

Экспрессия мутантного ионного канала Kv11

Кравчук Екатерина Вячеславовна

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Москва, Россия

E-mail: kravchuk_ekaterina01@mail.ru

Исследование структуры белков играет важную роль в понимании их биохимических и биофизических свойств. Объектом исследования данной работы является потенциал зависимый канал человека hERG (Kv11.1). Известно, что каналопатии, вызванные мутациями по данному каналу, приводят к аритмиям, являются одной из причин развития синдрома удлиненного интервала QT. Кроме того, с данным каналом связывается широкий круг фармакологических агентов, вызывая LQTDi [1][2]. Таким образом, получение структуры канала в закрытом состоянии имеет фармакологическое значение.

В 2017 году группой исследователей под руководством Р. Маккиннона была получена структура с разрешением близкому к атомному с использованием криоэлектронной микроскопии канала в открытой конформации [3], а в 2021 г. была получена структура с ионом калия в поре [4]. До сих пор нет исследования, посвященного изучению его структуры в закрытой конформации. В нашей работе планируется получить структуру канала в закрытой конформации.

Был предложен способ фиксации hERG в закрытом состоянии: при введении цистеинов в линкер S4-S5 и С-конец S6 в окислительных условиях образуются дисульфидные связи, фиксирующие контакт. Так, для мутантного варианта D540C-L666C hERG было показано, что в присутствии $t\text{bHO}_2$ он не проводит ток при подаче ступенек напряжения [5].

В ходе данной работы последовательность мутантного варианта D540C-L666C hERG была переклонирована в вектор pIRES2-EGFP, при этом к С-концу канала через линкер был присоединен 1D4 tag для очистки белка. Однако, возникли проблемы с экспрессией в HEK293. Для оптимизации экспрессии были созданы три генетические конструкции с удалением фрагмента линкерной области, С-концевой области и обеих областей из последовательности исследуемого канала. Подобные модификации позволили улучшить экспрессию в более ранних исследованиях, в ходе которых были получены структуры канала в открытом состоянии и с калием в поре [1][2].

Источники и литература

- 1) Mark E Curran, Igor Splawski, Katherine W Timothy, G.Michael Vincen, Eric D Green, Mark T Keating. (1995). A molecular basis for cardiac arrhythmia: HERG mutations cause long QT syndrome. *Cell*, Volume 80, Issue 5, Pages 795-803.
- 2) Roden DM, Lazzara R, Rosen M, Schwartz PJ, Towbin J, Vincent GM. (1996). Multiple mechanisms in the long-QT syndrome. Current knowledge, gaps, and future directions. The SADS Foundation Task Force on LQTS. *Circulation*, 94(8).
- 3) Wang, W.W., MacKinnon, R. (2017). Cryo-EM structure of the human ether-a-go-go related K⁺ channel. *Cell*, 169: 422-430.e10.
- 4) Asai, T., Adachi, N., Moriya, T., Kawasaki, M., Suzuki, K., Senda, T., Murata, T. (2021). Cryo-EM structure of K⁺-bound hERG channel in the presence of astemizole. *Structure*, 29: 203-212.e4.

- 5) Malak, O.A., Es-Salah-Lamoureux, Z. & Loussouarn, G. (2017). hERG S4-S5 linker acts as a voltage-dependent ligand that binds to the activation gate and locks it in a closed state. *Scientific Reports*, 7, 113