

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».

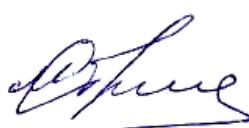
Защита диссертации состоится «22» февраля 2018 г. в \_\_.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

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/](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  $\alpha$ -субъединиц, которые образуют ионную пору. У млекопитающих насчитывается более 70 различных  $\alpha$  субъединиц, образующих большое семейство ионных каналов (Hartmann et al., 1991, Coetze 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 клетки (Morais Cabral et al. 1998; Viloria 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 A (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 40 Å, имеющие пятилучевую симметрию и состоящие из 10 пептидов. Кластеры имеют посередине пору с диаметром ~16 Å, 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 тетramerного 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 стеновых 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 RICCEM-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 этиологии и взаимодействии с цитоскелетом других родственных каналов. В конце описаны современные представление 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]gA<sup>1</sup>. Для данного мутанта было показано аномальное поведение при введении в состав модельных липосом (рисунок 1).

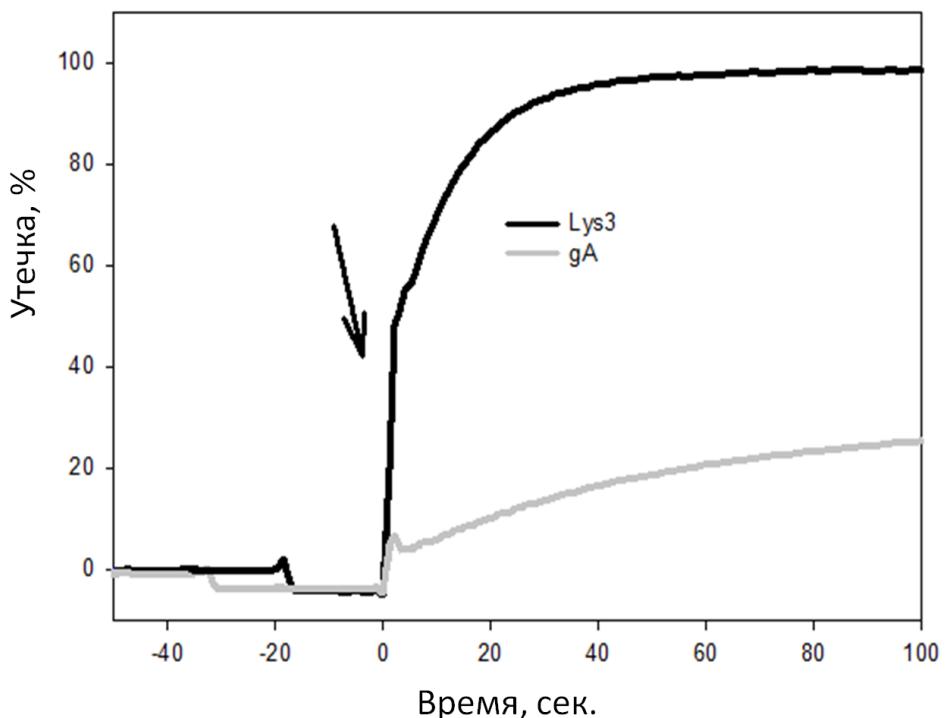


Рисунок 1. Выход карбоксифлюоресцина из липосом после добавления различных пептидов (момент добавления пептида отмечен стрелкой), gA – грамицидин А, Lys3 – мутантный gA.

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

<sup>1</sup> 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).

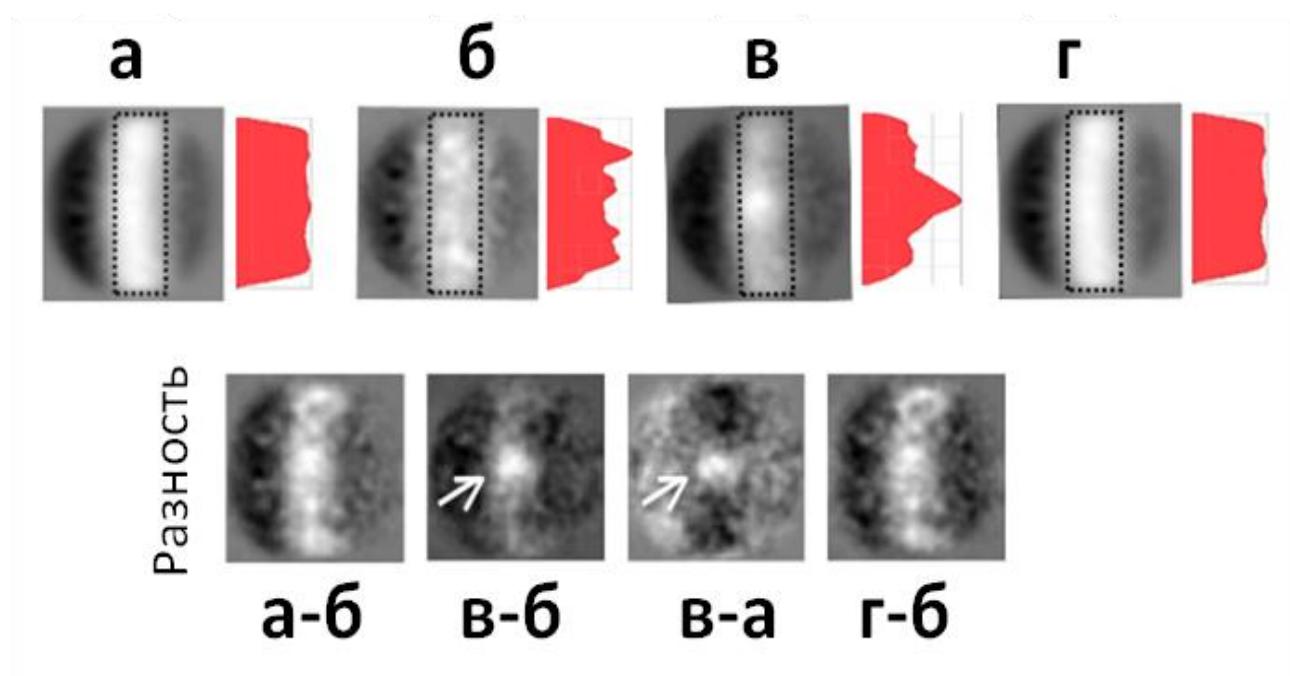


Рисунок 2. Сравнение электронной плотности участков мембран полученных методом кри-ПЭМ, содержащих gA: а – дикий тип; б - контрольные липосомы без белка; в - с мутацией [Lys3]gA; г - смесь дикого типа и [Lys3]gA; Справа - графики распределения интенсивности сигнала внутри прямоугольника, содержащего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

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

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

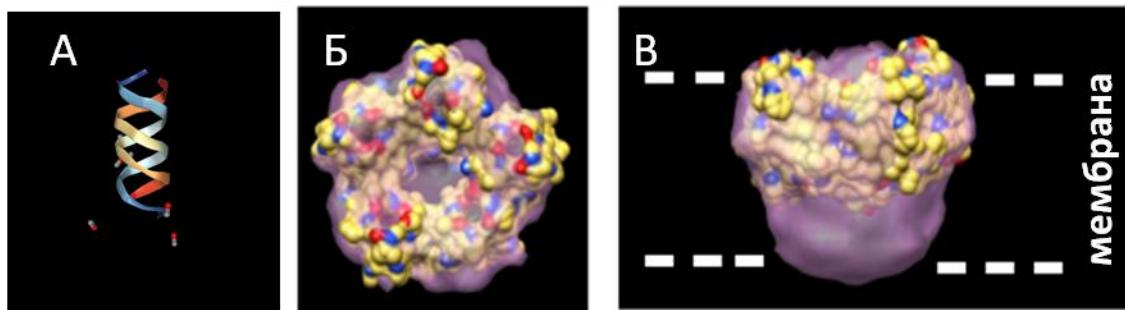


Рисунок 3. Кластеризация [Lys3]gA. (А) - структура димера грамицидина А (PDB ID: 2IZQ); Реконструкция электронной плотности кластера [Lys3]gA с использованием симметрии C5 и фиттингом моделированной пентамерной структуры грамицидинового комплекса. (Б) вид сверху мембраны; (В) вид сбоку.

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  $\pi$ -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  $\alpha$ -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.

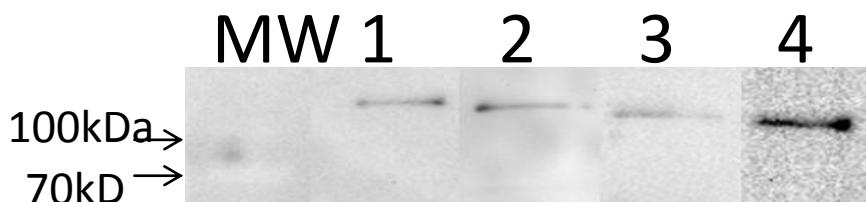


Рисунок 5 Анализ методом иммуноблотинга образцов, полученных в ходе трансфекции клеток COS-1 вектором, содержащим последовательность различных форм канала Kv10.2 с 1D4 тагом. (MW) – маркер молекулярных масс; иммуноокрашивание клеточного лизата клеток, экспрессирующих (1) полноразмерную форму канала и транкированные 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 исследований<sup>2</sup> 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

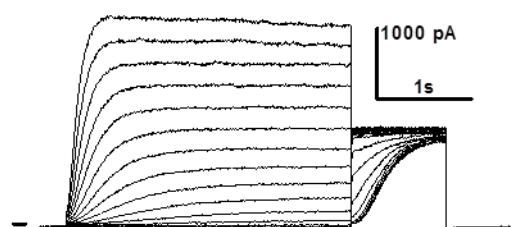


Рисунок 6 Ионные токи канала Kv10.2 с 1D4-тагом на С-конце, использованного в данной работе.

У всех мутантных каналов Kv10.2Δ2-24, Kv10.2Δ25-135, Kv10.2Δ2-134 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.

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

Kv10.2 WT

Kv10.2 Δ2-24

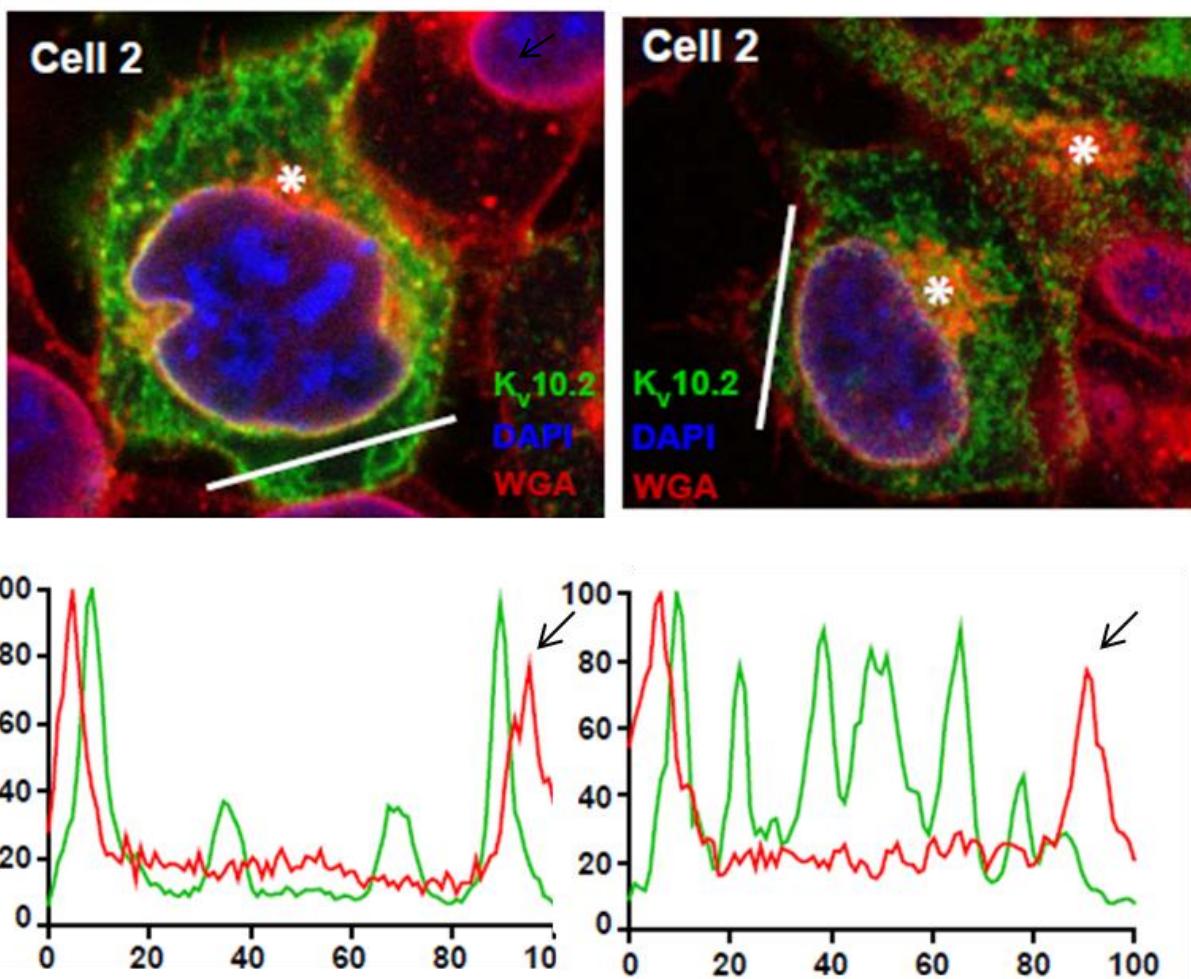
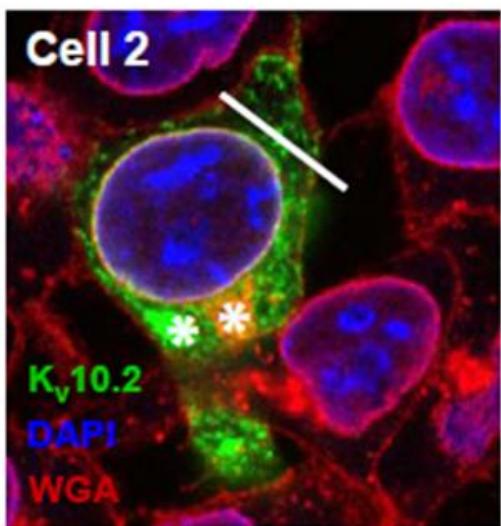


Рисунок 7 Верхний ряд - изображение клеток, полученные с использованием конфокальной микроскопии (каналы окрашены с использованием мышиных антител к 1D4-тагу, вторичные антитела конъюгированы с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488 - зеленый; мечение мембраны с помощью WGA - красный; окраска ядер DAPI - синий). Нижний ряд - денситограммы интенсивности флуоресценции, поперечное сечение цитоплазмы клетки. Все измерения даны в условных единицах. Kv10.2 WT – дикий тип каналов; Kv10.2Δ2-24 – мутанты с удаленным участком N-CAP. (По оси х - расстояния, по оси у - интенсивность флюоресценции).

Kv10.2  $\Delta$ 24-134



Kv10.2  $\Delta$ 2-134

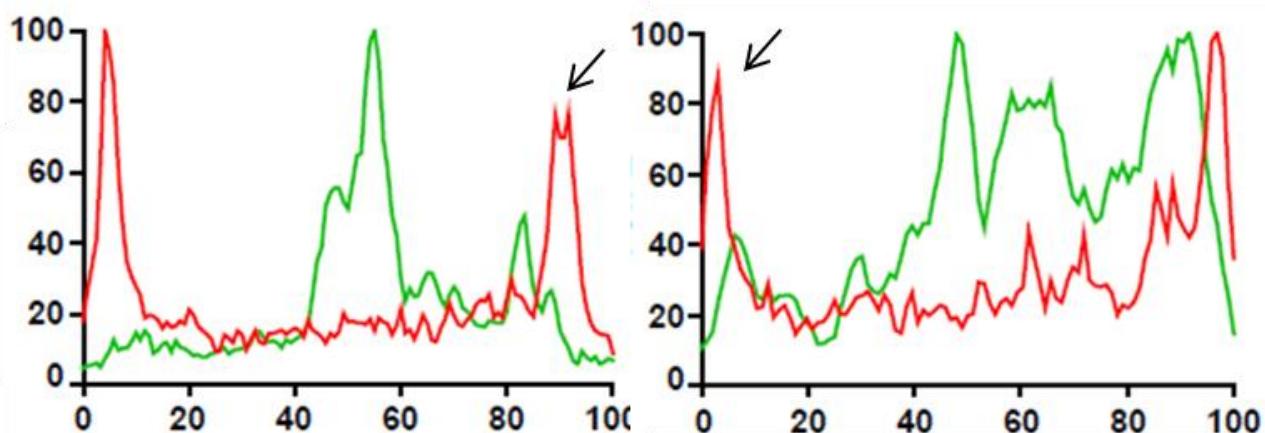
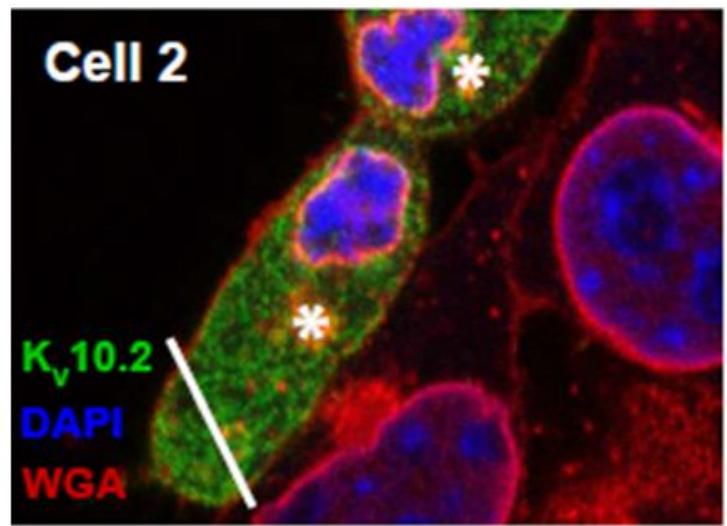


Рисунок 8. Kv10.2 $\Delta$ 24-134 – мутанты с удаленным доменом PAS; Kv10.2 $\Delta$ 2-134 – мутанты с удаленным доменом EAG. Остальные обозначения, как на рис. 7.

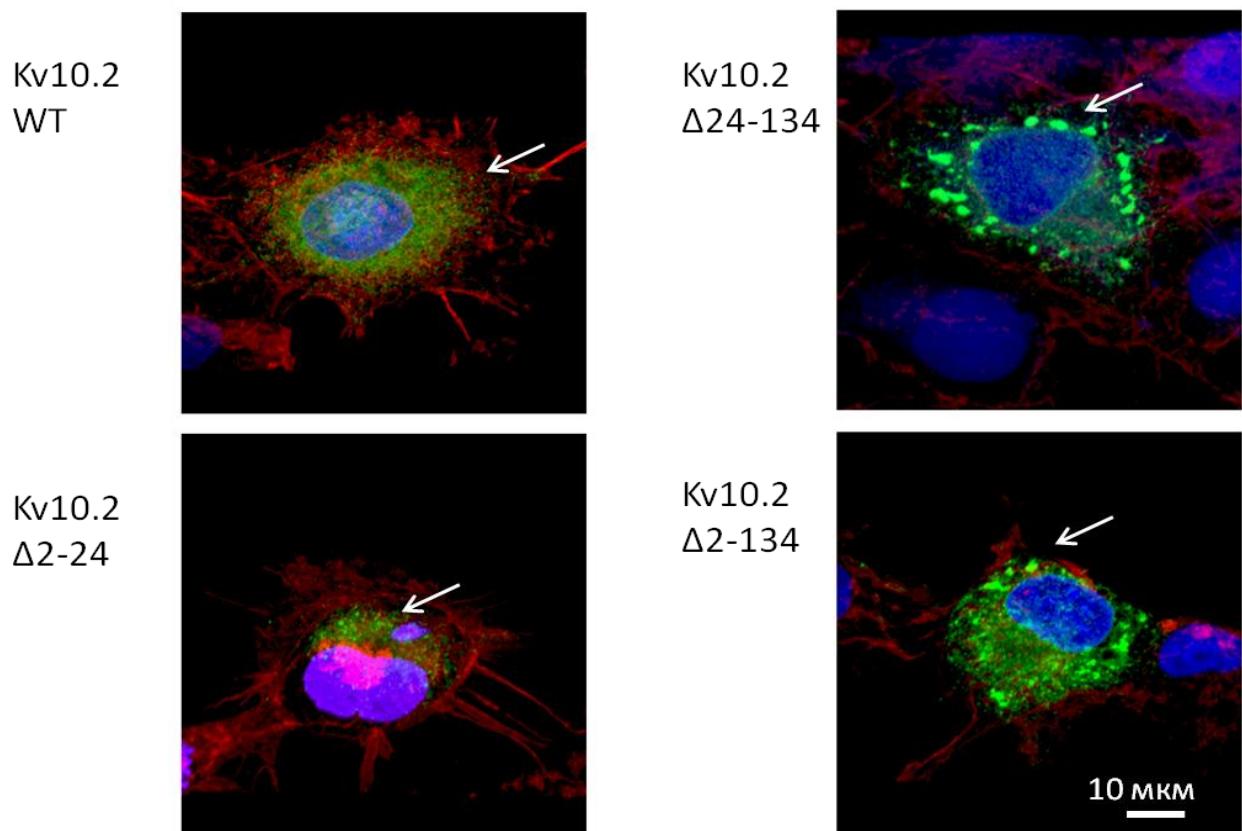
#### Участие N-концевого домена канала Kv10.2 во взаимодействии с цитоскелетом и кластеризация каналов

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.

**Таблица1 Солокализация сигнала флуоресценции для каналов дикого типа и мутантных каналов Kv10.2 с актином.**

Канал	Коэффициент Пирсона
Kv10.2	0.32**
Kv10.2 Δ25-135(PAS)	0.1
Kv10.2 Δ2-24	0.05
Kv10.2 Δ2-135	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 коньюгированы 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 22 $\text{\AA}$ . Анализ трехмерной структуры выявил наличие трансмембранного домена с размерами  $10 \times 10 \times 5$  нм и цитоплазматического с размерами  $12 \times 12 \times 5$  нм. Фиттинг кристаллической структуры CNBD-домена, полученной по гомологии с доменом цАМФ-зависимого канала HCN4 (PDB-код 3OTF), в электронную плотность транкированного канала показал хорошую корреляцию (0,87).

При сравнении полученной трехмерной структуры транкированного канала Kv10.2 $\Delta$ PAS 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.

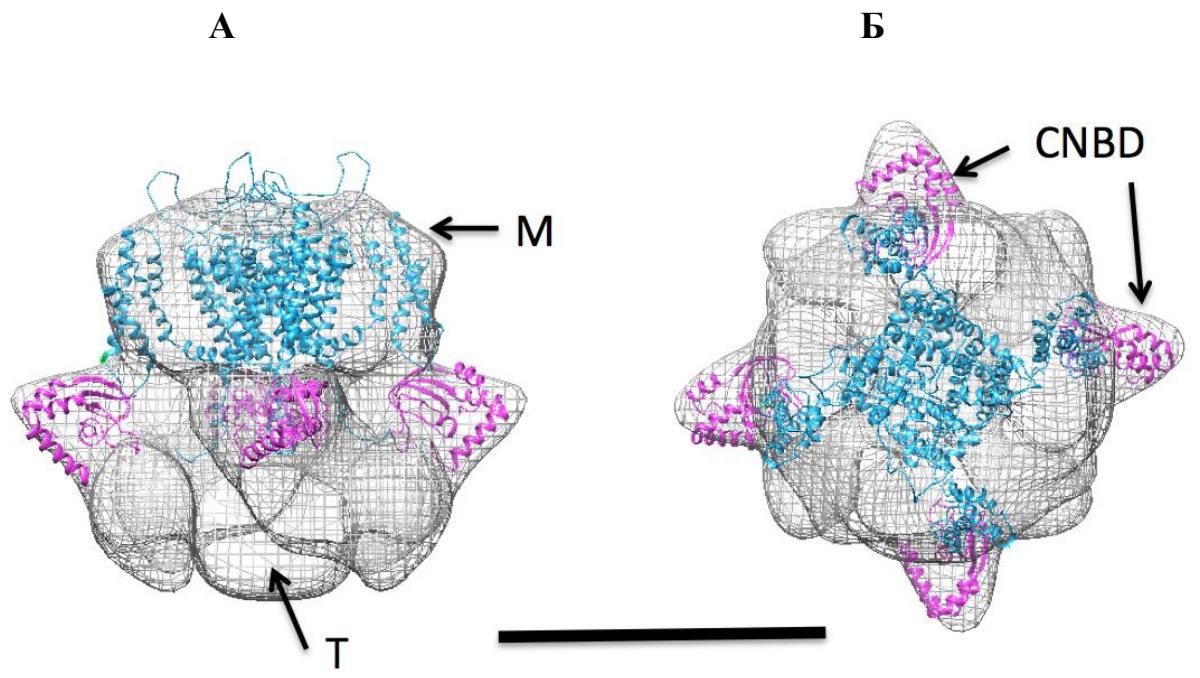


Рисунок 9 Интерпретация трехмерной структуры канала Kv10.2ΔPAS с помощью фиттинга модели трансмембранного домена в верхнюю часть реконструкции канала и сNBD-доменов в цитоплазматическую часть реконструкции: (А) – вид сбоку, отмечены трансмембранный домен (ТМ) и тетрамеризационный домен (Т); (Б) – вид 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 мембранныму 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 C-концевым участком спирали S6 (S6T). До сих пор не было показано, что каналы eag также активируются по данному механизму.

Для проверки этого положения, мы провели выравнивание последовательностей каналов Kv10 и Kv11 и определили позиции, соответствующие наиболее близкому расположению 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<sub>2</sub> (трет-Бутилгидропероксид) каналы закрывались (рисунок 10А). При коэкспрессии пептида S4-S5 с каналами дикого типа (рисунок 10Б) каналы также закрывались.

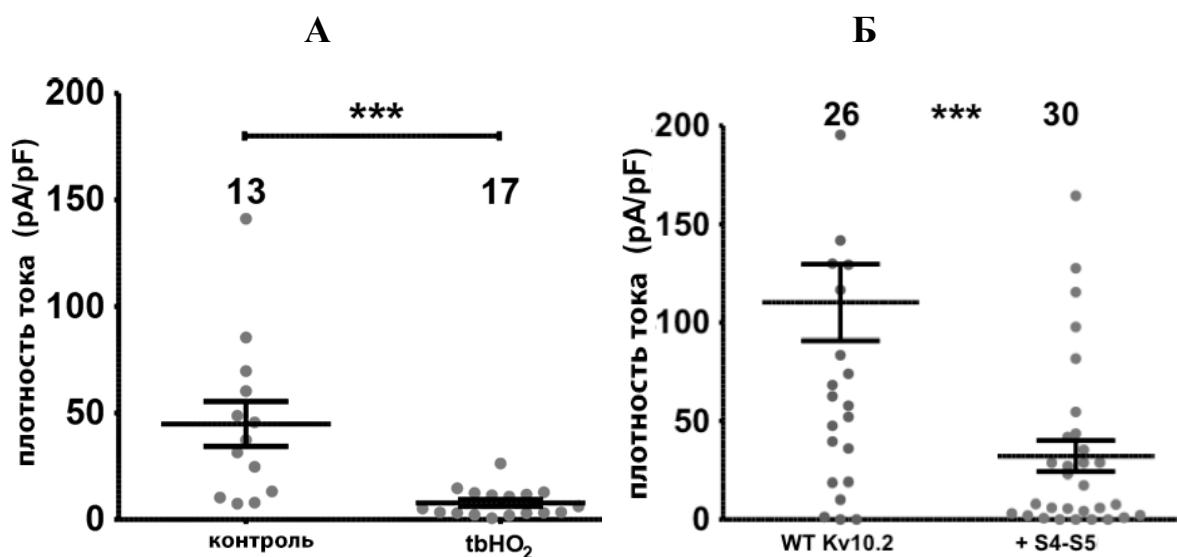


Рисунок 10. Значение линкера S4-S5 для канала Kv10.2. (А) сравнение тока через мутантный канал Kv10.2 D339C/M474C до (контроль) и после обработки tbHO<sub>2</sub>; (Б) сравнение токов через Kv10.2 канал дикого типа (WT) и после ко-экспрессии его с S4-S5 пептидом.

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 receptor 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.

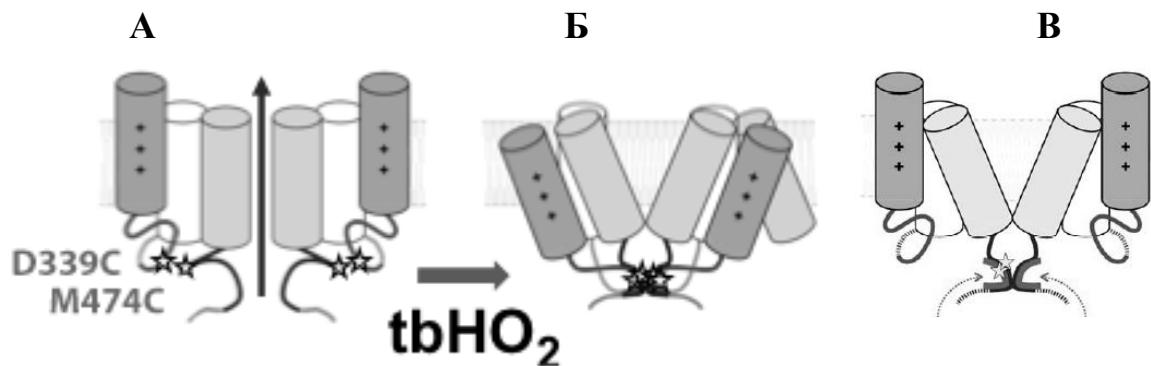


Рисунок 11 Лиганд-рецепторная модель активации канала Kv10.2. (А) открытый канал с мутациями в S4-S5 линкере (лиганд) и S6T (рецептор); (Б) при добавлении реагента tbHO<sub>2</sub> канал закрывается; (В) канал также закрывается без перемещения спиралей S4 при взаимодействии с внешним пептидом S4-S5 (стрелки).

## **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 двухщепочечных 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., Армееев 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-трансдьюсером 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 RICCEM-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 RICCEM-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., Армееев 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. — Р. 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 domein. Biophysics, biophotonics, biotechnology Moscow 16-17 February 2016. — P. 44.