



УДК 577.352.332, 577.352.465

СВОЙСТВА КАЛИЕВОГО КАНАЛА Kv1.1 НА ОСНОВЕ ФЛЮОРЕСЦИРУЮЩЕГО ДИМЕРА АЛЬФА-СУБЪЕДИНИЦ mKate2-Kv1.1-Kv1.1 В КЛЕТКАХ NEURO-2A

© 2025 г. А. В. Ефременко*, Е. В. Крюкова*, О. В. Казаков*, М. П. Кирпичников*, **,
О. В. Некрасова*, А. В. Феофанов*, **, #

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

** Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет,
Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12

Поступила в редакцию 01.06.2025 г.

После доработки 16.06.2025 г.

Принята к публикации 19.06.2025 г.

Изучены свойства потенциал-зависимого калиевого канала Kv1.1, сформированного в клетках Neuro-2a из димеров α -субъединиц Kv1.1 человека, соединенных дипептидом Lys-Leu и слитых по N-концу с флуоресцентным белком mKate2 (mKate2-(Kv1.1)₂). Установлено, что объединение α -субъединиц Kv1.1 в димер не повлияло на уровень мембранной экспрессии канала и характер его клеточного распределения по сравнению с мономерами mKate2-Kv1.1. Для каналов на основе димеров mKate2-(Kv1.1)₂ и мономеров mKate2-Kv1.1 не выявлено отличий в потенциале полуактивации, константах активации канала, величинах и характере токов ионов калия. Полученные данные указывают на возможность создания аналогичным способом биоинженерных белковых конструкций, объединяющих две разные α -субъединицы, которые обеспечат в клетках млекопитающих формирование флуоресцирующих гетеротетрамерных потенциал-зависимых калиевых каналов со стехиометрией α -субъединиц 2 : 2.

Ключевые слова: калиевые каналы, конфокальная микроскопия, пептидные блокаторы, потенциал-зависимые, электрофизиология

DOI: 10.31857/S0132342325050162

ВВЕДЕНИЕ

Потенциал-зависимый калиевый канал Kv1.1 – мембранный гомотетрамерный белок, локализованный преимущественно в различных отделах центральной нервной системы (гиппокампе, мозжечке, ядрах ствола головного мозга [1], где он служит ключевым регулятором нейронной проводимости, обеспечивая процесс реполяризации нейрона. Канал Kv1.1 встречается также в некоторых других органах и тканях, например, в почечном эпителии [2], клетках иммунной системы [3] и кардио-

миоцитах [4], выполняя функцию поддержания клеточного мембранного потенциала.

Помимо гомотетрамерного канала, α -субъединицы Kv1.1, объединяясь с другими гомологичными α -субъединицами Kv1, формируют гетеротетрамерные каналы. В центральной нервной системе наиболее распространены гетероканалы Kv1.1/Kv1.2 и Kv1.1/Kv1.4 [5, 6]. В частности, гетероканалы Kv1.1/Kv1.2 экспрессируются в начальном сегменте аксона, где происходит формирование потенциала действия [7], а также вдоль аксона – в околоперинодальных участках перехватов Ранвье [8]. Функция гетероканалов в этих участках – конт-

Сокращения: БСА – бычий сывороточный альбумин; ERTG – ER Tracker Green, флуоресцентный маркер эндоплазматического ретикулума; HgTx1 – хонготоксин 1; HgTx-GFP – хонготоксин 1, слитый по C-концу с флуоресцентным белком eGFP; mKate2-Kv1.1 – α -субъединица Kv1.1, слитая по N-концу с флуоресцентным белком mKate2; mKate2-(Kv1.1)₂ – димер α -субъединиц Kv1.1, соединенных дипептидом Lys-Leu и слитых по N-концу с флуоресцентным белком mKate2; NСer – NBD-меченый керамид С6, флуоресцентный маркер аппарата Гольджи.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-64-55; эл. почта: avfeofanov@yandex.ru).

роль за порогом активации нейрона, формой и частотой нервного импульса. Гетеротетрамеризация – один из механизмов обеспечения функциональной пластичности каналов Kv1. Образование гетероканалов может сопровождаться не только изменением электрофизиологических свойств каналов, но и их субклеточного распределения. Например, мембранная экспрессия α -субъединицы канала Kv1.1 в нейроне происходит при коэкспрессии с α -субъединицей Kv1.4, а транспорт вдоль аксона α -субъединицы Kv1.1 обеспечивается лишь в составе гетеротетрамеров Kv1.1/Kv1.2 [9].

Развитие ряда заболеваний связано с нарушением уровня экспрессии или изменением функциональной активности гетероканалов. Нарушение функционирования гетероканалов Kv1.1/Kv1.2 обычно приводит к повышенной нейронной проводимости. Наиболее частая причина дисфункции гетероканалов – мутации гена KCNA1, кодирующего α -субъединицу Kv1.1 канала. Эти мутации ассоциированы с такими неврологическими расстройствами, как эпизодическая атаксия 1 типа (EA1) и эпилепсия [6, 10]. Дисфункция гетероканалов Kv1.1/Kv1.2 может быть следствием аутоиммунных процессов, проявляющихся в симптомах энцефалита, нейромиотонии или невропатической боли [8]. С другой стороны, повышенная экспрессия каналов и их диффузное распределение в демиелинизированных аксонах, характерные для различных типов травматических повреждений спинного мозга и при рассеянном склерозе [11], приводят к снижению амплитуды нервных импульсов [12]. Применение блокаторов каналов оказывает в этих случаях терапевтический эффект, подавляя избыточную активность каналов [13].

Известно большое число природных блокаторов канала Kv1.1 – пептидных токсинов из животных ядов, которые обладают несомненным потенциалом как инструменты для изучения этого канала, а также как перспективные фармакологические средства [14, 15]. Аффинность этих блокаторов к гомотетрамерному каналу Kv1.1, экспрессированному в ооцитах лягушки или в клетках млекопитающих, охарактеризована для многих токсинов из яда скорпионов, змей, актиний. Систематического изучения взаимодействия блокаторов с гетеротетрамерными Kv1 каналами не проводилось, и только некоторые из природных токсинов, например, дендротоксины из яда змей, изучены в отношении гетеротетрамерных каналов Kv1.1/Kv1.2, экспрессированных *ex vivo* [16]. Такие исследования затруднены тем, что наиболее простой подход к формированию гетероканалов, ко-экспрессия двух нужных α -субъединиц в клетках, сопровождается образованием нескольких субпопуляций гетероканалов, отличающихся по

стехиометрии входящих в них α -субъединиц, а также гомотетрамерных каналов двух типов [17]. Решение данной проблемы заключается в создании плазмид, кодирующих конкатемеры двух или четырех нужных α -субъединиц [18]. При разработке конкатемерных конструкций необходимо использовать соединяющие α -субъединицы линкеры, которые не влияют на формирование гетероканалов, их структуру и электрофизиологические свойства. Для некоторых таких конструкций успешно использовали линкеры на основе аминокислотной последовательности β -глобина *Xenopus* и дипептида Lys-Leu [19].

Ранее нами разработана концепция создания аналитических клеточных систем для изучения свойств и взаимодействий гомотетрамерных каналов Kv1 с пептидными блокаторами методами флуоресцентной микроскопии [20–22]. Ставя перед собой задачу расширить в дальнейшем эту концепцию на гетеротетрамерные каналы, мы провели исследование свойств гомотетрамерного канала Kv1.1, сформированного α -субъединицами Kv1.1, соединенными в димер линкером Lys-Leu и слитыми на N-конце с флуоресцентным белком mKate2 (mKate2–(Kv1.1)₂, рис. 1а). В работе изучены способность канала Kv1.1 на основе белка mKate2–(Kv1.1)₂ к транспорту в мембрану клетки и к взаимодействию с пептидными токсинами, а также исследованы его электрофизиологические свойства. Проведен сравнительный анализ этих характеристик с характеристиками канала Kv1.1, сформированного α -субъединицами Kv1.1, слитыми с белком mKate2 (mKate2–Kv1.1, рис. 1б), учитывая при этом функциональное сходство каналов на основе mKate2–Kv1.1 и α -субъединиц Kv1.1 [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования влияния объединения α -субъединиц Kv1.1 в димер, слитый с флуоресцентным белком mKate2, на формирование потенциал-зависимых каналов Kv1.1, их экспрессию в плазматической мембране и функциональные характеристики, нами была сконструирована плазида pmKate2-KCNA1-KCNA1. Эта плазида кодирует две α -субъединицы Kv1.1 человека, соединенные дипептидом Lys-Leu, и белок mKate2 присоединенный к N-концу этого димера через полипептид GGGS (mKate2–(Kv1.1)₂, рис. 1а). В каждую α -субъединицу Kv1.1 была введена аминокислотная замена S369T, которая, как показано ранее [21, 23], усиливает мембранную экспрессию канала Kv1.1 в составе конструкции mKate2–Kv1.1, не влияя на электрофизиологические характеристики канала.

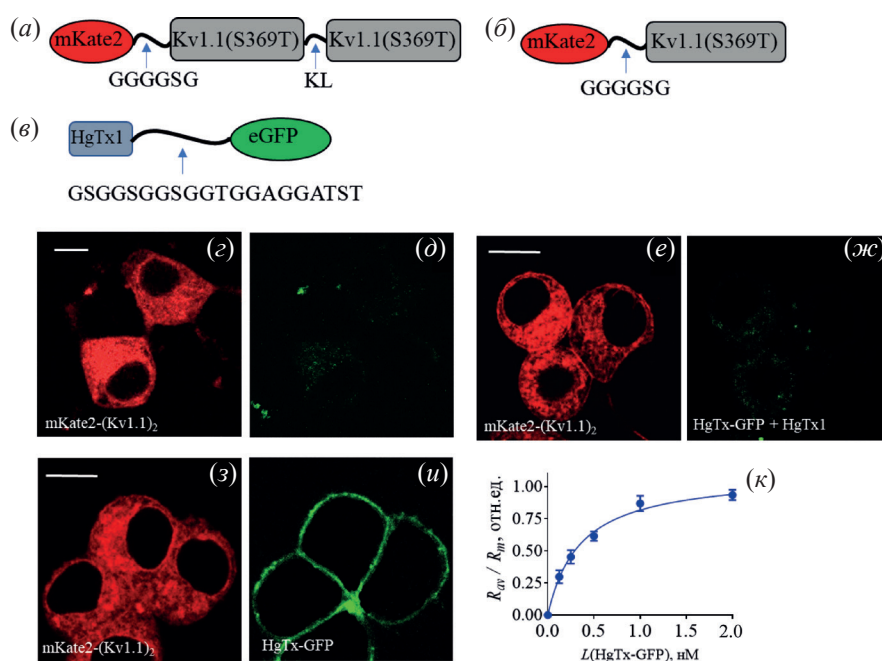


Рис. 1. Экспрессия димеров mKate2-(Kv1.1)₂ в клетках Neuro-2a и взаимодействие образованных димерами каналов с флуоресцентным лигандом HgTx-GFP и пептидом HgTx1. Блок-схемы используемых в работе белковых конструкций mKate2-(Kv1.1)₂ (а), mKate2-Kv1.1 (б) и HgTx-GFP (в). Под блок-схемами приведены аминокислотные последовательности линкеров. (д–и) – Конфокальные изображения клеток, измеренные в красном и зеленом спектральных диапазонах. Красным цветом (д, е, ж) показаны типичные распределения в клетках mKate2-(Kv1.1)₂. Зеленым цветом показано распределение флуоресценции в спектральном диапазоне 500–530 нм в отсутствие лиганда HgTx-GFP (д), в присутствии 1 нМ HgTx-GFP (и) и в присутствии 1 нМ HgTx-GFP и 10 нМ пептида HgTx1 (ж). Метка масштаба – 10 мкм. (к) – Концентрационно-зависимое связывание лиганда HgTx-G с каналами Kv1.1 на основе mKate2-(Kv1.1)₂. Измерения проводили в полной среде. Соотношение R_{av}/R_m характеризует степень связывания лиганда HgTx-GFP с каналами. Данные усреднены по трем независимым экспериментам и представлены в виде среднего ± стандартная ошибка среднего.

При трансфекции клеток Neuro-2a плазмидой pmKate2-KCNA1-KCNA1 с использованием трансфектанта GenJector-U (Молекта, Москва, Россия) белок mKate2-(Kv1.1)₂ экспрессируется в 40–50% клеток, о чем свидетельствует яркая красная флуоресценция mKate2 (рис. 1д,з,е). По данным конфокальной микроскопии экспрессируемый белок локализуется в цитоплазме и в плазматической мембране клеток. Соотношение цитоплазматической и мембранной локализации mKate2-(Kv1.1)₂ варьирует в разных клетках. Анализ методом конфокальной микроскопии с применением флуоресцентных проб, окрашивающих эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, выявил со-локализацию mKate2-(Kv1.1)₂ с этими пробами в цитоплазме клеток (рис. 2). Локализация mKate2-(Kv1.1)₂ в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи отражает общий биогенез ионных каналов в клетках млекопитающих. Поскольку аналогичное клеточное распределение наблюдалось ранее для mKate2-Kv1.1 [21], можно

заключить, что объединение двух α -субъединиц Kv1.1 в димер не повлияло на уровень экспрессии и характер распределения новой белковой конструкции в клетках млекопитающих.

Ранее нами было показано, что хонготоксин 1 (HgTx1) слитый по С-концу с флуоресцентным белком eGFP (HgTx-GFP, рис. 1в), – высокоаффинный лиганд каналов Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, связывающийся с поровым доменом этих каналов и блокирующий ток калия через пору [22]. Сайты связывания HgTx-GFP и HgTx1 либо идентичны, либо перекрываются значительно, что подтверждается конкуренцией этих лигандов за связывание с функционально активными каналами Kv1 [22]. По данным конфокальной микроскопии HgTx-GFP связывается с клетками, экспрессирующими на мембране mKate2-(Kv1.1)₂ (рис. 1з,и). Это связывание тем больше, чем больше mKate2-(Kv1.1)₂ встроено в плазматическую мембрану (о чем можно судить по интенсивности флуоресценции mKate2-(Kv1.1)₂ в мембране). Отметим,

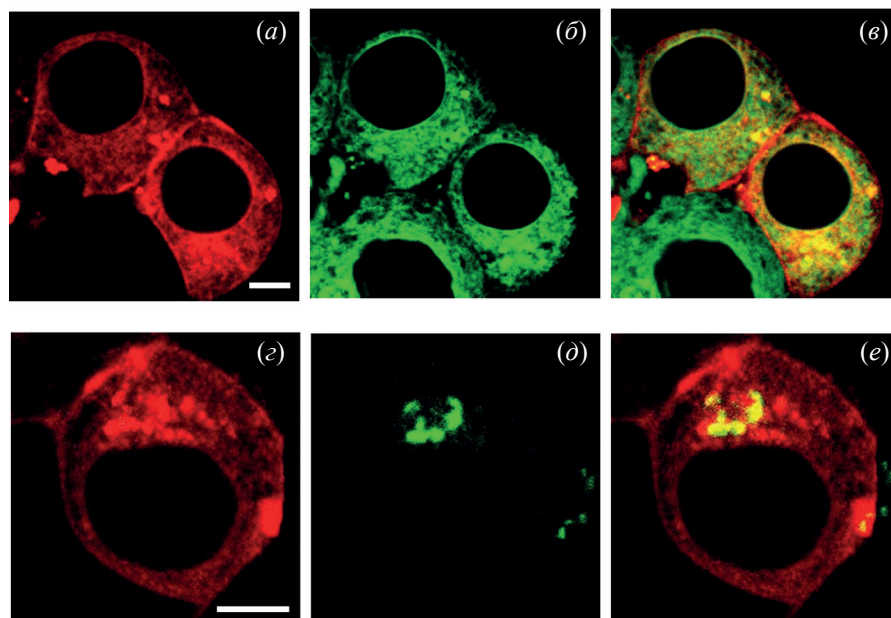


Рис. 2. Анализ методом конфокальной микроскопии с применением флуоресцентных зондов, окрашивающих эндоплазматический ретикулум (*a–b*) и аппарат Гольджи (*z–e*), локализации mKate2-(Kv1.1)₂ в цитоплазме клеток Neuro-2a. (*a, z*) – Красным цветом показаны типичные внутриклеточные распределения mKate2-(Kv1.1)₂. Метка масштаба – 5 мкм. (*б, d*) – Зеленым цветом показаны распределения флуоресцентных зондов ERTG в эндоплазматическом ретикулуме (*б*) и NCeG в аппарате Гольджи (*d*). (*в, e*) – Совмещение изображений распределения mKate2-(Kv1.1)₂ и соответствующего флуоресцентного зонда. Желтый цвет указывает на локализацию mKate2-(Kv1.1)₂ в клеточных структурах, окрашенных флуоресцентным зондом.

что в согласии с опубликованными результатами [22] HgTx-GFP не связывается с мембраной интактных клеток Neuro-2a, а также клеток, в которых после трансфекции отсутствует экспрессия mKate2-(Kv1.1)₂ (данные не показаны). Эти наблюдения позволяют заключить, что HgTx-GFP специфически взаимодействует на мембране клеток с mKate2-(Kv1.1)₂. Вытеснение HgTx-GFP из этих комплексов избытком пептида HgTx1 (рис. 1*е, ж*) указывает на формирование белком mKate2-(Kv1.1)₂ высокоаффинного сайта связывания, характерного для нативного порового домена канала Kv1.1, за взаимодействие с которым конкурируют HgTx-GFP и HgTx1.

Связывание HgTx-GFP с каналами Kv1.1, на основе mKate2-(Kv1.1)₂, происходит при концентрации лиганда больше 0,1 нМ, выходит на насыщение при концентрации больше 1 нМ и характеризуется константой диссоциации комплекса 0.35 ± 0.3 нМ (рис. 1*к*). Такой же константой характеризуются комплексы между HgTx-GFP и каналом Kv1.1, на основе mKate2-Kv1.1 [22]. Это позволяет заключить, что структура сайта связывания пептидных блокаторов в поровом домене канала Kv1.1 не искажается при формировании канала димерами mKate2-(Kv1.1)₂.

Сравнительные исследования методом локальной фиксации потенциала в конфигурации “целая клетка” каналов Kv1.1, образованных мономерами mKate2-Kv1.1 и димерами mKate2-(Kv1.1)₂, показали, что величины токов калия в обоих случаях сходным образом зависят от приложенного к мембране потенциала, и стабильны в течение 200 мс открытого состояния канала (рис. 3*а–в*). Усреднение результатов измерений, выполненных на ограниченной выборке клеток, с расчетом зависимости нормированной проводимости (G/G_m) каналов от приложенного потенциала дает полное совпадение для двух вариантов каналов (рис. 3*з*) и одинаковую расчетную величину потенциала полуактивации каналов ($V_{1/2}$, табл. 1). Согласно этим данным, выбранный способ объединения α -субъединиц в димер mKate2-(Kv1.1)₂ не влияет на потенциал полуактивации образуемого канала. Сравнение кинетических свойств обоих вариантов каналов было проведено путем определения констант их активации (τ_a) при потенциалах мембраны -30 мВ (частичное открытие каналов) и $+50$ мВ (полное открытие каналов). Установлено, что константы активации каналов, образованных мономерами mKate2-Kv1.1 и димерами mKate2-(Kv1.1)₂, достоверно не отличаются, уменьшаясь более чем в 5 раз при увеличении потенциала от -30 до $+50$ мВ (табл. 1).

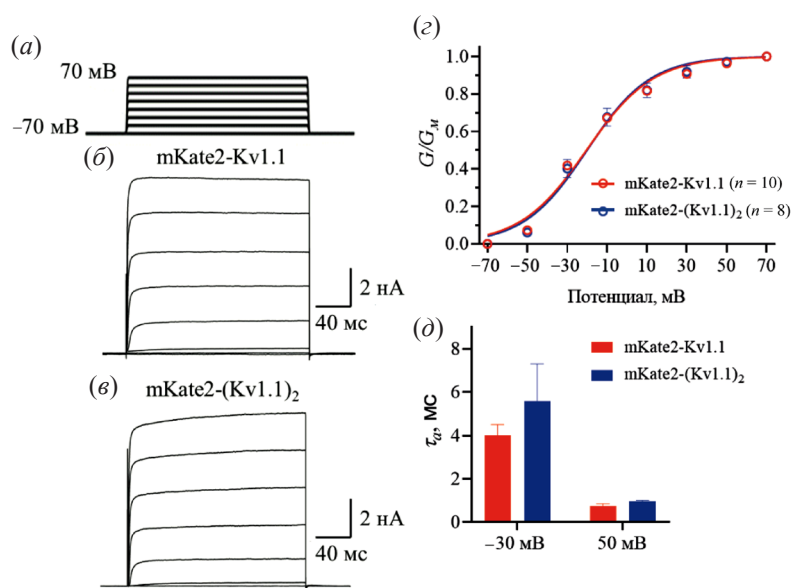


Рис. 3. Сравнение электрофизиологических характеристик каналов Kv1.1, образованных в клетках Neuro2a мономерами mKate-Kv1.1 или димерами mKate-(Kv1.1)₂. (a) – Протокол активации канала. Потенциал мембраны изменяли от –70 до +70 мВ с шагом 20 мВ, после чего возвращали к удерживающему потенциалу. Длительность тестовых импульсов – 200 мс. Интервал между импульсами – 20 с. (б, в) – Характерные потенциал-зависимые выходящие токи ионов калия через каналы, образованные мономерами mKate-Kv1.1 (б) или димерами mKate-(Kv1.1)₂ (в). (г) – Зависимости нормированных проводимостей (G/G_m) каналов, на основе mKate-Kv1.1 или mKate-(Kv1.1)₂, от приложенного потенциала. (д) – Скорости активации (τ_a) каналов, на основе mKate-Kv1.1 или mKate-(Kv1.1)₂, при приложенных потенциалах –30 и 50 мВ.

Таблица 1. Электрофизиологические характеристики каналов Kv1.1, образованных мономерами mKate-Kv1.1 или димерами mKate-(Kv1.1)₂

Белок	mKate-Kv1.1 ($n = 12$)*	mKate-(Kv1.1) ₂ ($n = 6$)
$\tau_a(-30 \text{ мВ})^{**}$, мс	$4.0 \pm 0.5^{***}$	5.6 ± 1.7
$\tau_a(50 \text{ мВ})$, мс	0.75 ± 0.10	0.95 ± 0.06
$V_{1/2}$, мВ	-20 ± 2	-20 ± 2
k	17 ± 2	17 ± 2

* Число измеренных клеток.

** В скобках указан приложенный потенциал.

*** Среднее \pm стандартная ошибка среднего.

По результатам исследований можно заключить, что электрофизиологические характеристики каналов Kv1.1, образованных димерами mKate2-(Kv1.1)₂, не изменяются по сравнению с каналами на основе мономеров mKate2-Kv1.1 и соответствует характеристикам природных каналов Kv1.1 [24–26].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки нейробластомы мыши Neuro-2a выращивали в среде DMEM/F12 (Панэко, Москва, Россия) с добавлением 10% эмбриональной бычьей

сыворотки (INTL KANG F800820, Китай) и 2 mM L-глутамин (“ПанЭко”, Москва, Россия), далее именуемой полной средой. Клетки пересевали два-три раза в неделю при достижении 70–80% конфлюэнтности монослоя. Для трансфекции клетки сажали в 24-луночные планшеты на круглые покровные стекла, предварительно покрытые поли-L-лизин, (3×10^4 клеток на лунку) и выращивали в течение 20–22 ч при 37°C, 5% CO₂. Трансфекцию клеток выполняли плазмидами pmKate2-KCNA1 [21] или pmKate2-KCNA1-KCNA1 с использованием трансфицирующего агента GenJector-U (“Molecula”, Россия) в соответствии с протоколом

производителя. Эксперименты на клетках проводили через 24 ч после трансфекции.

Плазмида pmKate2-KCNA1 кодирует белок mKate2-Kv1.1 – α -субъединицу Kv1.1 человека, слитую на N-конце с флуоресцентным белком mKate2 и содержащую мутацию S369T, которая способствует выносу канала Kv1.1 на мембрану клетки [21].

Плазмиду pmKate2-KCNA1-KCNA1, кодирующую tandemный димер mKate2-Kv1.1-Kv1.1 (mKate-(Kv1.1)₂), получали в два этапа. Сначала в базовой плазмиде pmKate2-KCNA1 был удален стоп-кодон. Для этого ген KCNA1 амплифицировали в реакции ПЦР, используя пару олигонуклеотидных праймеров Kcna1-f1 5'-GACTC-AGATCTATGACGGT GATGTC-3' и Kcna1-Stop-r1 5'-CTTCAAGCTTAAACATCGGTCAGTAGCT-TGCTCT (подчеркнуты сайты узнавания рестриктаз BglIII и HindIII), а затем клонировали в базовую плазмиду по сайтам BglIII/HindIII для замещения гена KCNA1 геном KCNA1-stopless.

Полученная промежуточная плазмида pmKate2-KCNA1-stopless была использована далее для клонирования гена KCNA1 по сайтам HindIII/SalI. Для этого ген KCNA1 амплифицировали в присутствии праймеров Kcna1-Hind-f1 5'-CTTCAAGCTTACGG TGATGTCTGGGAGAAC-3' и Kcna1-Sal-r1 5'-TTCGTCGAC-TCTCCTGCAGTTAAA CATCGGTCAGTAGCT-TGCT-3' (сайты узнавания рестриктаз HindIII, SalGI и PstI подчеркнуты; стоп-кодон TAA выделен жирным шрифтом). Структуру tandemных генов KCNA1 в плазмиде pmKate2-KCNA1-KCNA1 подтверждали секвенированием с помощью праймеров CMV Forward и C1 Reverse ("Евроген", Россия), а также секвенированием фрагментов BglIII/HindIII и HindIII/SalI, полученных при гидролизе этой плазмиды.

Хонготоксин 1 (HgTx1) получали как описано ранее [27]. HgTx1, меченный по C-концу флуоресцентным белком eGFP (HgTx-GFP) получали по методике, опубликованной ранее [22]. Реагенты ER Tracker Green (ERTG) и NBD-меченый C6-Ceramide (NCer) были произведены ThermoFisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США), а бычий сывороточный альбумин (BSA) – компанией Merck (Германия).

При изучении взаимодействия HgTx-GFP с каналами Kv1.1 к трансфицированным клеткам в полной среде добавляли 0,02–4 нМ HgTx-GFP с последующей инкубацией клеток в течение 1 ч (37°C, 5% CO₂). При анализе конкурентного связывания с каналами Kv1.1 клетки инкубировали в полной среде в течение 1 ч с 1 нМ HgTx-GFP и

10 нМ HgTx1. При исследовании локализации mKate2-(Kv1.1)₂ в аппарате Гольджи клетки инкубировали с комплексом NCer-BSA в растворе Хенкса (Панэко, Москва, Россия) в течение 30 мин при 7°C, дважды промывали и инкубировали далее в растворе Хенкса в течение 30 мин при 37°C. При изучении локализации mKate2-(Kv1.1)₂ в эндоплазматическом ретикулуме клетки окрашивали ERTG (30 мкМ, 30 мин) в растворе Хенкса.

В работе использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп SP2 ("Leica Microsystems GmbH", Германия) с водо-иммерсионным объективом 63× (HCX PL APO, NA = 1.2). Конфокальные изображения регистрировали с разрешением 0,6 и 0,2 мкм в аксиальном и латеральном направлениях.

Флуоресценцию mKate2 возбуждали светом с длиной волны 561 нм и регистрировали в области 680–750 нм. При возбуждении флуоресценции HgTx-GFP, NCer или ERTG использовали аргонный лазер с длиной волны 488 нм, а сигнал измеряли в области 500–530 нм. Регистрацию изображений флуоресценции HgTx-GFP и mKate2-(Kv1.1)₂ в клетках выполняли в режиме последовательного сканирования.

Количественные расчеты образования комплексов между HgTx-GFP и каналом Kv1.1 выполняли с использованием измеренных конфокальных изображений и программы ImageJ (версия 1.48, Национальный институт здравоохранения, Бетесда, Мэриленд, США) по методике, разработанной ранее [20]. Для каждой концентрации HgTx-GFP рассчитывали отношения интенсивностей флуоресценции HgTx-GFP и mKate2-(Kv1.1)₂ на плазматической мембране 20–30 клеток, определяли среднее значение этого отношения (R_{av}) и стандартное отклонение. Строили зависимость R_{av}/R_m от концентрации L флуоресцентного лиганда и описывали ее уравнением:

$$R_{av}(L)/R_m = L/(K_d + L), \quad (1)$$

где R_m – максимальное значение R_{av} при насыщении связывания.

Из уравнения (1) определяли константу диссоциации комплексов (K_d), усредняли по трем независимым экспериментам и рассчитывали ошибку среднего.

Для измерения токов калия через каналы применяли метод локальной фиксации потенциала в конфигурации "целая клетка" [20]. Для этого стекла, предобработанные поли-D-лизинном, с трансфицированными клетками Neuro-2a переносили в ячейку с непрерывной перфузией буферного раствора (140 мМ NaCl, 2,8 мМ KCl, 2 мМ

MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 10 mM HEPES и 10 mM D-глюкоза, pH 7.4). В работе использовали микропипетки из боросиликатного стекла с микрофиламентом и сопротивлением кончика 6–8 МОм (“Sutter Instrument”, США). Состав раствора в пипетке: 140 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM MgATP, 6 mM CaCl₂, 0,4 mM NaGTP, 10 mM HEPES, 20 ВАРТА/КОН (pH 7.3). Тестовые импульсы подавали ступенчато от –70 мВ (удерживающий потенциал) до +70 мВ с шагом 20 мВ, а токи регистрировали с помощью усилителя ЕРС-10 (“НЕКА Elektronik”, Германия). Длительность импульсов составляла 200 мс. Исследовали клетки, в которых была видна флуоресценция mKate2. Выборки формировали из 10–15 клеток, в которых выходящие токи были > 2 нА.

Участки выходящего тока I на отрезке от момента активации канала до максимального тока (I_m) описывали уравнением:

$$I(t) = I_m(1 - \exp(-t/\tau_a)), \quad (2)$$

из которого определяли константу времени активации канала (τ_a).

Нормализованную проводимость клетки (g) рассчитывали по формуле:

$$g = I/(V - E_K), \quad (3)$$

где I – величина тока через 200 мс после активации канала, V – активирующий потенциал, E_K – потенциал реверсии (–80 мВ).

Строили зависимость величины g от V и анализировали ее с помощью уравнения Больцмана:

$$g = g_m/(1 + \exp((V_{1/2} - V)/k)), \quad (4)$$

где g_m – максимальная нормализованная проводимость, k – коэффициент наклона кривой, $V_{1/2}$ – потенциал полуактивации каналов.

Величины τ_a и $V_{1/2}$ усредняли по выборке клеток и рассчитывали ошибки среднего.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные нами на примере канала Kv1.1 исследования показали, что объединение α -субъединиц Kv1.1 в димеры с помощью короткого линкера Lys-Leu не влияет на экспрессию таких димеров в плазматической мембране клеток Neuro-2a. Димеры α -субъединиц Kv1.1 сохраняют способность формировать потенциал-зависимые каналы. Ключевые электрофизиологические свойства этих каналов, включая константы активации, потенциал полуактивации, величины и характер выходящих токов калия, не изменяются по сравнению со свойствами каналов, сформированных из мономерных α -субъединиц. Установлено, что структура сайта связывания пептидов-блокаторов,

находящегося в поровом домене, не искажается в случае каналов на основе димеров α -субъединиц Kv1.1, и константа диссоциации соответствующих комплексов не изменяется. Наличие на N-конце димера флуоресцентного белка mKate2 не мешает функционированию образующегося канала, позволяет визуализировать распределение канала в клетках методом флуоресцентной микроскопии, облегчает изучение взаимодействия флуоресцентных лигандов с каналом и измерение констант диссоциации образующихся комплексов.

Полученные результаты позволяют заключить, что исследованный способ объединения α -субъединиц может быть применен для создания димеров, состоящих из разных α -субъединиц, например, Kv1.1 и Kv1.2, которые обеспечат образование гетеротетрамерных каналов Kv1.1-Kv1.2 с соотношением субъединиц 2:2, а их свойства будут соответствовать природным гетероканалам. Формирование флуоресцирующих гетероканалов с заданной стехиометрией α -субъединиц позволит изучить не только электрофизиологические особенности таких каналов, но и их аффинность к пептидным блокаторам, которые используются в исследованиях различных изоформ потенциал-зависимых каналов и их роли в функционировании клеток млекопитающих.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 22-14-00406П).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований. Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – АВФ, ОВН, МПК; экспериментальные работы – АВЕ, ЕВК, ОВК, ОВН; написание статьи – АВЕ, ЕВК, МПК, ОВН, АВФ; анализ данных – АВЕ, ЕВК, ОВК, МПК, ОВН, АВФ; администрирование проекта – МПК, АВФ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Robbins C.A., Tempel B.L. // *Epilepsia*. 2012. V. 53. P. 134–141.
<https://doi.org/10.1111/J.1528-1167.2012.03484.X>
2. Carrisoza-Gaytán R., Salvador C., Diaz-Bello B., Escobar L.I. // *J. Mol. Histol.* 2014. V. 45. P. 583–597.
<https://doi.org/10.1007/S10735-014-9581-4>
3. Fellerhoff-Losch B., Korol S.V., Ganor Y., Gu S., Cooper I., Eilam R., Besser M., Goldfinger M., Chowers Y., Wank R., Birnir B., Levite M. // *J. Neural Transm. (Vienna)*. 2016. V. 123. P. 137–157.
<https://doi.org/10.1007/s00702-015-1446-9>
4. Priest B.T., McDermott J.S. // *Channels*. 2015. V. 9. P. 352–359.
<https://doi.org/10.1080/19336950.2015.1076597>
5. Shamotienko O.G., Parcej D.N., Dolly J.O. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. P. 8195–8201.
<https://doi.org/10.1021/BI970237G>
6. Ovsepian S.V., Leberre M., Steuber V., O'Leary V.B., Leibold C., Oliver Dolly J. // *Pharmacol. Ther.* 2016. V. 159. P. 93–101.
<https://doi.org/10.1016/J.PHARMTHERA.2016.01.005>
7. Lorincz A., Nusser Z. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. P. 14329–14340.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4833-08.2008>
8. Pinatel D., Faivre-Sarrailh C. // *Life (Basel)*. 2020. V. 11. P. 1–22.
<https://doi.org/10.3390/LIFE11010008>
9. Jenkins P.M., McIntyre J.C., Zhang L., Anantharam A., Vesely E.D., Arendt K.L., Carruthers C.J.L., Kerppola T.K., Iñiguez-Lluhi J.A., Holz R.W., Sutton M.A., Martens J.R. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. P. 13224–13235.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0976-11.2011>
10. Paulhus K., Glasscock E. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. 8826.
<https://doi.org/10.3390/IJMS24108826>
11. Lubetzki C., Stankoff B. // *Handb. Clin. Neurol.* 2014. V. 122. P. 89–99.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52001-2.00004-2>
12. Sinha K., Karimi-Abdolrezaei S., Velumian A.A., Fehlings M.G. // *J. Neurophysiol.* 2006. V. 95. P. 1683–1695.
<https://doi.org/10.1152/JN.00899.2005>
13. Judge S.I.V., Bever C.T. // *Pharmacol. Ther.* 2006. V. 111. P. 224–259.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.10.006>
14. Aissaoui D., Mlayah-Bellalouna S., Jebali J., Abdelkafi-Koubaa Z., Souid S., Moslah W., Othman H., Luis J., ElAyeb M., Marrakchi N., Essafi-Benkhadir K., Srairi-Abid N. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2018. V. 111. P. 1146–1155.
<https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2018.01.144>
15. Zhao R., Qasim A., Sophanpanichkul P., Dai H., Nayak M., Sher I., Chill J., Goldstein S.A.N. // *FASEB J.* 2024. V. 38. e23381.
<https://doi.org/10.1096/FJ.202302061R>
16. Akhtar S., Shamotienko O., Papakosta M., Ali F., Oliver Dolly J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 16376–16382.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M109698200>
17. Rea R., Spauschus A., Eunson L.H., Hanna M.G., Kullmann D.M. // *J. Physiol.* 2002. V. 538. P. 5–23.
<https://doi.org/10.1113/JPHYSIOL.2001.013242>
18. Al-Sabi A., Shamotienko O., Ni Dhochartaigh S., Muniyappa N., Le Berre M., Shaban H., Wang J., Sack J.T., Oliver Dolly J. // *J. Gen. Physiol.* 2010. V. 136. P. 273–282.
<https://doi.org/10.1085/JGP.200910398>
19. Solé L., Sastre D., Colomer-Molera M., Vallejo-Gracia A., Roig S.R., Pérez-Verdaguer M., Lillo P., Tamkun M.M., Felipe A. // *Cells*. 2020. V. 9. 1128.
<https://doi.org/10.3390/CELLS9051128>
20. Orlov N.A., Ignatova A.A., Kryukova E.V., Yakimov S.A., Kirpichnikov M.P., Nekrasova O.V., Feofanov A.V. // *Toxins (Basel)*. 2022. V. 14. 858.
<https://doi.org/10.3390/TOXINS14120858>
21. Orlov N.A., Kryukova E.V., Efremenko A.V., Yakimov S.A., Toporova V.A., Kirpichnikov M.P., Nekrasova O.V., Feofanov A.V. // *Membranes (Basel)*. 2023. V. 13. 645.
<https://doi.org/10.3390/MEMBRANES13070645>
22. Ignatova A.A., Kryukova E.V., Novoseletsky V.N., Kazakov O.V., Orlov N.A., Korabeynikova V.N., Larina M.V., Fradkov A.F., Yakimov S.A., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Nekrasova O.V. // *Cells*. 2024. V. 13. 24.
<https://doi.org/10.3390/cells13242096>
23. Zhu J., Watanabe I., Gomez B., Thornhill W.B. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 39419–39427.
<https://doi.org/10.1074/JBC.M107399200>
24. Grissmer S., Nguyen A.N., Aiyar J., Hanson D.C., Mather R.J., Gutman G.A., Karmilowicz M.J., Auperin D.D., Chandy K.G. // *Mol. Pharmacol.* 1994. V. 45. P. 1227–1234.
25. Punke M.A., Friederich P. // *Anesth. Analg.* 2007. V. 104. P. 1256–1264.
<https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000260310.63117.A2>
26. Dinoi G., Morin M., Conte E., Mor Shaked H., Coppola M.A., D'Adamo M.C., Elpeleg O., Liantonio A., Hartmann I., De Luca A., Blunck R., Russo A., Imbrici P. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. 8079.
<https://doi.org/10.3390/IJMS23158079>
27. Nekrasova O., Kudryashova K., Fradkov A., Yakimov S., Saveliyeva M., Kirpichnikov M., Feofanov A. // *J. Biotechnol.* 2017. V. 241. P. 127–135.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.11.030>

Properties of Potassium Channel Kv1.1 on the Basis of Fluorescent Dimer of Alpha-Subunits mKATE2-Kv1.1-Kv1.1 in Neuro-2a Cells

A. V. Efremenko*, E. V Kryukova*, O. V. Kazakov*, M. P. Kirpichnikov*, **, O. V. Nekrasova*, and A. V. Feofanov*, **, #

Phone: +7 (495) 336-64-55; e-mail: avfeofanov@yandex.ru

* Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, Moscow, 117997 Russia

** Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory, 1/12, Moscow, 119234 Russia

The properties of the voltage-gated potassium Kv1.1 channel, formed in Neuro-2a cells from dimers of the human α -subunits Kv1.1 linked by the Lys-Leu dipeptide and fused at the *N*-terminus with the mKate2 fluorescent protein (mKate2-(Kv1.1)₂), were studied. It was found that the linking of α -subunits Kv1.1 into a dimer did not affect the membrane expression of the channel and the features of its cellular distribution compared with monomers mKate2-Kv1.1. No differences were found between channels based on mKate2-(Kv1.1)₂ dimers and mKate2-Kv1.1 monomers in the half-activation potential, channel activation constants, the magnitude and nature of potassium ion currents. The data obtained suggest the possibility of creating bioengineered protein structures by linking two different α -subunits in a similar way, which would form fluorescent heterotetrameric voltage-gated potassium channels with an α -subunit stoichiometry of 2 : 2 in mammalian cells.

Keywords: potassium channels, confocal microscopy, peptide blockers, voltage-gated, electrophysiology