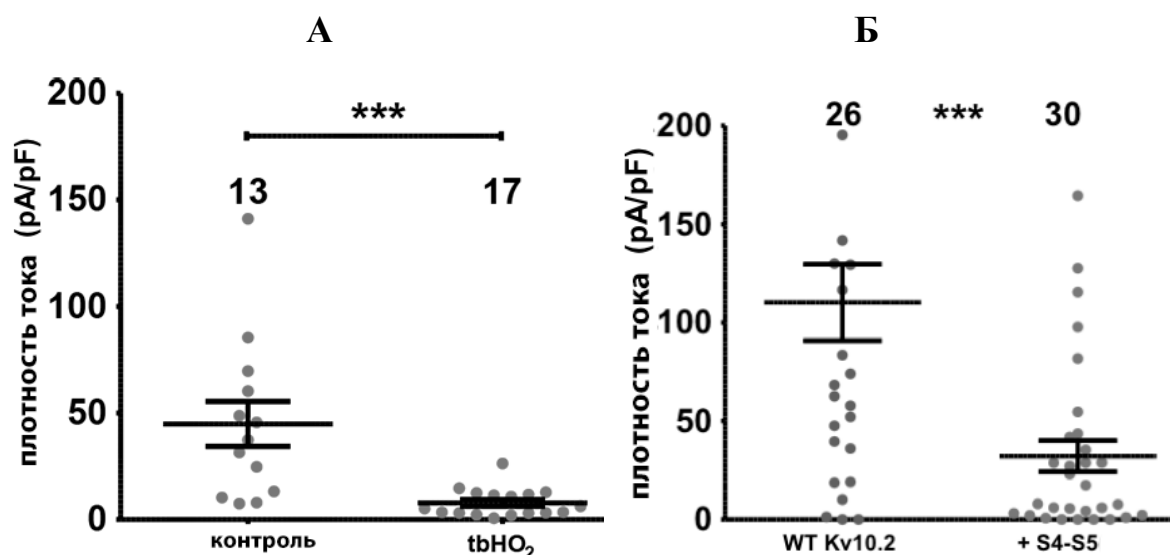


Рисунок 10. Значение линкера S4-S5 для канала Kv10.2. (А) сравнение тока через мутантный канал Kv10.2 D339C/M474C до (контроль) и после обработки $tbHO_2$; (Б) сравнение токов через Kv10.2 канал дикого типа (WT) и после ко-экспрессии его с S4-S5 пептидом.

Из этих экспериментов можно сделать вывод, что для канала Kv10.2 также уместна модель активации по принципу лиганд/рецептор (рисунок 11), где лиганд – S4-S5 линкер, а рецептор располагается на S6T. В пользу данной модели свидетельствует также ограниченный размер S4-S5 линкера у каналов семейства EAG по сравнению с остальными представителями семейств потенциал-зависимых каналов.

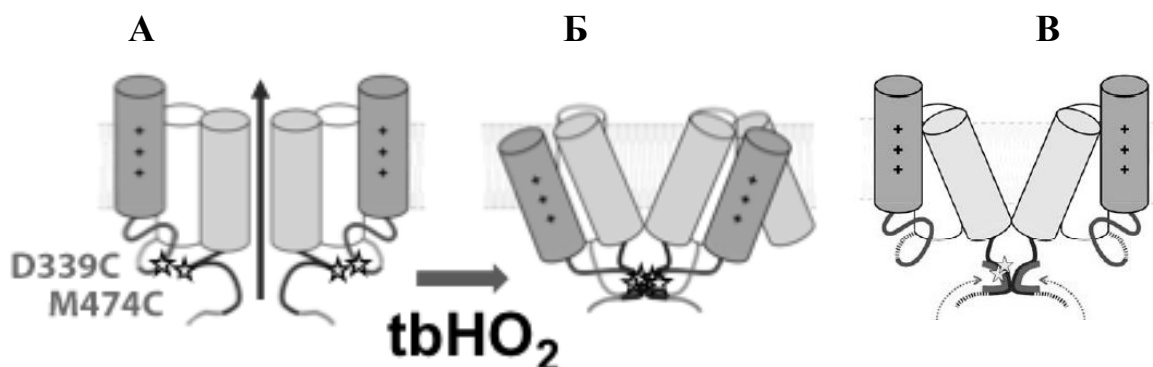


Рисунок 11 Лиганд-рецепторная модель активации канала Kv10.2. (А) открытый канал с мутациями в S4-S5 линкере (лиганд) и S6T (рецептор); (Б) при добавлении реагента $tbHO_2$ канал закрывается; (B) канал также закрывается без перемещения спиралей S4 при взаимодействии с внешним пептидом S4-S5 (стрелки).

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 С-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 С-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 Web of Science, Scopus, РИНЦ.

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 cxbd domain of Kv10.2 channel // Российская международная конференция по криоэлектронной микроскопии RICSEM-2017, Москва, Россия, 6-8 июня 2017. — P. 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. — P. 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.