



УДК 577.29

## ПОДХОД “РАЗДЕЛЯЙ И ВЛАСТВУЙ” ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ МУЛЬТИДОМЕННЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ НА ПРИМЕРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПОТЕНЦИАЛ-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ДОМЕНОВ КАНАЛОВ Kv2.1 И Nav1.4 ЧЕЛОВЕКА<sup>1</sup>

© 2017 г. М. Ю. Мышкин<sup>\*, \*\*</sup>, А. С. Парамонов<sup>\*, \*\*\*</sup>, Д. С. Кульбацкий<sup>\*, \*\*\*</sup>, Е. Н. Люкманова<sup>\*, \*\*\*</sup>, М. П. Кирпичников<sup>\*, \*\*\*</sup>, З. О. Шенкарёв<sup>\*, \*\*, #</sup>

<sup>\*</sup>ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

<sup>\*\*</sup>Московский физико-технический институт (государственный университет), 141700, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский пер. 9

<sup>\*\*\*</sup>Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова, 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

Поступила в редакцию 21.06.2017 г. Принята к печати 04.07.2017 г.

Потенциал-зависимые K<sup>+</sup>- и Na<sup>+</sup>-ионные каналы вовлечены в широкий спектр физиологических процессов, включая возбудимость сердечных, мышечных и нервных клеток, а также секрецию гормонов и нейромедиаторов. Эти каналы имеют модульную структуру и состоят из пяти мембранных доменов: четырех потенциал-чувствительных доменов (ПЧД) и одного порового домена. На ПЧД различных каналов локализованы уникальные сайты связывания с лигандами, поэтому ПЧД рассматриваются в качестве перспективных фармакологических мишеней. Модульная организация ионных каналов позволяет ставить задачи по структурным ЯМР-исследованиям изолированных ПЧД отдельно от поры. В настоящей работе рассмотрена возможность таких исследований на примере ПЧД канала Kv2.1 человека и первого ПЧД канала Nav1.4 человека. Разработаны сопряженные системы бесклеточного синтеза на основе бактериального экстракта S30 из *E. coli*, позволяющие получать миллиграммовые количества препаратов ПЧД, включая меченые стабильными изотопами аналоги. Важным этапом ЯМР-исследований является подбор мембраномоделирующей среды, обеспечивающей долговременную стабильность природной структуры мембранного белка в растворе и высокое качество ЯМР-спектров. Скрининг различных сред показал, что домены каналов Kv2.1 и Nav1.4 нестабильны в средах, содержащих фосфолипиды: мицеллах короткоцепочечного липида DC7PC и липид-детергентных бицеллах на основе цвиттер-ионных или анионных насыщенных липидов (DMPC и DMPG). Показано, что оптимальной средой для структурных ЯМР-исследований являются смеси цвиттер-ионного и слабokatионного детергентов (FOS-12/LDAO). Однако, несмотря на высокое качество спектров, образец ПЧД канала Nav1.4 в окружении FOS-12/LDAO необратимо агрегировал в течение нескольких дней. Вероятно, ПЧД K<sup>+</sup>- и Na<sup>+</sup>-каналов человека не являются полностью автономными мембранными доменами и для их стабилизации необходимы контакты с другими доменами канала.

*Ключевые слова:* сопряженная бесклеточная система синтеза, мембраномоделирующие среды, мембранные белки, ионные каналы, потенциал-чувствительный домен, ЯМР-спектроскопия.

DOI: 10.7868/S0132342317060033

<sup>1</sup>Статья публикуется по материалам сообщения, представленного на VIII Российском симпозиуме “Белки и пептиды”, 18–22 сентября 2017 г., г. Москва.

Сокращения: 1D – одномерный; 2D – двумерный; DHPC – дигексаноилфосфатидилхолин; DC7PC – дигептаноилфосфатидилхолин; DMPC – димиристоилфосфатидилхолин; DMPG – димиристоилфосфатидилглицерол; FOS-10–n–децилфосфохолин; FOS-12 (DPC), n–додецилфосфохолин; FOS-14–n–тетрадецилфосфохолин; LDAO, n–додецил–N, N–диметиламин–N–оксид; LS – лаурилсаркозинат натрия; LPPG – лизопальмитоилфосфатидилглицерол; TROSY – transverse relaxation–optimized spectroscopy; SDS – додецилсульфат натрия, a.o. – аминокислотный остаток; СБСС – сопряженная бесклеточная система синтеза; МБ – мембранный белок; ПЧД – потенциал-чувствительные домены; ТМ – трансмембранный; ТС – трансляционная смесь; ПС – питающая смесь.

# Автор для связи: (тел.: +7(495)336-59-29, эл. почта: zakhar-shenkarev@yandex.ru).

## ВВЕДЕНИЕ

Потенциал-зависимые  $K^+$ -,  $Na^+$ - и  $Ca^{2+}$ -каналы (Kv, Nav и Cav) принадлежат суперсемейству катион-селективных ионных каналов, имеющих в своем составе поровую петлю (П-петля или P-loop) [1, 2]. Эти мембранные белки (МБ) играют важную роль в функционировании сердечнососудистой, нервной и мышечной систем организма, в частности, отвечая за проведение нервного импульса, секрецию гормонов и нейромедиаторов [1]. Нарушение работы потенциал-зависимых каналов приводит к развитию ряда заболеваний, например, мутации канала Nav1.4 скелетной мускулатуры вызывают периодический паралич, миастению и миотонию [1], а дисфункции канала Kv2.1 мозга вызывают судорожные расстройства [3]. Кроме того, каналы Kv2.1 участвуют в регуляции гибели нейронов при инсульте и нейродегенеративных расстройствах [4], а также играют важную роль в секреции инсулина и соматостатина клетками поджелудочной железы [5].

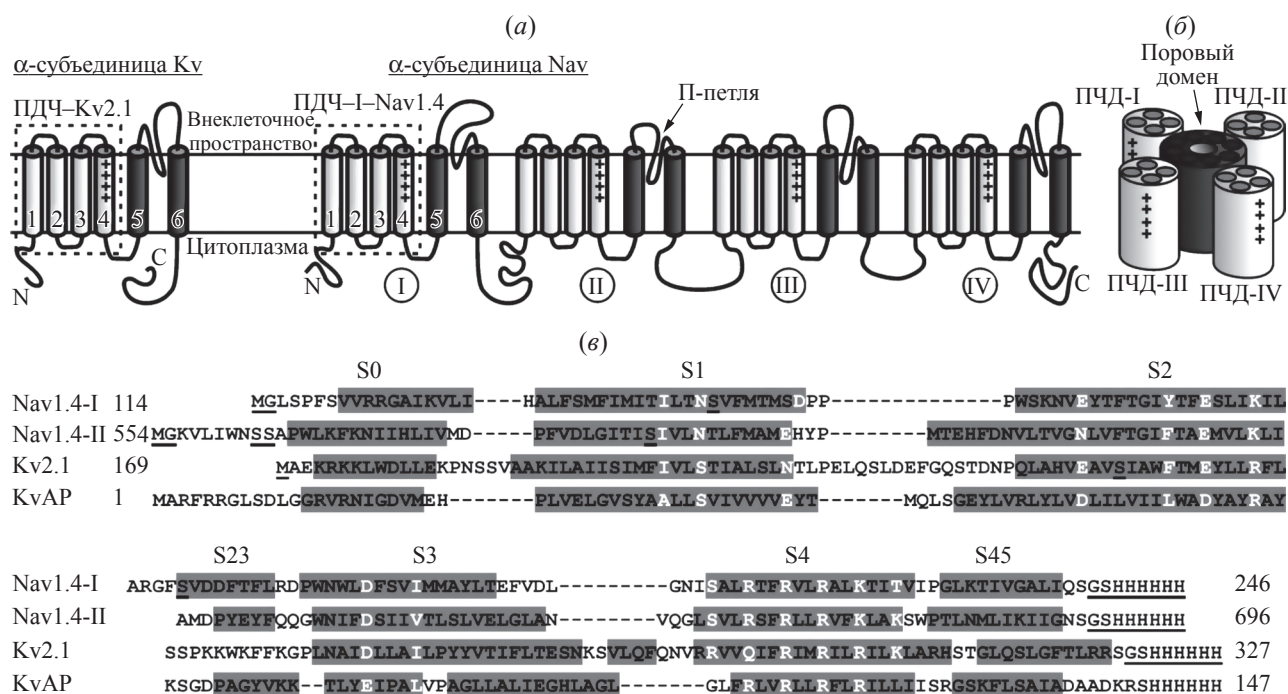
За последнее десятилетие достигнут большой прогресс в понимании принципов организации потенциал-зависимых каналов. Методами рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии определены структуры нескольких  $K^+$ - и  $Na^+$ -каналов прокариотического и эукариотического происхождения [6–10], включая канал Cav1.1 скелетных мышц кролика [11] и Nav-канал FPC1 из американского таракана *Periplaneta americana* [12]. Тем не менее, многие вопросы, касающиеся механизмов потенциал-зависимой активации, остаются малоизученными. К таким не решенным вопросам относятся конформационные перестройки, происходящие в молекуле канала при изменении ТМ-потенциала [13, 14], а также механизмы действия лигандов, модулирующих потенциал-зависимую активацию [15, 16].

Потенциал-зависимые каналы имеют гомологичное модульное строение и состоят из четырех одинаковых субъединиц (Kv-каналы и Nav-каналы прокариот) или четырех псевдо-субъединиц в составе слитной полипептидной цепи ( $\alpha$ -субъединицы Nav и Cav каналов эукариот). Каждая из (псевдо-)субъединиц включает в себя потенциал-чувствительный (рецепторный) домен (ПЧД ~150 а.о.), сформированный четырьмя ТМ-спиралями (S1–S4), и фрагмент (S5–S6), который совместно с П-петлей формирует пору канала (рис. 1а). Функциональный ионный канал образуется при тетрамеризации отдельных (псевдо-)субъединиц в мембране и его ТМ-часть включает в себя пять мембранных доменов: один поровый и четыре ПЧД (рис. 1б).

Сайты связывания природных и синтетических лигандов, действующих на потенциал-зависимые каналы, располагаются как на поровом домене, так и на ПЧД [18]. При этом, в отличие от консервативных участков поры, лиганд-связывающие участки ПЧД различных Kv-каналов и четырех ПЧД (I–IV) в составе одного Nav- или Cav-канала демонстрируют значительную варибельность и имеют разную фармакологию [8, 19]. Это делает ПЧД перспективной мишенью для разработки новых лекарственных препаратов [8, 20].

Модульная организация потенциал-зависимых каналов позволяет предположить, что в некоторых случаях задачи их изучения могут быть упрощены и сведены к исследованию фрагментов, содержащих изолированные ПЧД [21, 22]. Возможность применения этого подхода, который может быть условно назван как “разделяй и властвуй”, основывается на следующих наблюдениях: (1) структуры высокого разрешения, полученные для Kv- и Nav-каналов, показывают слабую ассоциацию ПЧД с порой, и домены в каналах разделены тонким слоем липидных молекул [6]; (2) методами белковой инженерии ПЧД могут быть пересажены на молекулы потенциал-независимых  $K^+$ -каналов, что приведет к созданию потенциал-чувствительных химер [23, 24]; (3) кроме того, существуют природные потенциал-зависимые мембранные белки (протонные каналы Hv1 [25] и фосфотазы VSP [26]), мембранные части которых содержат только четыре спирали S1–S4 и образуют ПЧД-подобные домены. Ранее подход “разделяй и властвуй” был успешно применен для структурных исследований ПЧД канала KvAP археи *Aeropyrum pernix* [15, 21, 27–29].

Важным этапом структурных исследований МБ является подбор мембраномоделирующей среды, обеспечивающей долговременную стабильность природной структуры белка. Предыдущее исследование изолированного ПЧД–II канала Nav1.4 человека выявило низкую стабильность домена в средах на основе фосфолипидов (мицеллы короткоцепочечных липидов, липид-детергентные бицеллы и липид-белковые нанодиски) [22]. В качестве основной причины нестабильности рассматривалось слабое электростатическое отталкивание между молекулами домена (расчетный заряд  $\pm 0$  при нейтральных pH) [22]. Сравнение с результатами, полученными для ПЧД–KvAP (заряд +5), позволило предположить, что изолированные ПЧД каналов человека, несущие бóльший электрический заряд, возможно, будут иметь бóльшую стабильность в средах на основе фосфолипидов. В настоящей работе



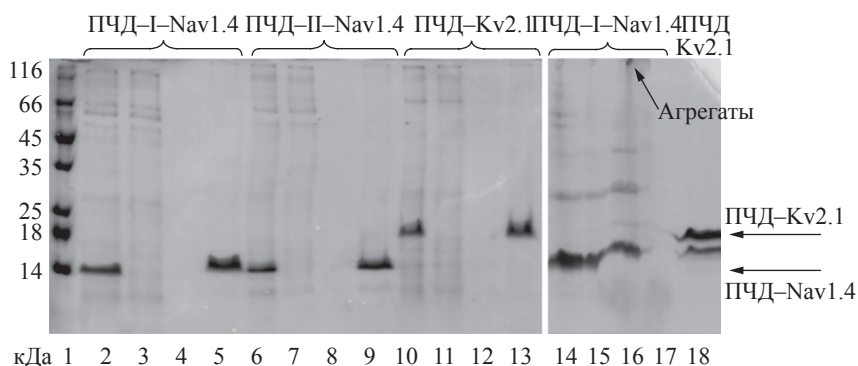
**Рис. 1.** Схематическое изображение пространственной организации трансмембранных доменов  $\alpha$ -субъединиц Kv- и Nav-каналов эукариот и последовательности изолированных потенциал-чувствительных доменов обсуждаемые в работе. (а) Полипептидная цепь  $\alpha$ -субъединицы Nav-канала включает в себя четыре псевдо-субъединицы (обозначены I, II, III, IV). ТМ-спирали, формирующие потенциал-чувствительные домены (ПЧД, S1–S4) и поровый домен (S5, S6), показаны разными оттенками. Спираль S4 – “датчик потенциала”, содержит несколько (от трех до пяти) консервативных положительно заряженных остатков (Arg или Lys, обозначены знаками “+”), которые отвечают за потенциал-зависимую активацию. Фрагменты, соответствующие изучаемым ПЧД отмечены пунктирными рамками. (б) Пространственная организация тетрамерного Kv- или Nav-канала в мембране. (в) Варианты ПЧД канала Kv2.1 человека (*KCNB1*) и ПЧД–I канала Nav1.4 человека (*SCN4A*), полученные методами бесклеточной продукции в настоящей работе. Также показаны варианты ПЧД–II канала Nav1.4 человека и ПЧД–I канала KvAP археи *A. pernix*, ранее изученные методом ЯМР-спектроскопии [17, 22]. Дополнительные остатки, введенные в последовательности доменов, и неспаренные остатки Cys, замененные на Ser подчеркнуты. Консервативные гидрофобные, заряженные и полярные остатки, по которым проводилось выравнивание последовательностей, показаны белым цветом. Предполагаемое положение спиральных участков в молекулах доменов показано темно-серым фоном. Консервативные остатки и положение спиральных элементов в ПЧД были выбраны на основе анализа существующих структурных данных, используя известную пространственную структуру ПЧД–KvAP [28], пространственные структуры гомологичных доменов из химерного канала Kv1.2/2.1 [6] и Nav-канала FPC1 [12], а также результаты ЯМР-исследования ПЧД–II–Nav1.4 [22]. Из-за низкой гомологии участков, соответствующих спиралам S1–S3, выравнивание последовательностей ПЧД различных каналов с помощью стандартных утилит давало некорректные результаты.

это предположение было проверено на примере ПЧД канала Kv2.1 (заряд +10) и ПЧД–I канала Nav1.4 (заряд +3) (рис. 1в). Несмотря на сравнительно большой заряд, изученные ПЧД были также нестабильны в средах, содержащих фосфолипиды. По-видимому, другие структурные факторы определяют низкую стабильность изолированных ПЧД эукариотических каналов. Тем не менее, скрининг различных мембраномоделирующих сред, проведенный методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии, позволил подобрать оптимальные условия для дальнейших структурных исследований ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Планирование генетических конструкций для продукции ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4

В потенциал-зависимых каналах Kv2.1 и Nav1.4 человека кроме мембранных потенциал-чувствительных и поровых доменов содержатся сравнительно большие цитоплазматические участки/домены, расположенные в последовательности белка до спирали S1 и после спирали S6. Напротив, последовательности, соединяющие ПЧД и пору (петля S4–S5), имеют небольшую длину и содержат значительное количество гидрофобных остатков. Во избежание нарушения структуры ПЧД, в работе использовали



**Рис. 2.** Электрофоретический анализ образцов ПЧД каналов Nav1.4 и Kv2.1, полученных методом бесклеточного синтеза. Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс. Дорожки 2–5 – очистка препарата ПЧД–I–Nav1.4 на Ni<sup>2+</sup>-аффинной смоле; 2 – осадок ТС, солюбилизированный в буфере А, содержащем 10% FOS-12; 3 – промывка колонки десятью объемами буфера А, содержащего 0.5% FOS-12; 4 – дополнительная промывка колонки одним объемом буфера А, содержащего 0.5% FOS-12; 5 – элюция буфером А, содержащим 0.5% FOS-12 и 250 мМ имидазол. Дорожки 6–9 и 10–13 – очистка препаратов ПЧД–II–Nav1.4 и ПЧД–Kv2.1 на Ni<sup>2+</sup>-аффинной смоле, порядок дорожек такой же, как и для ПЧД–I–Nav1.4. Дорожки 14–17 – инкапсуляция ПЧД–I–Nav1.4 в бицеллы DMPC/DHPC: 14 – осадок ТС, солюбилизированный в 2% LS (20 мМ Tris–HCl, pH 7.0, 0.5 мМ EDTA) с добавлением 1% липида DMPC до диализа; 15 – препарат белка в липосомах DMPC после диализа; 16 – осадок препарата ПЧД–I–Nav1.4 в DMPC после добавления DHPC до молярного соотношения DMPC/DHPC 1:4; стрелкой указаны агрегаты ПЧД. 17 – супернатант препарата ПЧД–I–Nav1.4 в DMPC после добавления DHPC; 18 – протеолитическая деградация образца <sup>15</sup>N–ПЧД–Kv2.1 в FOS-12/LDAO (2:1) pH 5.0 после измерения ЯМР-спектров при 45 °С в течение 72 ч. Наблюдаемое искажение фронта в геле на дорожках 14–18 связано с большим содержанием детергента в образцах.

фрагменты  $\alpha$ -субъединиц каналов Kv2.1 и Nav1.4 (169–327 и 114–246, соответственно), содержащие не только четыре ТМ-спирали доменов (S1–S4), но также дополнительные N- и C-концевые области (рис. 1б). В известных пространственных структурах Kv- и Nav-каналов эти области формируют амфифильные  $\alpha$ -спирали (S0 и S45, соответственно), расположенные на цитоплазматической границе мембраны [6–9]. По сравнению с ранее изученным ПЧД-II канала Nav1.4, предложенные конструкции не содержали дополнительного N-концевого участка (~ 10 а.о., рис. 1б), который, согласно данным ЯМР-исследования, экспонирован в растворитель и не формирует упорядоченной структуры [22].

Последовательности ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4 содержат один и два остатка Cys, соответственно. Эти остатки имеют цитоплазматическую и ТМ-локализацию, и, вероятно, не участвуют в образовании дисульфидных связей. Для уменьшения тенденции к агрегации рекомбинантных доменов эти остатки были заменены на остатки Ser (рис. 1б, подчеркнуты). Для очистки доменов с помощью Ni<sup>2+</sup>-аффинной хроматографии на 3'-конец генов были добавлены последовательности, кодирующие шесть остатков His (His<sub>6</sub>-tag). Генетические конструкции клонировали в плазмидный вектор *pIVEX2.3d*, который, согласно опубликованным данным, обеспечивает большую эффективность бесклеточного синтеза мембранных белков по сравнению с другими векторами, например *pET22b(+)* [22, 30]. Ожидаемые общие заряды

молекул рекомбинантных ПЧД (при нейтральном pH) составили +10 и +3, а значения pI, рассчитанные с помощью утилиты *protparam* на сервере [web.expasy.org](http://web.expasy.org), были равны 10.2 и 9.5 для Kv2.1 и Nav1.4, соответственно. Следует отметить, что ионизационное состояние боковых цепей белка, заглубленных в мембрану, может значительно отличаться от состояния остатков, экспонированных в растворитель. Поэтому приведенные расчетные значения заряда и pI могут рассматриваться лишь как приблизительная оценка. Расчетные молекулярные массы рекомбинантных белков были равны 19.3 и 16.3 кДа, соответственно.

#### Бесклеточный синтез препаратов ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4

Использование сопряженной бесклеточной системы синтеза (СБСС) диализного типа на основе экстракта S30 из *E. coli* позволило получить миллиграммовые количества препаратов ПЧД. Выходы рекомбинантных ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4, включая аналоги, меченные стабильными изотопами, составили 0.4–0.8 и 0.3–0.5 мг/мл трансляционной смеси (ТС), соответственно. Так как синтез белков проводили без добавления мембраномоделирующего компонент в ТС, препараты ПЧД накапливались в виде нерастворимого осадка, что было подтверждено методом SDS-электрофореза в ПААГ (система Tris/Трицин, 0.3% SDS). Высокая чистота синтезированных препаратов (> 90%, рис. 2, дорожки 2 и 10) указала на то, что первичный скрининг мембраномоделирующих

сред может быть выполнен без предварительной очистки ПЧД. Для дальнейших исследований препараты ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4, изначально солюбилизованные из осадка ТС в детергенте, очищали с помощью Ni<sup>2+</sup>-аффинной хроматографии (рис. 2, дорожки 2–5 и 10–13, соответственно). На рисунке 2 также показаны результаты очистки препарата ПЧД–II–Nav1.4 (дорожки 6–9).

*Реконструкция ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4 в мембраномоделирующие среды, содержащие фосфолипиды*

Для стабилизации ПЧД–Kv2.1 в работе были опробованы следующие среды, содержащие фосфолипиды: (1) мицеллы на основе цвиттер-ионного липида DC7PC (C7\*2) [31]; (2) бицеллы на основе смеси короткого и длинного цвиттер-ионных липидов DMPC/DHPC (C14\*2/C6\*2); (3) бицеллы на основе смеси детергента CHAPS и цвиттер-ионных (DMPC) или анионных (DMPG C14\*2) фосфолипидов. Эффективность солюбилизации ПЧД в различных средах оценивали с помощью SDS-электрофореза.

Прямое добавление мицелл DC7PC или бицелл DMPC/DHPC к осадку ТС, содержащему ПЧД–Kv2.1, не позволило получить домен в растворимом виде. Низкая эффективность солюбилизации ПЧД–Kv2.1 может быть связана либо с неспособностью добавляемых сред растворить осадок ТС, либо с низкой стабильностью молекулы ПЧД–Kv2.1 в них. Для проверки этих предположений были проведены дополнительные эксперименты. Осадок ТС, содержащий ПЧД–Kv2.1, предварительно солюбилизовали в анионном детергенте (лизо-фосфолипиде) LPPG с небольшой концентрацией (0.3%), а затем в раствор добавляли бицеллы DMPC/DHPC (1:3) до общей концентрации 4%. Добавление бицелл приводило к видимой преципитации домена, что подтвердило предположение о низкой стабильности домена в этом окружении. Попытки перевести ПЧД–Kv2.1, предварительно солюбилизованный в цвиттер-ионном детергенте FOS-12 (DPC), в бицеллы DMPC/DHPC (1:3), DMPC/CHAPS (4:5) или DMPG/CHAPS (4:5) на Ni<sup>2+</sup>-аффинной смоле также не увенчались успехом: домен либо агрегировал на смоле, либо агрегировал после элюции при дальнейшей пробоподготовке для ЯМР-исследований.

Для стабилизации ПЧД–I–Nav1.4 были опробованы бицеллы DMPC/DHPC. Как и в случае ПЧД–Kv2.1, напрямую солюбилизовать осадок ТС, содержащий синтезированный домен, не удалось. Поэтому был применен альтернативный подход. Осадок ТС, содержащий ПЧД–I–Nav1.4, предварительно солюбилизовали в жестком анионном детергенте LS и с помощью диализа встраивали в протеолипосомы на основе

липида DMPC (рис. 2, дорожки 14–15). Методом 1D-<sup>1</sup>H-ЯМР-спектроскопии было показано, что полученный препарат протеолипосомой содержал лишь следовые количества детергента. Однако последующее добавление DHPC до молярного соотношения DMPC/DHPC 1:4 привело к преципитации домена (рис. 2, дорожки 16–17). Причем образовавшиеся агрегаты белка были настолько прочными, что не растворялись полностью даже жестким детергентом SDS при подготовке проб к электрофоретическому анализу (обозначены стрелкой на рис. 2).

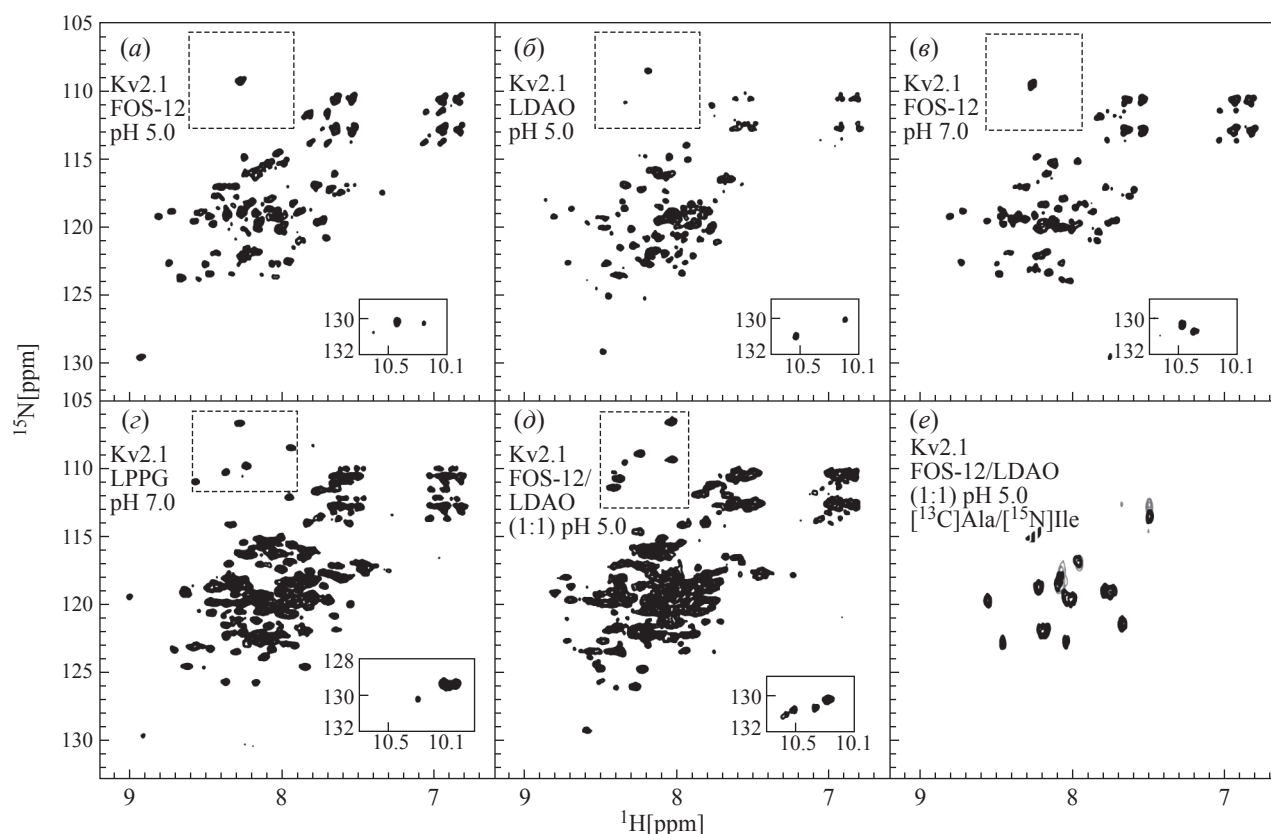
Полученные результаты показывают, что изолированные ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4, несмотря на большой положительный заряд молекул, нестабильны (агрегируют) в мембраномоделирующих средах на основе фосфолипидов. Так как подобные свойства ранее наблюдались для ПЧД–II–Nav1.4, молекула которого нейтральна при pH ~ 7.0, мы можем сделать вывод, что заряд молекулы не является ключевым фактором, определяющим стабильность изолированных ПЧД в мембраномоделирующих средах.

Ранее было показано, что ПЧД канала KvAP из термофильной археи (заряд +5) может быть солюбилизован раствором бицелл DMPC/DHPC из осадка, полученного путем осаждения белка в трихлоруксусной кислоте [21]. Препараты ПЧД–KvAP в бицеллах были стабильны при температуре 45 °C, как минимум в течение 10 ч, необходимых для накопления ЯМР-спектров. Вероятно, ПЧД Kv- и Nav-каналов человека не являются полностью автономными ТМ-доменами и для их стабилизации в мембране необходимы контакты с другими доменами канала.

В качестве еще одного фактора, способствующего агрегации молекул ПЧД в мембраноподобных средах, может выступать повышенная внутримолекулярная подвижность изолированных доменов эукариотических каналов. В этом случае временная дестабилизация нативной структуры может приводить к экспонированию в растворитель отдельных фрагментов ТМ-областей домена, межмолекулярные взаимодействия между которыми и приводят к формированию агрегатов.

*Подбор сред на основе детергентов для ЯМР-исследования изолированных ПЧД*

В качестве среды для стабилизации препаратов ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4 в растворе были опробованы мицеллы различных детергентов: (1) цвиттер-ионных фосфохолинов с разной длиной жирнокислотной цепи FOS-10, FOS-12 (DPC) и FOS-14; (2) слабokatионного детергента LDAO, рКа мономера ~ 5.0 [32], длина жирнокислотной цепи 12 атомов углерода; (3) смесей FOS/LDAO; (4) анионного



**Рис. 3.** Подбор мембраномоделирующего окружения для ЯМР-исследования ПЧД–Kv2.1. (а–д). Показаны 2D- $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -TROSY-спектры  $^{15}\text{N}$ -ПЧД–Kv2.1 (0.1 мМ, 45 °С) в мицеллах различных детергентов (концентрация ~ 3%). Тип детергента и значение pH приведены на соответствующих панелях. Во вставках показаны области спектра с сигналами  $^1\text{H}^{15}\text{N}^{\text{e}1}$  боковых цепей Trp. Регионы спектров, содержащие сигналы HN-групп остатков Gly, выделены штриховыми рамками. (е) Наложение спектров 2D- $^1\text{H}$ , $^{15}\text{N}$ -TROSY (черные контуры) и 2D-HNCO-TROSY (серые контуры) селективно-меченного  $^{15}\text{N}$ Ile/ $^{13}\text{C}$ Ala препарата ПЧД–Kv2.1 в мембраномоделирующей среде FOS-12/LDAO 1:1 (pH 5.0).

лизофосфолипида LPPG, длина жирнокислотной цепи 14 атомов углерода.

Для реконструкции белков в мицеллы различных детергентов раствор нужного детергента добавляли непосредственно к осадку ТС, содержащему  $^{15}\text{N}$ -меченные ПЧД. Выбор оптимального мембранного миметика проводили, анализируя количество наблюдаемых индивидуальных сигналов, а также их дисперсию и полуширину в 2D- $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-спектрах. Для ПЧД–Kv2.1 мы ожидали наблюдать ~140 индивидуальных сигналов HN-групп основной цепи (168 остатка, исключая His<sub>6</sub>-таг, шесть остатков Pro и перекрывающиеся сигналы), пять HN-сигналов остатков Gly, резонирующих в отдельной области ЯМР-спектра (рис. 3, пунктирные рамки), а также три сигнала HN<sup>e1</sup>-групп боковых цепей Trp, также резонирующих в отдельной области спектра (рис. 3, вставки). Аналогично, для ПЧД–I–Nav1.4 в ЯМР-спектрах ожидалось ~120 индивидуальных HN-сигналов (143 остатка, исключая His<sub>6</sub>-таг, шесть остатков Pro), восемь HN-сигналов остатков Gly и три сигнала боковых цепей Trp. Результаты подбора

условий приведены в табл. 1 и 2, а репрезентативные спектры показаны на рис. 3 и 4.

Солюбилизация ПЧД–Kv2.1 в мицеллах детергентов FOS-12 или LDAO в диапазоне pH 5.0–7.0 не обеспечивала ЯМР-спектры хорошего качества (рис. 3а–в). В спектрах наблюдалось не более 80 индивидуальных HN-сигналов и только 1–2 сигнала остатков Gly. Остальные сигналы, по-видимому, были значительно уширены из-за процессов конформационного обмена в диапазоне времен мкс-мс. Использование детергентов FOS-10 и FOS-14 также не привело к улучшению качества ЯМР-спектров. Спектры значительно лучшего качества наблюдали в смешанных мицеллах FOS-12/LDAO. Варьирование соотношения детергентов в диапазоне 2:1–1:2 позволило найти оптимальное соотношение 1:1, при котором наблюдалось 138 сигналов, а также шесть сигналов в “глициновой” области спектра и четыре сигнала в соответствующей боковым цепям Trp (рис. 3д). Избыточное количество наблюдаемых сигналов связано с тем, что в ходе бесклеточного синтеза была получена смесь двух вариантов целевого белка, различающихся N-концевым остатком (Met и формил–Met). Это

Таблица 1. Подбор мембраномоделирующего окружения для ЯМР-исследования ПЧД–Kv2.1

Мембранный миметик	pH	Качество 2D- <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N–TROSY- спектра*	Количество индивид. HN-сигналов (HN–Gly/ HN <sup>ε</sup> 1–Trp)	Стабильность 10 дней инкубации при 45 °С **
<b>Цвиттерионные мицеллы</b>				
FOS-12 (DPC)	5.0	– <sup>a</sup>	80(1/2)	Стабилен
	7.0	– <sup>a</sup>	67(1/2)	Стабилен
FOS-10	5.0	– <sup>a</sup>	57(1/3)	Стабилен
	7.0	– <sup>a</sup>	83(1/2)	Стабилен
FOS-14	5.0	– <sup>a</sup>	76(1/3)	Стабилен
<b>Слабокатионные мицеллы</b>				
LDAO	5.0	– <sup>a</sup>	92(2/2)	Стабилен
FOS-12/LDAO (2:1–1:2)	5.0	+++	138(6/4)	Стабилен
FOS-10/LDAO (1:1)	5.0	++ <sup>b</sup>	125(4/4)	Стабилен
FOS-14/LDAO (1:1)	5.0	++ <sup>b</sup>	128(5/4)	Стабилен
<b>Анионные мицеллы</b>				
LPPG	7.0	+++	120(5/4)	Стабилен
<b>Мицеллы короткоцепочечных липидов и липид-детергентные бицеллы</b>				
DC7PC	7.0	н.н. <sup>b</sup>	–	Не встраивается
LPPG (0.3% м/м) + DMPC/DHPC (1:3, 4% м/м)	7.0	н.н. <sup>b</sup>	–	Не встраивается
DHPC/DMPC (3:1)	7.0	н.н. <sup>b</sup>	–	Не встраивается
Chaps/DMPC (5:4)	7.0	н.н. <sup>b</sup>	–	Не встраивается
Chaps/DMPG (5:4)	7.0	н.н. <sup>b</sup>	–	Не встраивается

\*Качество спектра: <sup>a</sup> часть сигналов уширена; <sup>b</sup> сигналы уширены по сравнению с LDAO/FOS-12 при pH 5.0; <sup>b</sup> н.н. – не наблюдается. ЯМР-спектры не были получены по причине слабой растворимости или низкой стабильности образца.

\*\*Стабильность образцов оценивалась по 1D <sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N–TROSY спектрам, измеренным через определенные промежутки времени. Степень агрегации оценивали по интенсивности ЯМР-спектра, предполагая, что сигналы агрегатов не наблюдаются.

привело к двум наборам сигналов для *N*-концевых остатков ПЧД–Kv2.1, включая дополнительный сигнал для Gly и боковой цепи Trp.

Схожий эффект ранее наблюдали при исследовании ПЧД–II–Nav1.4 [22]. Замена FOS-12 в смеси с LDAO на детергенты FOS-10 или FOS-14 приводила к уширению некоторых сигналов в ЯМР-спектрах. Таким образом, длина жирнокислотных цепей молекул детергента в 12 атомов углерода была оптимальной для наблюдения спектров ПЧД–Kv2.1, и, по-видимому, обеспечивала лучшее соответствие между толщиной гидрофобного региона мицеллы и белка.

Стоит отметить, что ЯМР-спектры хорошего качества также были получены в анионных мицеллах LPPG при pH 7.0, однако, все сигналы белка в этой среде имели однородную полуширину, что косвенно указывало на отсутствие третичных контактов между спиралями домена. Схожее разрушение третичной структуры в мицеллах LPPG наблюдали ранее для ПЧД–KvAP [21].

Для оценки стабильности препараты ПЧД–Kv2.1 в различных средах инкубировали в течение 10 дней при 45 °С (табл. 1). Степень агрегации домена оценивали по интенсивности 1D-<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N–TROSY-спектра,

**Таблица 2.** Подбор мембраномоделирующего окружения для ЯМР-исследования ПЧД–I–Nav1.4

Мембранный миметик	pH	Качество 2D <sup>1</sup> H, <sup>15</sup> N–TROSY- спектра*	Количество индивид. HN-сигналов (HN– Gly/ HN <sup>ε1</sup> –Trp)	Стабильность 10 дней инкубации при 45 °С **
<b>Цвиттерионные мицеллы</b>				
FOS-12 (DPC)	5.0	+++	116(9/3)	Стабилен
	7.0	+ <sup>a</sup>	90(7/0)	Стабилен
<b>Слабокатионные мицеллы</b>				
LDAO	5.0	– <sup>a</sup>	50(2/0)	Нестабилен <sup>Δ</sup>
	7.0	н.н. <sup>б</sup>	–	Нестабилен <sup>Δ</sup>
FOS-12/LDAO (3:1–1:3)	5.0	+++	106(8/3)	Нестабилен <sup>Δ</sup>
	7.0	++ <sup>в</sup>	102(7/4)	Нестабилен <sup>Δ</sup>
<b>Анионные мицеллы</b>				
LPPG	6.8	+ <sup>в</sup>	114(7/0)	Стабилен
<b>Бицеллы</b>				
DMPC/DHPC (1:4)	7.0	н.н. <sup>б</sup>	–	Не встраивается

\*<sup>a</sup> Часть сигналов уширена, <sup>б</sup> н.н. – не наблюдается. ЯМР-спектры не были получены по причине слабой растворимости или низкой стабильности образца; <sup>в</sup> Сигналы уширены по сравнению с FOS-12/LDAO при pH 5.0.

\*\* Стабильность образцов оценивалась по 1D-<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N–TROSY-спектрам, измеренным через определенные промежутки времени. Степень агрегации оценивали по интенсивности ЯМР-спектра, предполагая, что сигналы агрегатов не наблюдаются.

<sup>Δ</sup> Значительная агрегация ПЧД наблюдалась при инкубации в течение 24 ч. Скорость агрегации возрастала при увеличении pH и относительного содержания LDAO в образце.

предполагая, что агрегаты белка не наблюдаются в ЯМР-спектрах и снижение интенсивности спектра соответствует снижению концентрации мономерного белка. Во всех исследованных средах образец ПЧД–Kv2.1 демонстрировал высокую стабильность. Однако, несмотря на отсутствие агрегации ПЧД в средах на основе FOS и LDAO, белок подвергался значительному протеолитическому расщеплению в течение 72 ч инкубации. Расщепление белка детектировали с помощью SDS-электрофореза (рис. 2, дорожка 18) и по появлению дополнительных сигналов в 2D-<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N–TROSY-спектре. Добавление ингибиторов протеаз позволило предотвратить гидролиз ПЧД.

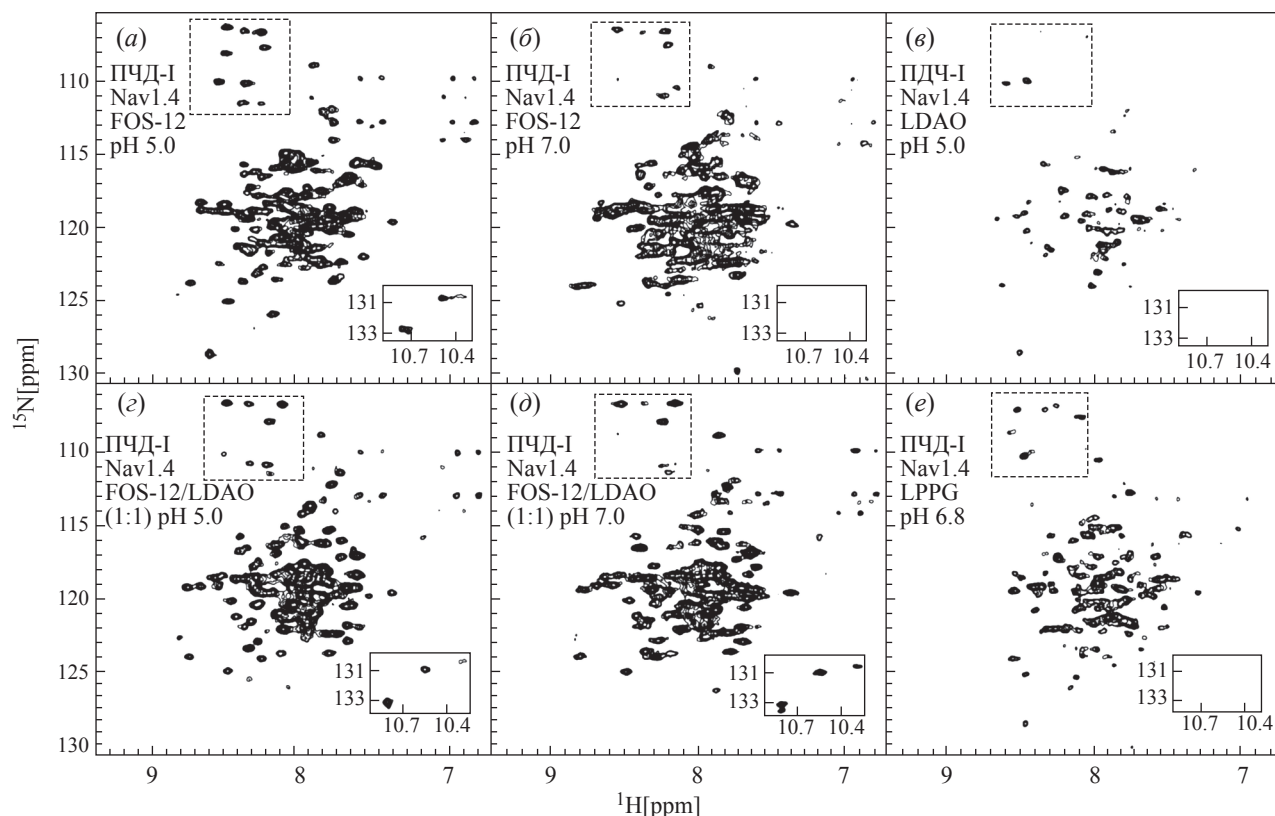
В последовательности ПЧД–Kv2.1 содержится 14 остатков Ile, как минимум по одному в каждой из предполагаемых ТМ-спиралей, и три дипептидных фрагмента Ala–Ile. С целью проверки того факта, что в ЯМР-спектрах ПЧД наблюдаются сигналы от всех частей домена, был приготовлен селективно-меченный [<sup>15</sup>N]Ile/[<sup>13</sup>C]Ala-образец ПЧД–Kv2.1, для которого в мицеллах FOS-12/LDAO (1:1, pH 5.0) были получены 2D-<sup>1</sup>H, <sup>15</sup>N–TROSY- и 2D-HNCO–TROSY-спектры (рис. 3e). Несмотря на перекрытие сигналов, в спектре TROSY были идентифицированы

все 14 ожидаемых сигналов HN-групп остатков Ile, а в спектре 2D-HNCO также наблюдали три ожидаемых сигнала от дипептидных фрагментов Ala–Ile. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в подобранных оптимальных условиях в ЯМР-спектрах наблюдаются сигналы от всех четырех ТМ-спиралей ПЧД–Kv2.1.

Скрининг детергентов для исследования ПЧД–I–Nav1.4 показал, что для этого домена лучшее качество ЯМР-спектров наблюдалось либо в мицеллах FOS-12, либо в смешанных мицеллах FOS-12/LDAO (1:1) при pH ~ 5.0 (табл. 2, рис. 4a, г). В этих условиях в спектрах ПЧД наблюдалось ~110 индивидуальных сигналов HN-групп основной цепи белка, все восемь ожидаемых сигналов остатков Gly и три ожидаемых сигнала боковых цепей Trp. При этом качество ЯМР-спектров ПЧД в анионных мицеллах LPPG было ниже (рис. 4e).

Образцы ПЧД–I–Nav1.4 в мицеллах FOS-12 и LPPG демонстрировали хорошую стабильность во время 10-дневной инкубации при 45 °С и не подвергались протеолизу, даже в отсутствие ингибиторов протеаз. Однако, в средах, содержащих LDAO, наблюдалась значительная агрегация ПЧД





**Рис. 4** Подбор мембраномоделирующего окружения для ЯМР-исследования ПЧД-I–Nav1.4. Показаны 2D- $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ -TROSY-спектры  $^{15}\text{N}$ -ПЧД-I–Nav1.4 (0.1 мМ, 45 °С) в мицеллах различных детергентов (концентрация ~3%). Тип детергента и значение pH приведены на соответствующих панелях. Во вставках показаны области спектра с сигналами  $^1\text{H}^{15}\text{N}^{\text{Trp}}$  боковых цепей Trp. Регионы спектров, содержащие сигналы HN-групп остатков Gly, выделены штриховыми рамками.

при инкубации в течение 24 ч. Скорость агрегации ПЧД возрастала при увеличении значения pH раствора и относительного содержания LDAO в образце. Агрегацию ПЧД наблюдали не только по 1D-ЯМР-спектрам, но и по уменьшению интенсивности полосы мономера белка на SDS-электрофорезе.

Таким образом, оптимальной средой для структурных ЯМР-исследований ПЧД–Kv2.1 является смесь FOS-12/LDAO, ранее хорошо зарекомендовавшая себя при исследовании ПЧД–KvAP [17]. Тот факт, что схожие условия не являются оптимальными для исследований ПЧД–I–Nav1.4, подтверждает необходимость поиска и оптимизации состава мембраномоделирующей среды для каждого конкретного белка. Схожие процессы агрегации ранее наблюдались для ПЧД–KvAP и ПЧД–II–Nav1.4 в окружении мицелл чистого детергента LDAO [17, 22]. Подбор мембраномоделирующих сред, осуществленный в данной работе, открывает возможности для дальнейших структурных исследований ПЧД-каналов Kv2.1 и Nav1.4.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Материалы.** Все использованные липиды (DHPC, DC7PC, DMPC, DMPG и LPPG) произведены Avanti Polar Lipids (Алабастер, США). Все использованные детергенты (CHAPS, LDAO, FOS-10, FOS-12, FOS-14, LS) произведены Anatrace Inc. (Моми, США).

**Генетические конструкции.** Гены, кодирующие варианты изолированных ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4 (рис. 1в), были амплифицированы с помощью ПЦР из перекрывающихся синтетических олигонуклеотидов, последовательность генов была оптимизирована с учетом частоты встречаемости кодонов для *E. coli*. Полученные гены были клонированы по сайтам рестрикции NcoI и SmaI в плазмидный вектор *pIVEX2.3d* (Roche Diagnostics, Германия). Работы были выполнены на коммерческой основе (ЗАО “Евроген”, Москва, Россия).

**Бесклеточная продукция и очистка белков.** Полученные вектора *pIVEX2.3d*/ПЧД–Kv2.1 и *pIVEX2.3d*/ПЧД–I–Nav1.4 были использованы в качестве матрицы сопряженной бесклеточной системы синтеза (СБСС) диализного типа на основе экстракта S30 из *E. coli*, согласно

опубликованным ранее протоколам [33, 34]. Синтез осуществляли без добавления каких-либо мембраномоделирующих сред в трансляционную и питающую смеси (ТС и ПС). ТС и ПС разделяли, используя полупроницаемую целлюлозную мембрану с размером пор 12 кДа (Sigma, США). Реакцию проводили в течение 20 ч при 30 °С с умеренным перемешиванием ~100 об/мин на орбитальном шейкере.

Соотношение объемов ТС и ПС составляло 1:15. Конечная концентрация компонентов ТС составляла: 100 мМ HEPES–КОН (Fluka, США), pH 8.0, 8 мМ Mg(OAc)<sub>2</sub>, 90 мМ KOAc, 20 мМ ацетилфосфат калия (Sigma), 20 мМ фосфоенолпируват калия (AppliChem, Испания), набор из аминокислот (1.3 мМ каждая), за исключением Arg, Cys, Met, Trp, Asp, Glu, концентрация каждой из которых составляла 2.3 мМ, 0.15 мг/мл фолиевая кислота (Sigma), 4 рибонуклеозидтрифосфата в концентрации 1 мМ каждый, ингибитор протеаз (X1 Complete protease inhibitor<sup>®</sup>, Roche), 0.05% NaN<sub>3</sub>, 2% полиэтиленгликоль 8000 (Sigma); 0.3 ед/мкл ингибитора рибонуклеаз RiboLock (Fermentas, Литва), 0.04 мг/мл пируваткиназы (Roche), 5.5 мкг/мл T7-полимеразы, 0.1 мг/мл плазмидной ДНК, 0.5 мг/мл суммарной тРНК *E. coli* MRE600 (Roche), 30% от общего объема ТС экстракта S30 из *E. coli*. ПС имела такой же состав, как и ТС, исключая высокомолекулярные компоненты: экстракт S30, плазида, ферменты, ингибитор рибонуклеаз.

<sup>15</sup>N-Меченные препараты были синтезированы с использованием <sup>15</sup>N-смеси аминокислот альгального происхождения (Cambridge Isotope Laboratories (CIL), США) в концентрации 3.75 мг/мл. Также добавляли [<sup>15</sup>N]Trp, [<sup>15</sup>N]Gln и [<sup>15</sup>N]Asp (CIL) до концентрации 2.3, 1.3, и 1.3 мМ, соответственно. Для синтеза селективно-меченного образца ПЧД–Kv2.1 использовали отдельные немеченные аминокислоты (Sigma), <sup>13</sup>C-меченный Ala и <sup>15</sup>N-меченный Ile (CIL).

После синтеза ТС центрифугировали 5 мин при 14 000 об/мин, осадок ресуспендировали в 20 мМ Tris–HCl, pH 8.0, 100 мМ NaCl, содержащем 5 мкг/мл ДНКазы I (Sigma) и 1.5 мкг/мл РНКазы А (Fermentas), инкубировали 30 мин при 37 °С. 1 мл этого раствора использовали для 1 мл ТС. После этого осадок дважды промывали тем же буфером без ферментов и дважды – деионизованной водой (MilliQ<sup>™</sup>, Millipore). Между промывками образец центрифугировали 5 мин при 14 000 об/мин.

Для очистки целевых белков отмытый осадок ТС солюбилизировали в буфере А (20 мМ Tris–HCl, 300 мМ NaCl, 1 мМ NaN<sub>3</sub>, pH 8.0), содержащем 10% FOS-12 или LPPG. Объем буфера брали из расчета 0.5 мл на 1 мл ТС. Солюбилизованный осадок наносили на колонку,

содержащую Ni<sup>2+</sup>-сефарозу (GE Healthcare, Швеция) и предварительно уравновешенную буфером А с 0.5% FOS-12 или LPPG. Объем колонки составлял 0.3 мл на 1 мл ТС. Колонку промывали 10 объемами буфера А с 0.5% FOS-12 или LPPG, целевой белок элюировали четырьмя объемами буфера А с 0.5% FOS-12 или LPPG и 250 мМ имидазолом. Чистоту полученных препаратов анализировали с помощью SDS-электрофореза в ПААГ (рис. 2).

После очистки буфер в образцах меняли либо на 20 мМ Tris–Ac pH 5.0, либо на 20 мМ Tris–HCl pH 7.0 с помощью не менее четырех последовательных циклов концентрирования/разбавления. Концентрирование препаратов осуществляли на ячейке для ультрафильтрации с мембраной из нитроцеллюлозы, размер пор 10 кДа (ячейка и мембрана – Millipore). Концентрацию белков измеряли спектрофотометрически по поглощению на 280 нм. После очистки в препараты ПЧД–Kv2.1 добавляли ингибиторы протеаз (Protease Inhibitor Cocktail Set III, Animal–Free–Calbiochem, Sigma) согласно рекомендациям производителя.

**Встраивание ПЧД в мембраномоделирующие среды.** Перевод образцов ПЧД в мембраномоделирующие среды осуществляли несколькими способами.

(1) Отмытый осадок ТС напрямую растворяли в 150 мкл целевого буфера, содержащего 5–10% липида/детергента. После растворения объем образца доводили целевым буфером до 450 мкл.

(2) Осадок ТС солюбилизировали с помощью FOS-12, наносили на Ni<sup>2+</sup>-сефарозу и путем промывки смолы буфером, содержащим соответствующий мембранный миметик, производили замену мембраномоделирующей среды. Элюировали белок в нужном мембранном миметике буфером, содержащим 250 мМ имидазол. Например, для встраивания ПЧД–Kv2.1 в бицеллы смолу с нансенным белком сначала промывали 6 объемами буфера А с 0.3% FOS-12 (10 мМ), а затем 10 объемами буфера А с 25 мМ раствором бицелл (14.3 мМ CHAPS + 10.7 мМ DMPC или DMPG, или 18.5 мМ DHPC + 6.5 мМ DMPC, суммарная концентрация липид + детергент ~ 1.5%). На этапе концентрирования в целевой буфер дополнительно добавляли 5 мМ CHAPS или DHPC.

(3) Для встраивания ПЧД–I–Nav1.4 в протелипосомы, осадок ТС растворяли в 0.5 мл буфера для диализа (Tris–HCl 20 мМ, pH 7.0, 1 мМ NaN<sub>3</sub>, 0.5 мМ EDTA), содержащего 2% LS. Далее в полученный белковый раствор добавляли липид DMPC до концентрации 1%. Смесь белка с детергентом и липидами помещали в полупроницаемую целлюлозную мембрану с размером пор 12 кДа (Sigma). Диализный буфер объемом 0.5 л меняли раз в сутки. Диализ проводили при 4 °С и с умеренным перемешиванием ~100 об/мин с помощью

магнитной мешалки в течение 3–4 сут. Для формирования бицелл после диализа к раствору белка добавляли ДНРС до соотношения ДМРС/ДНРС 1:4. Концентрацию детергентов и липидов в образцах оценивали с помощью  $^1\text{H}$ -ЯМР-спектров.

**Измерение и анализ ЯМР-спектров.**  $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ –TROSY- и HNCО–TROSY-ЯМР-спектры измеряли для 0.1 мМ образцов ПЧД–Kv2.1 и ПЧД–I–Nav1.4 при 45 °С на спектрометрах Bruker Avance–III 600 и Avance–III 800 (Германия), оборудованных криодатчиками. Обработку спектров производили в программе Topspin (Bruker).

### БЛАГОДАРНОСТИ

Работы по исследованию ПЧД канала Nav1.4 проводились при финансовой поддержке РФФ (грант № 16-14-10338). Работы по исследованию ПЧД канала Kv2.1 проводились при финансовой поддержке РФФИ (грант № 16-34-01309) и программы “Клеточная и молекулярная биология” Российской академии наук.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hille B. Ion channels of excitable membranes: Third ed. Sunderland; MA: Sinauer Associates Inc., 2001.
- Ashcroft F.M. Ion channels and disease: First ed. San Diego; CA: Academic Press, 1999.
- Specs D.J., Ogata G., Mandikian D., Bishop H.I., Wiler S.W., Eum K., Jurgen Wenzel H., Doisy E.T., Matt L., Campi K.L., Golub M.S., Nerbonne J.M., Hell J.W., Trainor B.C., Sack J.T., Schwartzkroin P.A., Trimmer J.S. // *Genes Brain Behav.* 2014. V. 13(4). P. 394–408.
- Shah N.H., Aizenman E. // *Transl. Stroke Res.* 2014. V. 5. P. 38–58.
- Li X.N., Herrington J., Petrov A., Ge L., Eiermann G., Xiong Y., Jensen M.V., Hohmeier H.E., Newgard C.B., Garcia M.L., Wagner M., Zhang B.B., Thornberry N.A., Howard A.D., Kaczorowski G.J., Zhou Y.P. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2013. V. 344. P. 407–416.
- Long S.B., Tao X., Campbell E.B., MacKinnon R. // *Nature.* 2007. V. 450(7168). P. 376–382.
- Payandeh J., Gamal El-Din T.M., Scheuer T., Zheng N., Catterall W.A. // *Nature.* 2012. V. 486(7401). P. 135–139.
- Ahuja S., Mukund S., Deng L., Khakh K., Chang E., Ho H., Shriver S., Young C., Lin S., Johnson J.P., Wu P., Li J., Coons M., Tam C., Brillantes B., Sampang H., Mortara K., Bowman K.K., Clark K.R., Estevez A., Xie Z., Verschoof H., Grimwood M., Dehnhardt C., Andrez J.C., Focken T., Sutherland D.P., Safina B.S., Starovasinik M.A., Ortwine D.F., Franke Y., Cohen C.J., Hackos D.H., Koth C.M., Payandeh J. // *Science.* 2015. V. 350. P. aac5464.
- Sun J., MacKinnon R. // *Cell.* 2017. V. 169(6). P. 1042–1050.
- Wang W., MacKinnon R. // *Cell.* 2017. V. 169(3). P. 422–430.
- Wu J., Yan Z., Li Z., Qian X., Lu S., Dong M., Zhou Q., Yan N. // *Nature.* 2016. V. 537. P. 191–196.
- Shen H., Zhou Q., Pan X., Li Z., Wu J., Yan N. // *Science.* 2017. V. 355(6328). P. eaal4326.
- Jensen M.Ø., Jogini V., Borhani D.W., Leffler A.E., Dror R.O., Shaw D.E. // *Science.* 2012. V. 336(6078). P. 229–233.
- Vargas E., Yarov–Yarovoy V., Khalili–Araghi F., Catterall W.A., Klein M.L., Tarek M., Lindahl E., Schulten K., Perozo E., Bezanilla F., Roux B. // *J. Gen. Physiol.* 2012. V. 140(6). P. 587–594.
- Lau C.H., King G.F., Mobli M. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 34333.
- Börjesson S.I., Elinder F.J. // *Gen. Physiol.* 2011. V. 137(6). P. 563–577.
- Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Shingarova L.N., Yakimov S.A., Dubinnyi M.A., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Blommers M.J., Arseniev A.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132(16). P. 5630–5637.
- Stevens M., Peigneur S., Tytgat J. // *Front. Pharmacol.* 2011. V. 2:71. P. 1–13.
- Bosmans F., Martin-Eauclaire M.F., Swartz K.J. // *Nature.* 2008. V. 456(7219). P. 202–208.
- Li P., Chen Z., Xu H., Sun H., Li H., Liu H., Yang H., Gao Z., Jiang H., Li M. // *Cell Res.* 2013. V. 23(9). P. 1106–1118.
- Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N., Paramonov A.S., Shingarova L.N., Chupin V.V., Kirpichnikov M.P., Blommers M.J., Arseniev A.S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132(16). P. 5628–5629.
- Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Myshkin M.Y., Shulepko M.A., Kulbatskii D.S., Petrosian N.S., Chugunov A.O., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Arseniev A.S., Shenkarev Z.O. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2017. V. 1859(3). P. 493–506.
- Lu Z., Klem A.M., Ramu Y. // *Nature.* 2001. V. 413. P. 809–813.
- Arrigoni C., Schroeder I., Romani G., Van Etten J.L., Thiel G., Moroni A. // *J. Gen. Physiol.* 2013. V. 141. P. 389–395.
- Takeshita K., Sakata S., Yamashita E., Fujiwara Y., Kawana A., Kurokawa T., Okochi Y., Matsuda M., Narita H., Okamura Y., Nakagawa A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. P. 352–357.
- Li Q., Wanderling S., Paduch M., Medovoy D., Singharoy A., McGreevy R., Villalba–Galea C.A., Hulse R.E., Roux B., Schulten K., Kossiakoff A., Perozo E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. P. 244–252.
- Li Q., Wanderling S., Sompornpisut P., Perozo E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21(2). P. 160–166.
- Butterwick J.A., MacKinnon R. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 403(4). P. 591–606.
- Chakrapani S., Cuello L.G., Cortes D.M., Perozo E. // *Structure.* 2008. V. 16(3). P. 398–409.
- Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Khabibullina N.F., Kulbatskiy D.S., Shulepko M.A., Petrovskaya L.E.,

- Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* // *Acta Naturae*. 2012. V. 4(4). P. 58–64.
31. *Fernández C., Hilty C., Wider G., Wüthrich K.* // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. V. 99. P. 13533–13537.
32. *Imaishi Y., Kakehashi R., Nezu T., Maeda H.* // *J. Colloid Interface Sci.* 1998. V. 197. P. 309–316.
33. *Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Khabibullina N.F., Kopeina G.S., Shulepko M.A., Paramonov A.S., Mineev K.S., Tikhonov R.V., Shingarova L.N., Petrovskaya L.E.* // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. V. 1818. P. 349–358.
34. *Хабибуллина Н.Ф., Люкманова Е.Н., Копейна Г.С., Шенкарев З.О., Арсеньев А.С., Долгих Д.А., Кирпичников М.П.* // *Биоорганическая химия*. 2010. Т. 36. С. 654–660. [*Khabibullina N.F., Lyukmanova E.N., Kopeina G.S., Shenkarev Z.O., Arsen'ev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2010. V. 36. P. 603–609.]

## “Divide and Conquer” Approach to the Structural Studies of Multi-Domain Ionic Channels by the Examples of Isolated Voltage-Sensing Domains of Human Kv2.1 and Nav1.4 Channels

M. Yu. Myshkin<sup>\*,\*\*</sup>, A. S. Paramonov<sup>\*,\*\*\*</sup>, D. S. Kulbatskii<sup>\*,\*\*\*</sup>,  
E. N. Lyukmanova<sup>\*,\*\*\*</sup>, M. P. Kirpichnikov<sup>\*,\*\*\*</sup>, Z. O. Shenkarev<sup>\*,#</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (495) 336-59-29; e-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru

<sup>\*</sup>*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

<sup>\*\*</sup>*Moscow Institute of Physics and Technology (State University),*

*Institutskiy per. 9, Dolgoprudny, Moscow Region, 141700, Russia*

<sup>\*\*\*</sup>*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119991, Moscow, Leninskie gory 1–12, Russia*

Voltage-gated K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channels are involved into diverse physiological processes including excitability of heart, muscular and neuronal cells, as well as release of hormones and neurotransmitters. These channels have modular structure and contain five membrane domains: four voltage-sensing domains (VSD) and one pore domain. VSDs of different channels contain unique ligand-binding sites and are considered as potential pharmacological targets. Modular organization points to the possibility of NMR structural studies of isolated VSDs. Here, feasibility of this approach is tested using VSD of human Kv2.1 channel and VSD-I of human Nav1.4 channel. Milligram quantities of the VSDs and their isotopically labeled analogs were produced by cell-free expression system based on *E. coli* S30 extract. Rational choice of membrane-mimicking media is a crucial step in NMR investigations of membrane proteins. The membrane mimetic chosen should provide the long-term stability of the native protein structure and high-quality of NMR spectra. Analysis of various membrane mimetics revealed that the VSD–Kv2.1 and VSD–I–Nav1.4 are unstable in media containing phospholipids, including the micelles of short-chain lipid DC7PC and lipid-detergent bicelles containing zwitterionic or anionic saturated lipid (DMPC or DMPG). It was demonstrated that the optimal media for NMR studies is the mixtures of zwitterionic and weakly cationic detergents (FOS-12/LDAO). Despite the high-quality spectra, the VSD–I–Nav1.4 in FOS-12/LDAO environment aggregated irreversibly within a few days. It is likely that VSDs of K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> human channels are not completely autonomous domains and the contacts with other parts of the channels are necessary for their stability.

*Keywords: cell-free expression system, membrane-mimicking media, membrane proteins, ionic channels, voltage-sensing domain, NMR spectroscopy*