

УДК 577.322

Механизмы активации потенциал-управляемых калиевых каналов

А. В. Гризель¹, Г. С. Глухов², О. С. Соколова^{2*}¹Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

*E-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Поступила в редакцию 04.04.2014

После доработки 22.08.2014

РЕФЕРАТ Калиевые потенциал-управляемые каналы (Kv) играют важную роль в разнообразных клеточных процессах, таких, как функционирование возбудимых клеток, регуляция апоптоза, клеточной дифференцировки и роста, выделение нейротрансмиттеров, гормонов, обеспечение сердечной деятельности и др. Нарушение функционирования Kv-каналов приводит к тяжелым наследственным заболеваниям и развитию опухолей, в том числе злокачественных. Понимание механизмов функционирования Kv-каналов – ключевой фактор для определения причин заболеваний, связанных с мутациями каналов, и поиска новых лекарственных средств. Механизм активации каналов – тема продолжающихся дебатов, и консенсус в этом вопросе пока не достигнут. В данном обзоре рассмотрены ключевые этапы изучения механизмов функционирования Kv-каналов и описаны основные модели их активации, известные к настоящему времени.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА активация, калиевые ионные каналы, моделирование, структура.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ Kv – потенциал-управляемый калиевый канал; а.о. – аминокислотный остаток; VSD – домен, чувствительный к изменению потенциала; ВСМ – модель вращающихся спиралей; ТМА – транспортная модель активации; ЛМ – лопастная модель; СДС – модель согласованного движения спиралей; КМ – консенсусная модель; МПЗ – модель перемещения зарядов; МДК – модель деактивации Kv-каналов; ММд – механистическая модель активации/деактивации Kv-канала; FRET – Ферстеровский резонансный перенос энергии флуоресценции; ММ – молекулярное моделирование; ЦПЗ – центр переноса зарядов; ВК – воротный канал; МД – молекулярная динамика.

ВВЕДЕНИЕ

Мембранные белки составляют ~30% всех белков организма, при этом около половины из них – белки-переносчики и ионные каналы. Калиевые ионные каналы – самый разнообразный и широко распространенный класс мембранных белков [1]. Они подразделяются в зависимости от принципа функционирования и на основании первичной структуры каналформирующей субъединицы на каналы входящего выпрямления (Kir), Ca²⁺-активируемые каналы (KCa), двупоровые (K2P) и потенциал-управляемые (Kv) каналы. Kv-каналы представляют собой наиболее разнообразную группу (рис. 1), представленную 12 семействами: Kv1–Kv12 [2].

Все Kv-каналы играют важную регуляторную роль в разнообразных клеточных процессах. Они участвуют в функционировании возбудимых клеток [3–5], в процессах регуляции апоптоза [6], клеточной

дифференцировки и роста [7]. Правильное функционирование Kv-каналов необходимо при выделении нейротрансмиттеров [8], гормонов [9, 10], для обеспечения сердечной деятельности [11] и др.

Мутации в генах Kv-каналов приводят к различным тяжелым наследственным заболеваниям [12], таким, как глухота, эпилепсия [13], некоторые виды нарушений ритма сердца [11], вовлечены в развитие рассеянного склероза и болевого синдрома [14]. Kv-каналы связаны также с процессами возникновения и развития опухолей, в том числе злокачественных [15].

Функционирование Kv-каналов можно регулировать с помощью активаторов и блокаторов [16], поэтому они представляют собой перспективные мишени для лекарственных средств [17, 18]. В этой связи важной задачей является изучение строения и функционирования Kv-каналов.

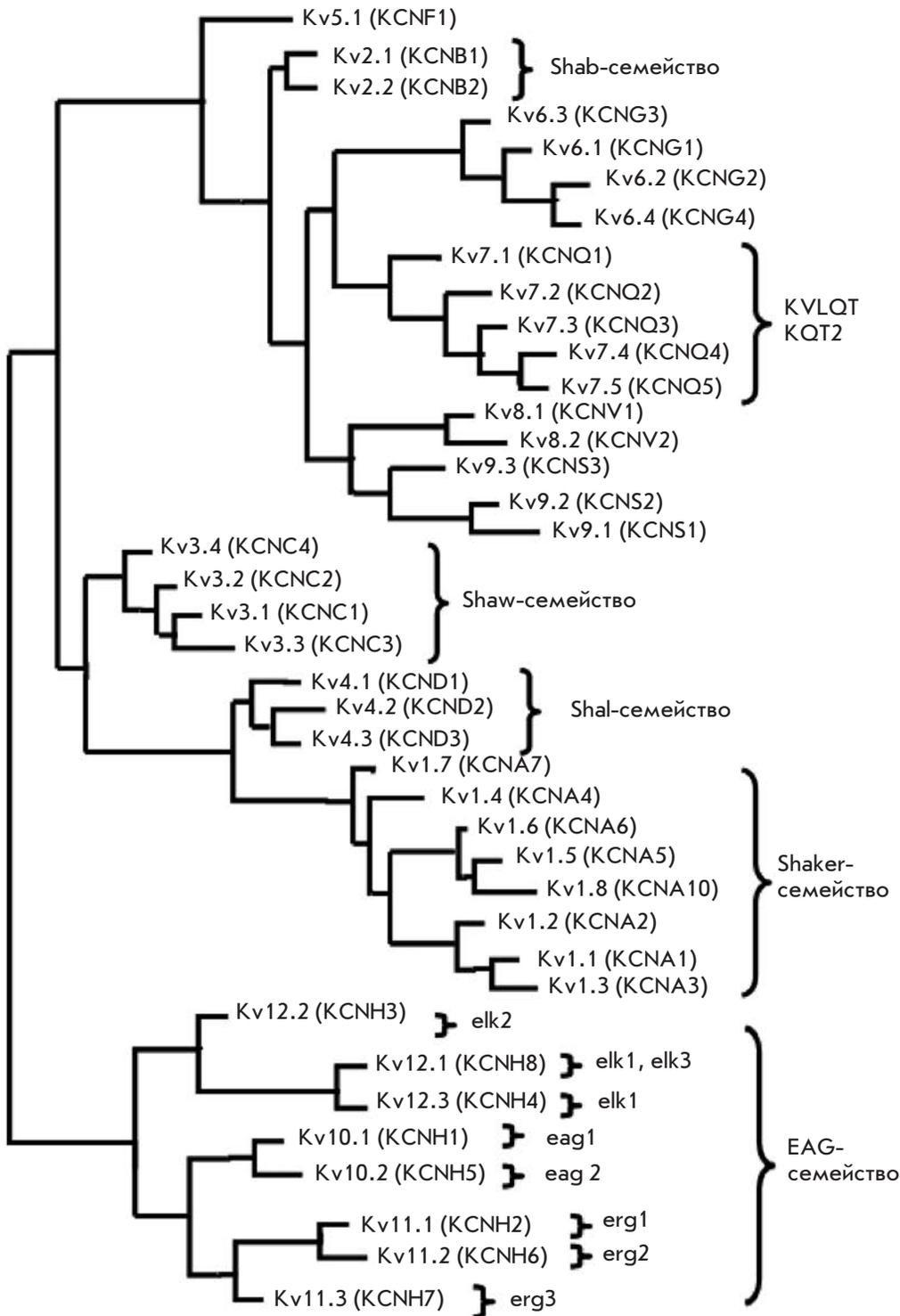


Рис. 1. Филогенетическое древо Kv-каналов, основанное на сравнении аминокислотных последовательностей. Фигурными скобками объединены каналы, принадлежащие к одному семейству. Названия даны согласно системе, предложенной Международным союзом теоретической и прикладной химии (в скобках указаны альтернативные названия, согласно обозначению номенклатурного комитета при организации «Геном человека» [2])

ЧЕТВЕРТИЧНАЯ СТРУКТУРА Kv-КАНАЛОВ

Все Kv-каналы обладают высоким уровнем сходства. Каждый ген Kv-каналов кодирует α-субъединицу (Kvα). Для формирования функционального канала необходимы четыре α-субъединицы (рис. 2). [19, 20]. Обычно Kv-каналы представляют собой гомотетра-

меры (все Kvα идентичны) [19, 20], однако некоторые могут быть гетеротетраммерными (две или более Kvα не идентичны).

Трансмембранный домен α-субъединицы Kv-канала состоит из шести спиралей S1–S6 (рис. 2А,Б). При этом в тетрамерном канале эти спирали обра-

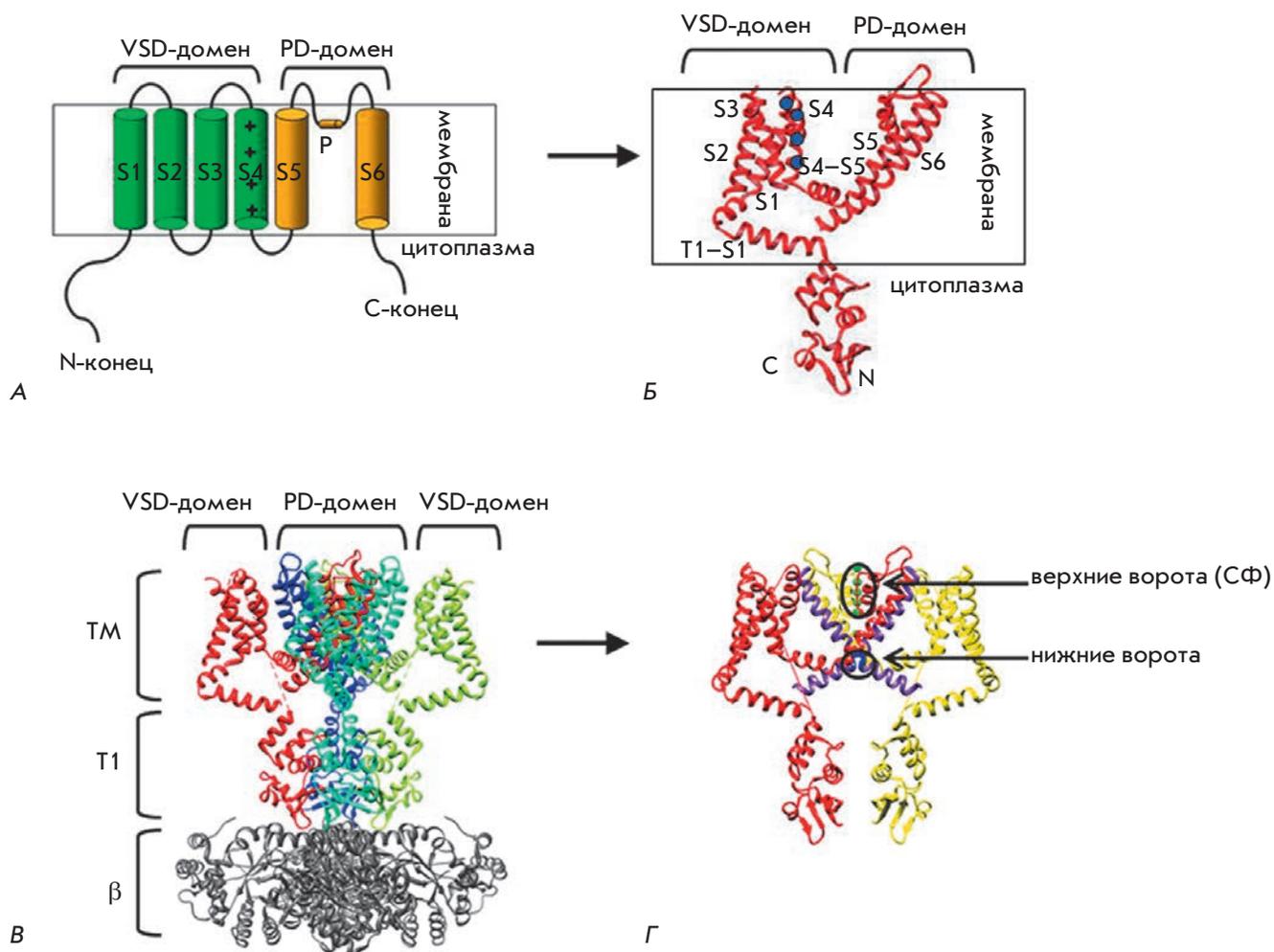


Рис. 2. Структура Kv-каналов. А – схема одной α -субъединицы Kv-канала. Трансмембранные сегменты S1–S6 и петля «Р», формирующая пору, подписаны. Заряженные Arg на сенсоре мембранного потенциала S4 обозначены плюсами. PD – поровый домен. Б – кристаллическая структура одной α -субъединицы канала Kv1.2 [21]. Подписаны сегменты S1–S6, цитоплазматический домен T1, линкер, соединяющий трансмембранную часть с доменом T1 (T1–S1), а также N- и C-концы. Заряженные Arg на сенсоре мембранного потенциала S4 обозначены синими кругами. В – кристаллическая структура канала Kv1.2 в комплексе с β -субъединицей (обозначена буквой β и выделена серым цветом) (с изменениями из [21]). ТМ – трансмембранный участок. Г – ворота канала Kv2.1. Для наглядности представлены только две противоположные субъединицы Kv α . Фиолетовым цветом показана спираль S6, синим – высококонсервативный участок спирали S6_T – PXP (ProValPro в Kv2.1), основной компонент нижних ворот. Зелеными шариками обозначены ионы K⁺, находящиеся в селективном фильтре канала (P-петля), который представляет собой верхние ворота канала

зуют две структурно и функционально различные части: 1) домен, проводящий ионы калия (поровый домен) – спирали S5–S6, расположенные в центре канала, 2) домен, чувствительный к изменению потенциала на мембране (VSD), – спирали S1–S4, расположенные на периферии канала (рис. 2Б,В).

В поровой части располагаются ворота канала, а также селективный фильтр, не позволяющий ионам, отличным от K⁺, проникать через канал. Ворота канала образованы перекрещивающимися

S-концами спиралей S6, которые при закрытии канала преграждают путь ионам [22–24]. В образовании селективного фильтра канала участвуют консервативный фрагмент (P-участок) и петля S5–S6 (рис. 2).

Известно, что VSD и поровый домен ковалентно связаны линкером S4–S5, который представляет собой амфифильную спираль, соединенную с C-концом спирали S6 (S6_T) и соседней субъединицы [21, 25–30]. В открытии/закрытии ворот канала важную роль играет высококонсервативный участок спирали S6_T,

состоящий из двух остатков Pro, разделенных чаще всего Val или другой аминокислотой – PXP (рис. 2Г). Этот участок может изгибаться, обеспечивая открытие канала [21]. Kv-каналы имеют двое ворот: (1) нижние ворота (НВ) с внутриклеточной стороны, образованные пересекающимися спиралями S6, и (2) верхние ворота (ВВ) с внеклеточной стороны канала, образованные Р-петлей селективного фильтра (рис. 2Г). У Kv-каналов, как и у большинства других калиевых каналов, НВ являются главными активационными воротами, которые контролируются внешним стимулом, таким, как мембранный потенциал. Внутренние спирали S6 пересекаются наподобие листков ирисовой диафрагмы фотоаппарата и открываются/закрываются схожим образом.

Помимо трансмембранной части, Kv-каналы имеют цитоплазматический участок, образованный N- и C-концами (рис. 2). Цитоплазматическая часть не содержит высококонсервативных участков и различается у Kv-каналов разных семейств [31].

В клетке Kv-каналы функционируют в форме больших макромолекулярных комплексов, объединяющих ионпроводящие α -субъединицы с цитоплазматическими и/или трансмембранными вспомогательными β -субъединицами, регуляторными и поддерживающими белками [32] (рис. 2В). У млекопитающих сборка порообразующих (α -) и вспомогательных субъединиц Kv-каналов происходит в эндоплазматическом ретикулуме, где они образуют стабильный комплекс [33]. α -Субъединицы формируют ионную пору, а β -субъединицы (рис. 2Б,В) и другие вспомогательные субъединицы модулируют свойства и функции α -субъединиц. Такая сложность структурных форм определяет большое разнообразие свойств и функций Kv-каналов [34].

АКТИВАЦИЯ Kv-КАНАЛОВ

Все Kv-каналы имеют сходный механизм активации. Они могут находиться в трех функциональных состояниях: состоянии покоя (закрытая конформация) ↔ активированном состоянии (открытая конформация) ↔ инактивированном состоянии (рис. 3).

В состоянии покоя канал не пропускает ионы. При деполяризации мембраны ее внутриклеточная часть становится положительной, что вызывает конформационные перестройки Kv-каналов, при этом энергетически выгодной становится открытая конформация. Эта перестройка называется активацией канала [36]. Если мембрана остается деполяризованной, то большинство Kv-каналов переходят в инактивированное непроводящее состояние. Всего описано два основных типа инактивации, N и C (рис. 3). За быстрый N-тип инактивации отвечает инактивационный пептид, свернутый в глобулу и «привя-

занный» линкером к N-концу α -субъединицы канала (α -клубок) или к β -субъединице (β -клубок) [3, 37]. Инактивационный пептид заходит в открытую пору канала и блокирует движение ионов [3, 38, 39]. При медленной инактивации (С-типа) селективный фильтр выступает в роли вторых ворот, он закрывается, препятствуя проникновению ионов [4, 40–42]. После инактивации при понижении потенциала до уровня потенциала покоя каналы полностью возвращаются в закрытую конформацию.

Механизм активации каналов остается темой 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 [21, 43, 44] были получены в открытом состоянии, поэтому модели активации Kv-каналов часто создаются на основе информации о структуре, установленной с помощью различных экспериментальных подходов и молекулярного моделирования (ММ) [43, 45–53]. Подобные модели создают основу для разумных интерпретаций

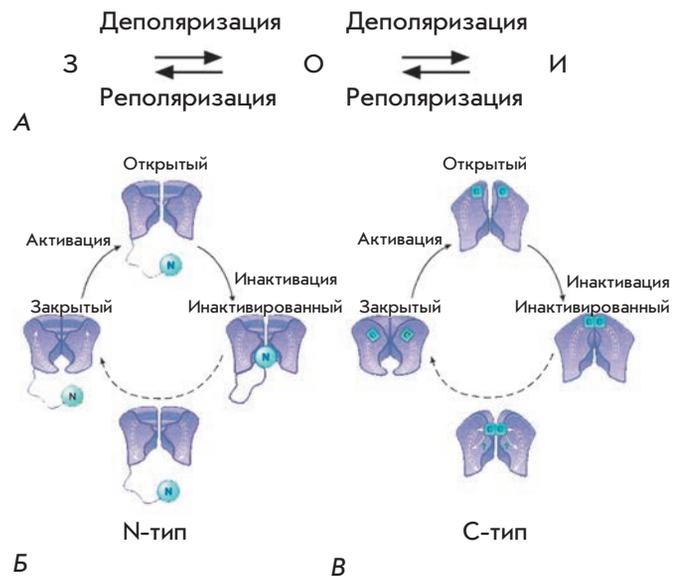


Рис. 3. А – схема конформационных переходов Kv-каналов: З – закрытый канал; О – открытый канал; И – инактивированный канал. Б – инактивация N-типа. После активации канала инактивационный пептид заходит в открытую пору канала и блокирует движение ионов. В – инактивация С-типа. Селективный фильтр выступает в роли вторых ворот и закрывается, препятствуя проникновению ионов. При понижении потенциала до уровня потенциала покоя каналы полностью возвращаются в закрытую конформацию (рисунок модифицирован из [35])

полученных результатов и дизайна дальнейших экспериментов. На сегодняшний день накоплено большое количество данных, указывающих на особенности строения Kv-каналов в открытой и закрытой конформациях. Современные модели активации все больше сходятся к единой консенсусной модели открытия канала [54–57]. Все они базируются на ранних ключевых экспериментах и моделях активации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ ДЛЯ ПОСТРОЕНИЯ МОДЕЛЕЙ АКТИВАЦИИ Kv-КАНАЛОВ

В самых первых моделях активации Kv-каналов предполагалось, что при активации канала сенсор потенциала S4 под действием изменения трансмембранного потенциала движется вверх по каналу, который сообщается с наружным и внутренним растворами [58]. Позже стали накапливаться экспериментальные данные о функционировании Kv-каналов, которые позволили уточнить имеющиеся модели активации. К основополагающим данным, важным для расшифровки механизма активации Kv-каналов, относятся следующие:

(1) *Сегмент S4 содержит консервативный повторяющийся мотив из трех аминокислотных остатков: (+, X1, X2, +, X1, X2...).*

Мутационный и электрофизиологический анализы позволили определить остатки, наиболее значимые (HI – high-impact) и менее значимые (LI – low-impact) для процесса активации/деактивации канала [59]. Сенсор потенциала S4 содержит консервативную последовательность (+, X1, X2, +, X1, X2...), в которой (+) – положительно заряженный HI (значимый) остаток, (X1) – гидрофобный остаток HI и (X2) – гидрофобный LI (незначимый) остаток (рис. 3А) [60, 61]. Остатки X1 располагаются в белковом окружении, где их мутации могут привести к нарушению упаковки белка, а следовательно, и к нарушению процесса открытия/закрытия канала. Остатки X2 экспонированы в липидное или водное окружение и их воздействие на функционирование канала незначительно. Повтор (+, X1, X2, +, X1, X2...) формирует три параллельных левозакрученных витка с небольшим наклоном вдоль правозакрученной спирали S4.

(2) *Каждая субъединица несет ~три воротных заряда, расположенных на остатках R1–R4 спирали S4.*

Движение сенсора потенциала S4 может быть детектировано посредством измерения воротных токов, происходящих при передвижении электростатических зарядов спирали S4 относительно электрического поля. При переходе канала *Shaker* из покоящегося в активированное состояние перемещается ~3.2–3.4 заряда на субъединицу [62–64]. Метод по-

очередной нейтрализации отрицательных зарядов спиралей S2/S3 и положительных зарядов S4 позволил идентифицировать аминокислотные остатки, переносящие воротный заряд [63, 64], – это R1, R2, R3 и R4 [65, 66].

(3) *10 аминокислотных остатков сегмента S4 расположены в мембране.*

Замена некоторых аминокислотных остатков канала *Shaker* на Cys показала, что при нахождении канала в состоянии покоя последовательность из ~10 а.о. недоступна как для внутриклеточного, так и для внеклеточного раствора [67, 68]. Эта последовательность соответствует ~13.5 Å α-спирали и может включать в себя только два или три положительных заряда S4 (рис. 3Б,В). Соответственно с обеих сторон мембраны имеются глубокие водные вестибюли, и лишь малая часть S4 располагается в коротком ВК (воротный канал) (рис. 3Б,В).

(4) *Спираль S4 может перемещаться в заполненной водой щели, так называемом «воротном канале» (ВК), с очень узким барьером между внешним и внутренним растворами.*

При этом три «стороны» ВК формируют спирали S2/S3, поровый домен и липиды. Взаимодействие между тремя консервативными отрицательными аминокислотными остатками в спиральях S2, S3 и положительными остатками в S4 свидетельствует о том, что S2 и S3 лежат с одной стороны ВК [63, 69–71].

Согласно данным флуоресцентного и мутационного анализа, с другой стороны ВК находится поровый домен [72, 73]. Это подтверждается тем, что при активации остатки R1 и R2 спирали S4 сближаются с E418 порового домена [74, 75], а Cys, введенные в S4, могут образовывать связь с Cys, введенными в поровый домен [45, 59].

Третья сторона ВК, по-видимому, образована липидами, что соответствует гидрофобной природе остатка спирали S4 в позиции X2. На это также указывает слабая связь мутаций этих остатков с активацией канала [60, 61].

(5) *Активация приводит к смещению сегмента S4 на девять аминокислотных остатков.*

Методом измерения флуоресценции показано, что процесс активации связан с передвижением ~9 а.о. S4 из ВК во внешний раствор [61, 67, 68, 76, 77]. При этом последовательность из ~9 а.о. исчезает из внутреннего водного вестибюля [67, 68].

(6) *Спираль S4 вращается во время активации.*

С помощью метода FRET обнаружено, что при активации канала происходит вращение S4 на ~180° [78, 79].

(7) *Сенсор мембранного потенциала S4 имеет стабильное промежуточное состояние.*

С помощью кинетических исследований обнаружены две фазы движения воротных зарядов [80] и два последовательных передвижения воротных зарядов во внешнем направлении с промежуточной трансмембранной позицией S4 [68].

(8) Канал может формировать протонную пору.

Замена остатка R1 либо R4 на His позволяет каналу пропускать протоны (омега-ток) [65, 66]. Следовательно, канал может содержать водный канал, который служит мостом между внутренним и внешним растворами, при этом R1H формирует протонную пору в состоянии покоя, R4H в активированном состоянии.

ОСНОВОПОЛАГАЮЩИЕ МОДЕЛИ АКТИВАЦИИ Kv-КАНАЛОВ

На основе представленных выше ключевых фактов была предложена (1) модель вращающихся спиралей (ВСМ) [59]. Поровый домен в модели Kv-канала создан на основе структуры гомологичного калиевого канала KcsA, расположение же спиралей VSD в это время оставалось неизвестным. Модель ВСМ подробно описывает лишь взаимное расположение некоторых аминокислотных остатков спиралей S1–S4. Согласно этой модели, сравнительно короткий (~13.5 Å) канал ВК имеет большие вестибулы, заполненные водой как с внешней, так и с внутренней стороны. Благодаря этому пространству электрическое поле фокусируется на небольшом участке S4, что, в свою очередь, минимизирует контакт нескольких заряженных аминокислот с диэлектрическим окружением и дает большой воротный заряд. При активации происходит винтовое передвижение S4 перпендикулярно поверхности мембраны тремя отдельными этапами. Винтовое движение во время активации может останавливаться в стабильных

промежуточных положениях, в которых основные заряды (R1–R4) передвигаются в положение, занятое предыдущим зарядом (рис. 4А). При этом положительно заряженные остатки R1–R4 формируют последовательные ионные пары с отрицательно заряженными аминокислотными остатками соседних спиралей. На каждом этапе происходит перенос 1/3 общего заряда (~3) на субъединицу, т.е. в целом одного заряда (рис. 4) [59].

После расшифровки кристаллической структуры бактериального канала KvAP [43, 81] появилась совершенно другая модель активации – (2) лопастная модель (ЛМ).

В кристаллической структуре канала KvAP спираль S3–S4 расположены около внутриклеточной поверхности мембраны, перпендикулярно оси поры (рис. 4Б). Было показано, что спираль S3 состоит из двух фрагментов (S3a и S3b), соединенных петлей S3 (рис. 3Б). Сегмент S3b и N-концевая часть спирали S4 уложены антипараллельно строго друг против друга, образуя почти полностью гидрофобный элемент со структурой спираль–петля–спираль, который прикреплен к поровому домену через гибкую петлю спирали S3 и линкер S4–S5 (рис. 3Б). Этот элемент (S3b–S4) назвали «лопастью» [43], в связи с чем модель получила свое название.

Согласно ЛМ, в закрытой конформации положительно заряженные лопасти канала находятся около внутриклеточной поверхности мембраны и удерживаются в таком положении большим электрическим полем при отрицательном потенциале покоя мембраны. В ответ на деполяризацию лопасти как единое целое движутся через мембрану к наружной стороне, в результате чего тянут за собой линкер S4–S5, увлекающий за собой спираль S5 в сторону от оси поры.

Эта модель согласуется с некоторыми экспери-

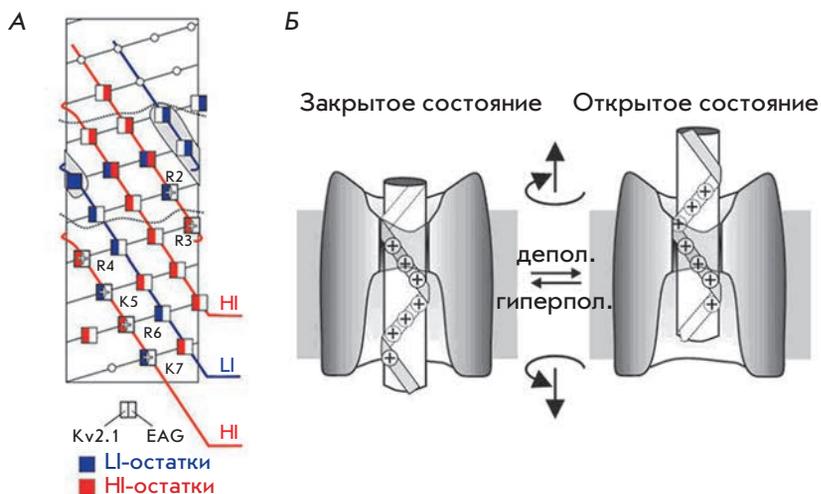


Рис. 4. А – схема расположения остатков спирали S4 каналов Kv10 и Kv2. 1. Показано расположение важных (HI) и неважных (LI) для открытия/закрытия остатков. Три параллельных полосы вдоль спирали S4 (HI заряженные остатки, HI гидрофобные остатки, LI гидрофобные остатки) непрерывны у обоих каналов и формируют три шага винта [59]. Б – схема активации Kv-канала согласно модели ВСМ [59]: винтовое вращение и движение спирали S4 (белый цилиндр) в неподвижном (ВК) канале

ментальными данными [46, 81], которые указывают на возможность движения лопасти сенсора потенциала на большое расстояние (порядка 20 Å). Однако более поздние эксперименты показали, что использованная кристаллическая структура KvAP [43] находится в ненативной конформации [82].

После получения новых структурных данных [65, 67–69, 71, 73, 83–86] была сформулирована (3) *усовершенствованная ВСМ* [87], созданная на основе данных о последовательности канала *Shaker* и кристаллической структуре канала KvAP [43]. Как и в предыдущей модели [59, 88], новая модель предполагала, что движение между открытой и закрытой конформациями канала включает три последовательных винтовых движения, при котором S4 передвигается на ~13.5 Å вдоль оси и вращается на 180°. При этом положительно заряженные группы S4 остаются в полярном окружении, где они могут взаимодействовать с отрицательно заряженными остатками спиралей S1–S3, с другими полярными атомами, отрицательно заряженными головками липидов и водой. В модели имеется единственный барьер, разделяющий аминокислотные остатки S4 на доступные снаружи и изнутри (рис. 4Б). Эта модель более подробно описывает взаимодействие различных аминокислот домена VSD между собой и включает в себя моделирование поровой части канала.

Более поздние данные по FRET [78] и потенциометрическим исследованиям [89] показали, что S4 практически не перемещается в трансмембранном направлении [48], что противоречит ВСМ и особенно ЛМ. Кроме того, в открытом состоянии верхняя часть сенсора S4 взаимодействует с поровым доменом, что невозможно в ЛМ. Эти данные, а также более ранние исследования [45, 84, 89, 90] привели к возникновению (4) *транспортной модели активации* (ТМА) [48, 84, 91] (рис. 5А,Б).

Согласно модели ТМА, как и ВСМ, в канале существуют глубокие водные полости с обеих сторон мембраны, разделенные небольшим участком канала посередине мембраны; именно в этой точке фокусируется электрическое поле, и для переноса воротных зарядов с одной стороны мембраны на другую не нужно больших движений S4. Во время активации канал S4 меняет свое положение, наклоняясь на 45°, но при этом передвигается перпендикулярно поверхности мембраны на незначительное расстояние (менее 2 Å), в то время как Arg на этой спирали перемещаются из глубокой водной полости с внутренней стороны в полость с внешней стороны мембраны. Такое перемещение Arg возможно благодаря двум барьерам, которые контролируют доступность аминокислотных остатков S4 для воды с внутренней и внешней стороны (рис. 5). При этом

движение спирали S4 сочетает в себе вращение и наклон, и она всегда находится в полярном окружении (рис. 5А,Б). В модели ТМА спираль S4 может быть качественно сравнена с транспортером, у которого в каждом цикле доступность сайта связывания меняется между внутренней и наружной сторонами. Такой эволюционно консервативный механизм достаточен для переноса большого количества зарядов через электрическое поле без передвижения S4 через мембрану. Модель ТМА согласуется со многими экспериментальными данными [47, 60, 72, 73, 78, 89, 93].

Наибольшая разница между основополагающими моделями заключается в амплитуде движения сегмента S4, что может быть следствием принятых в моделях упрощений. Например, в модели ВСМ движение S4 в основном представляется как движение жесткого тела, однако было показано, что S4 может переходить из конформации α -спирали в спираль 3_{10} [44, 54, 94–97]. В модели ЛМ предполагается, что лопасть S3–S4 движется как одно целое, но экспериментально показано, что эти две спирали передвигаются независимо [98].

СОВРЕМЕННЫЕ МОДЕЛИ АКТИВАЦИИ Kv-КАНАЛОВ

С установлением кристаллической структуры эукариотического канала Kv1.2 (рис. 2В) [21], которая впоследствии была улучшена [99], и структуры химеры Kv1.2/Kv2.1 [44] доступными стали новые данные об открытой конформации Kv-канала. Усовершенствование компьютерной техники и методов дало возможность рассчитывать более сложные молекулярные модели и изучать механизмы функционирования посредством молекулярной динамики. Все это привело к появлению ряда новых моделей и гипотез активации Kv-каналов, в частности, (5) *модели согласованного движения спиралей* (СДС) [53].

На основе данных рентгеноструктурного анализа (рис. 2В) [53] была построена молекулярная модель эукариотического канала Kv2.1 в закрытом состоянии и создана СДС-модель активации канала. С этой целью использовали моделирование *de novo* (метод Rosetta), метод молекулярной динамики (МД) и данные флуориметрии с фиксацией напряжения (voltage-clamp fluorimetry, VCF).

Согласно модели СДС, во время деполяризации мембраны S4 движется как наклоняющийся винт, вращаясь на ~180° по часовой стрелке (с внеклеточной стороны), поднимаясь вертикально на 6–8 Å и меняя угол наклона с ~60° до ~35°. Амплитуда вертикальных движений S4 варьирует от ~0 Å для S308 до ~14 Å для S289. При этом спирали S1, S2, S3 вращаются вокруг S4 по часовой стрелке, что согласуется с ранними данными [49] (рис. 6).

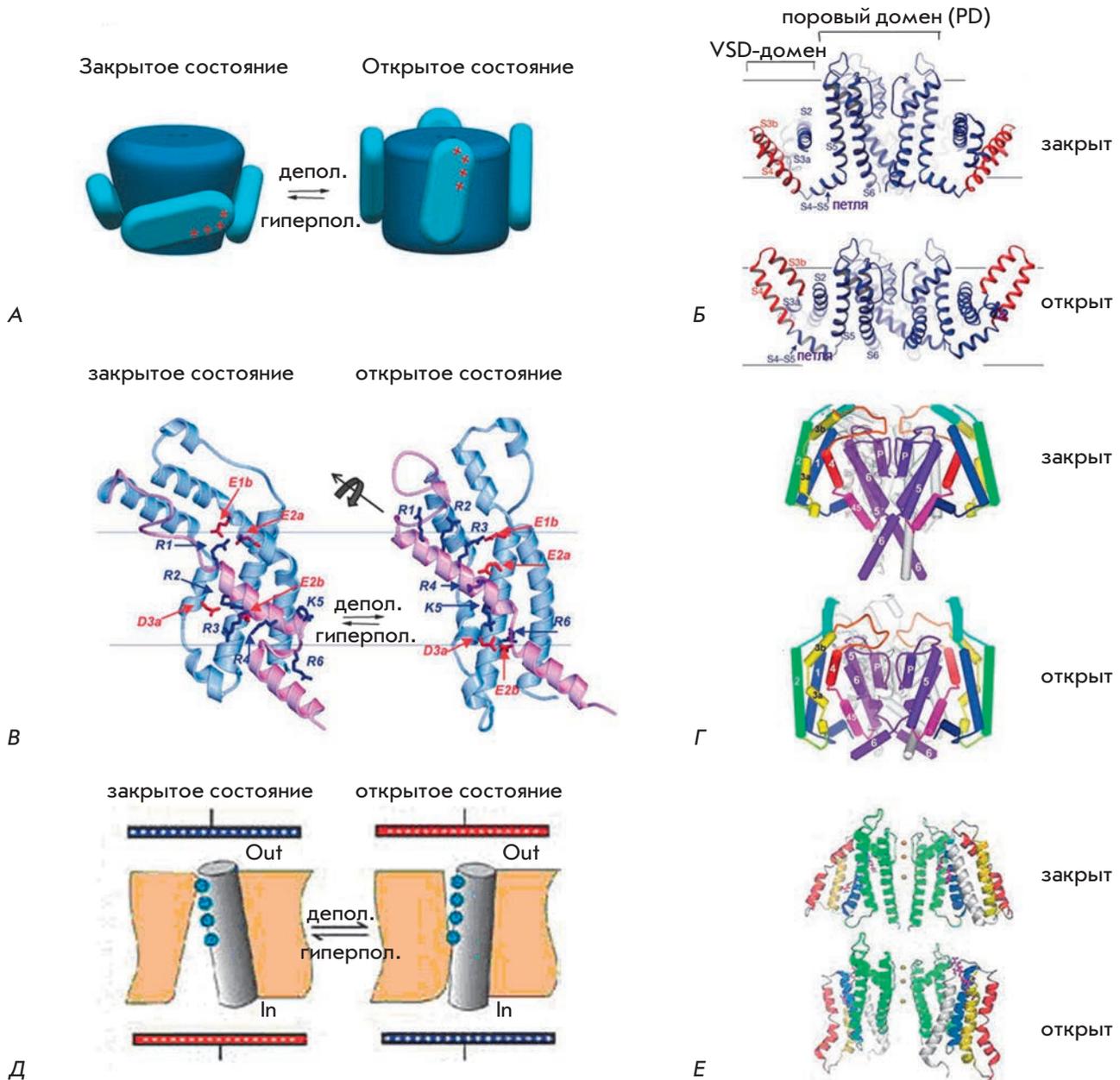


Рис. 5. Различные модели активации К_v-каналов. Все каналы и их части представлены в боковой ориентации: сверху – внеклеточное пространство, внизу – цитоплазма. **А** – схема лопастной модели (ЛМ) активации К_v. Показано движение лопастей (овалы голубого цвета). Красными плюсами обозначены Arg в спирали S4. **Б** – модель ЛМ, основанная на кристаллической структуре К_vAP [92]: показаны закрытая и открытая конформации. Лопасть S3b–S4 изображена красным цветом. Спирали S1–S4 подписаны. Канал показан во фронтальном разрезе. **В** – ВСМ. Показаны изменения в VSD-доме́не канала *Shaker*. Подвижные сегменты S4 и петля S4–S5 отмечены фиолетовым цветом. Положительно заряженные боковые цепи спирали S4 и отрицательно заряженные боковые цепи спиралей S1–S3, взаимодействующие друг с другом, отмечены соответственно синим и красным [83]. **Г** – ВСМ. Показаны полноразмерные каналы в закрытой и открытой конформациях. Спирали S1–S6 пронумерованы. Спирали домена VSD раскрашены в разные цвета. Спирали порового домена (S5–S6) отмечены фиолетовым цветом [83]. **Д** – схема движения спирали S4 (серый цилиндр) во время активации К_v-канала согласно ТМ, показывающая как деполяризация меняет доступность остатков Arg (синие кружки) из внутренней и наружной водной полости [48]. **Е** – ТМ-активации К_v-каналов: показаны закрытая и открытая конформации канала *Shaker*. Трансмембранные спирали обозначены цветом: S1 – белым, S2 – желтым, S3 – красным, S4 – синим; поровый домен обозначен зеленым; Arg в S4 фиолетовый [48]

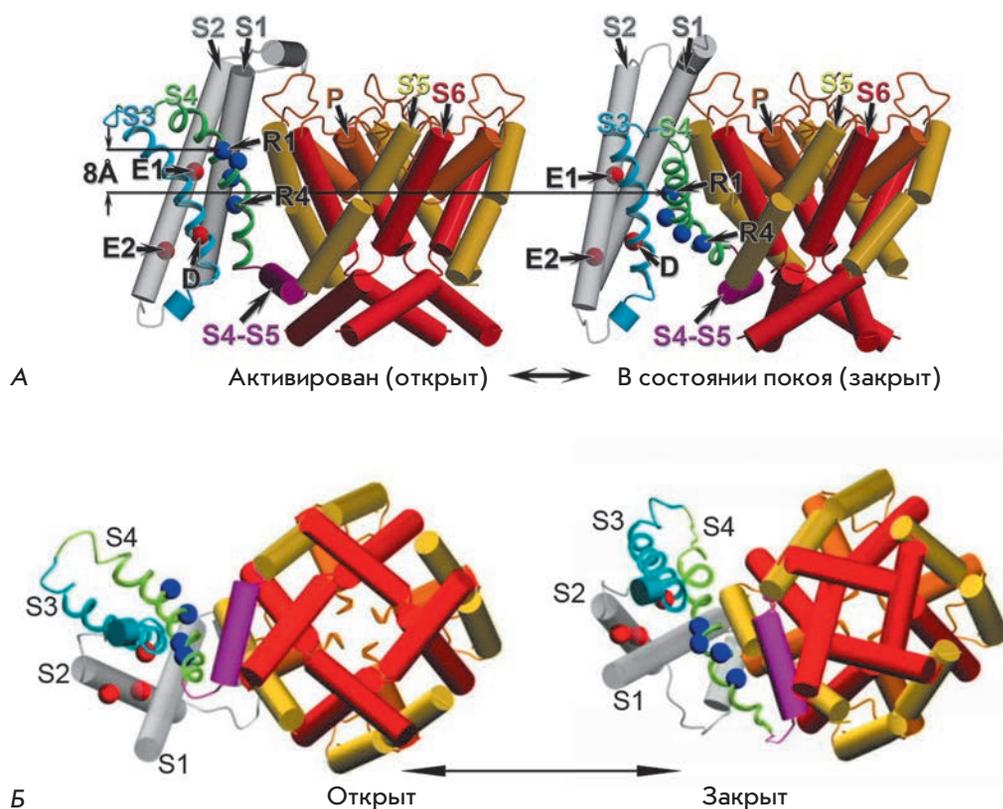


Рис. 6. Модель СДС. Сравнение моделей канала Kv1.2 [53] в активированном (открытом) состоянии (слева) и в состоянии покоя (закрытом) (справа). Все спирали изображены цилиндрами, кроме S3 и S4, которые показаны спиралями. Показан только один VSD-домен. Спирали S1 и S2 – серые, линкер S4–S5 – малиновый. Положение углеродных атомов C α Arg спиралей S4 обозначено R1 и R4 и выделено голубым. Аминокислотный остаток E226 спирали S2 подписан E1, E236 спирали S2 – E2, D259 спирали S3 – D; эти аминокислоты выделены красным. А – вид сбоку. Б – вид со стороны внеклеточного пространства

Исходя из результатов измерения омега-тока [100] определили, что в закрытом состоянии канала между R1 в спирали S4 (R294 в Kv1.2) и E226 (в Kv2.1) в спирали S2 формируется солевой мостик (рис. 6А), который стабилизирует закрытое состояние и препятствует проникновению ионов из внеклеточного водного вестигуля во внутренний [53]. При замене R1 на маленькую неполярную аминокислоту солевой мостик разрушается и образуется сквозная пора, пропускающая протоны, возникает омега-ток [100], что подтверждено электрофизиологическими экспериментами [101, 102].

Полученные данные свидетельствуют о том, что активация Kv-каналов связана с двумя основными типами конформационных изменений: (1) независимые движения VSD-доменов с переходом из состояния покоя в «закрытое активированное» состояние, которое сохраняет ворота порового домена закрытыми [103–105], и (2) кооперативный переход всех доменов VSD и порового домена в открытое состояние, при котором ворота порового домена открыты для проникновения ионов [104–106].

В модели СДС роль открытия ворот отводится внутриклеточному участку спирали S6, при этом S5 сначала поворачивается на ~ 7 Å вокруг порового домена. Таким образом, во вторую основную перестройку вовлечены наклоны спирали S4, способствующие наклону внутриклеточной половины спирали S5. Такое

движение против часовой стрелки (с внеклеточной стороны мембраны) дает возможность линкеру S4–S5 и спирали S6 во всех четырех субъединицах двигаться вместе и открывать внутриклеточные ворота (рис. 6).

Модели СДС закрытого и открытого канала показывают следующие молекулярные детали механизма активации Kv-канала (рис. 6):

(1) Спираль S4 движется вертикально на ~ 6 –8 Å. В ранее опубликованных структурных моделях трансмембранного участка домена VSD в открытом и/или закрытом состоянии величина вертикальных движений S4 значительно различается: ~ 2 –4 [48], ~ 3 [49] и 10–13 Å [87, 100]. Опубликованная ранее модель канала KvAP в состоянии покоя [46, 81] говорит о вертикальных движениях S4 с амплитудой ~ 15 –20 Å;

(2) Спираль S3 движется относительно спиралей S1, S2 и S4. В предыдущих публикациях не отмечено заметных движений спирали S3 относительно всех других сегментов VSD-домена;

(3) Согласованные движения спиралей S4, S5, линкера S4–S5, S6 во всех четырех субъединицах при финальном открытии канала. Ни в одной из ранее опубликованных моделей активации не был показан механизм кооперативных движений при открытии канала.

Соответствие модели СДС широкому кругу данных, которые ранее считались противоположными

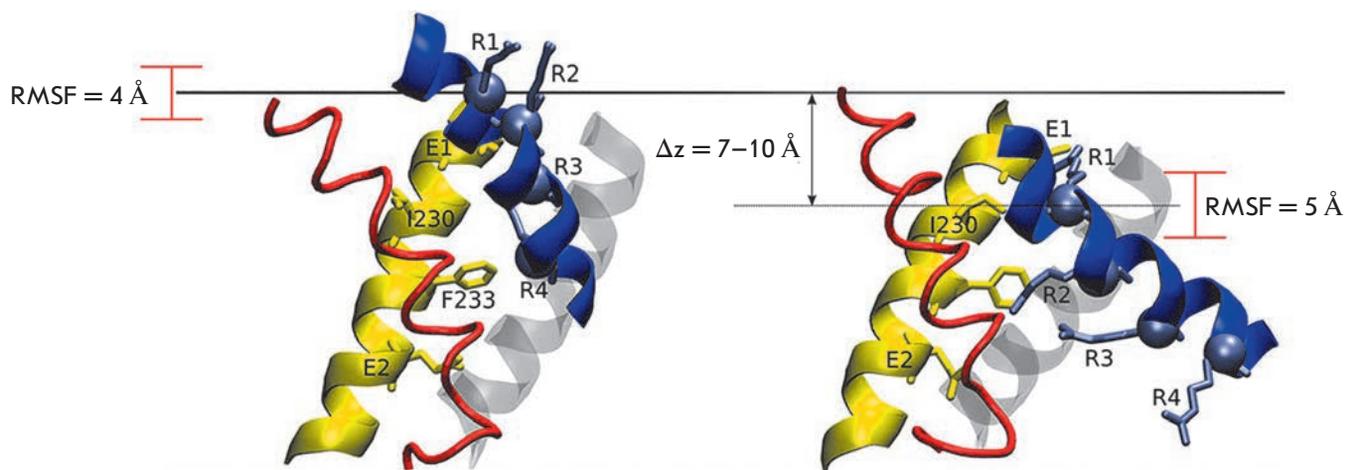


Рис. 7. Модель КМ. Сравнение моделей домена VSD-канала Kv1.2 в открытом (слева) [21] и закрытом (справа) состоянии канала (модель КМ). Спираль S1 показана серым цветом, S2 – желтым, S3 – красным, S4 – синим. Атомы C α остатка R294 перемещаются вертикально на 7–10 Å. Значения среднеквадратичных флуктуаций (RMSF) отражают разброс вертикальных координат z, рассчитанных для атома C α . Синими шариками с боковыми радикалами обозначены основные заряженные аминокислотные остатки спирали S4 (R1–R4), которые взаимодействуют с аминокислотными остатками других спиралей (подписаны и показаны их боковые цепи) [55]

[47, 60, 72, 73, 93, 100, 107], позволяет устранить многие противоречия в обсуждении конформационных перестроек, лежащих в основе активации Kv-каналов. Как и в модели ВСМ [108], главное движение в модели СДС – осевое вращение S4 на $\sim 180^\circ$. Как в ТМА [48], диэлектрическая полость вносит вклад в концентрирование трансмембранного поля, увеличивая таким образом воротный заряд, который энергетически связывает домен VSD с мембранным потенциалом.

Позднее модель СДС была улучшена методом полноатомной молекулярной динамики в мембранном окружении с явным растворителем [55, 109]. Было показано, что в закрытом состоянии канала Kv1.2 α -спираль S4 спонтанно переходит в правозакрученную спираль 3_{10} . Такая конформация спирали S4 ориентирует Arg к водной полости в домене VSD и позволяет образовывать солевые мостики с отрицательно заряженными аминокислотными остатками вдоль спиралей S2 и S3. Стремление сегмента S4 принять конформацию спирали 3_{10} согласуется с кристаллическими структурами каналов [44, 94], в которых внутренняя часть S4 (~ 11 а.о.) образует спираль 3_{10} .

Опираясь на улучшенную модель СДС [54], Варгас и соавт. [55] создали (6) консенсусную модель (КМ). Они использовали данные об основных взаимодействиях между аминокислотными остатками спиралей VSD-домена в закрытом канале. С использованием метода МД были смоделированы четыре ключевых взаимодействия (R294 и I177; R294 и I230; I230 и F267;

F233 и R294 в канале Kv1.2). При этом получили четыре независимые модели, которые в дальнейшем усреднили для создания КМ закрытой конформации канала Kv1.2 (рис. 7).

Модель КМ согласуется со всеми экспериментальными результатами, на которых были основаны ранние модели (ВСМ, ТМА, ЛМ) [46, 84, 89, 110–113]. КМ показывает, что S4 движется в вертикальном направлении примерно на 7–10 Å (рис. 7) [55].

Однако модели СДС и КМ не в состоянии объяснить все аспекты открытия/закрытия канала. Одна из причин этого – отсутствие знаний о структуре промежуточных конформаций Kv-канала. В связи с этим были предприняты попытки определить количество промежуточных конформаций и их строение экспериментальными методами и ММ.

МакКиннон и соотр. [114] обнаружили в домене VSD высококонсервативный сайт (рис. 8А), сформированный двумя отрицательно заряженными аминокислотными остатками (D259, E236 – в канале *Shaker*) и одним высококонсервативным (F233), который представляет собой «катализатор» переноса через мембранное поле каждой из основных аминокислот (R1–R4, K5) VSD-домена.

Этот сайт был назван центром переноса зарядов (ЦПЗ) [114]. При движении S4 каждый из ее заряженных остатков последовательно связывается с этим центром, в результате чего весь процесс активации/инактивации разделяется на пять последовательных стадий (открытый канал, три про-

Kvchim CIIWFSF*EFLVRFACPSKAG---FFTNIMNII*DIVAI
 Shaker CIIWFTF*ELTVRFLACPNKLN---FCRDVMNVIDIIAI
 Nav1.1 FTGIFTA*EMFLKIIAMPYY----YFQEGWNIFDGFIV
 Cav1.1 FLIVFSI*EAAMKIIAYGFLFHQDAYLRSGWNVLDFTIV
 Hv1 ILVFFMME*IIFKLFVF--RLE---FFHHKFEILD*AVVV
 VSP LSCYF*MLDLGLRIFAYGPKN----FFTNPWEVADGLII

А

Б

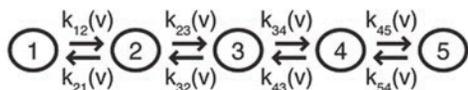


Рис. 8. А – сайт центра переноса зарядов (ЦПЗ), высококонсервативный в белках, содержащих VSD. Показаны выровненные последовательности химерного канала Kv1.2/2.1 (GI: 160877792), *Shaker* (GI: 13432103), человеческого канала Nav1.1 (GI: 115583677), человеческого канала Cav1.1 (GI: 110349767), человеческого канала Hv1 (GI: 91992155) и VSP (GI: 76253898). Представлены только те участки сегментов S2 и S3, которые формируют ЦПЗ. Высококонсервативные остатки, формирующие сайт, выделены: F – зеленым; E и D – красным. F соответствует Phe233 в химерном канале Kv1.2/2.1. Б – модель активации Kv-канала, состоящая из пяти стадий, на которых происходят четыре этапа передвижения VSD. На каждой стадии разные положительно заряженные остатки спирали S4 ((R1–R5) отмечены номерами) последовательно занимают ЦПЗ (показан окружностью). Когда все четыре сенсора приходят к пятой стадии, пора открывается [114]

межуточных стадии и закрытый канал), в которых заряженные аминокислоты спирали S4 (R1–R4, K5) последовательно связываются с ЦПЗ (рис. 8Б). Используя метод МД и данные исследования, группа французских ученых [115] изучила структуру домена VSD в различных промежуточных состояниях канала Kv1.2, помещенного в липидный бислой с приложенным гиперполяризационным потенциалом. Эти пять стадий (состояний) были названы: начальное верхнее положение, α ; три промежуточных, β , γ , δ ; нижнее закрытое положение, ϵ (рис. 9). При деактивации канала основные заряженные аминокислотные остатки S4 движутся от внешних к внутренним сайтам связывания, которые представляют собой отрицательно заряженные остатки сегментов S1–S3 (E183, E226, D259 и E236), а также группы PO_4^- липидов. Во время деактивации канала центр масс остатков R1–R4 движется во внутриклеточном направлении приблизительно на 12 Å [78, 79]. Кроме того, каждое из четырех перемещений сопровождается передвижением одного остатка (K5, R4, R3 и R2) че-

рез участок ЦПЗ (рис. 9). В результате была предложена (7) модель перемещения зарядов (МПЗ).

При рассмотрении процесса с внешней стороны мембраны движение S4 сопровождается слабым наклоном ($\sim 15^\circ$); в стадии ϵ S4 становится под большим наклоном к мембране по сравнению со стадией α . Как показано в более ранних экспериментах [78, 79], происходит умеренное спиральное вращение S4 по часовой стрелке ($\sim 45^\circ$) и значительное спиральное скручивание против часовой стрелки ($\sim 90^\circ$) (рис. 9). В этой модели отсутствует значительное по сравнению с другими моделями перемещение спирали S4, пока не повернется ее верх [50, 53, 96]. Данная модель учитывает данные о наличии ЦПЗ [114]: сайт ЦПЗ связывает основные остатки K5, R4, R3, R2 и R1 в конформациях α , β , γ , δ и ϵ соответственно. В каждой конформации позиция ЦПЗ сохраняется в пределах центральной части липидного бислоя [115].

Опираясь на результаты экспериментов по созданию металл-ионных (Cd^{2+}) мостиков, позднее обнаружили 20 новых сайтов взаимодействия между спиралями VSD-домена [116]. Эти данные использовали для моделирования (методом Rosetta) различных промежуточных конформаций канала *Shaker* и создания (8) модели деактивации Kv-каналов (МДК) [116]. Согласно модели МДК, при деактивации канал проходит пять стадий: О – открытый канал, С1–С2 – промежуточные состояния, С3 – закрытая конформация, С4 – глубокое закрытое состояние, возникающее при сильной гиперполяризации (рис. 10). Стадия С3 соответствует КМ закрытого состояния Kv-канала [55].

В модели МДК во время деактивации S4 быстро движется во внутриклеточном направлении, по крайней мере на 12 Å, скользя вдоль спирали S3 (рис. 10) [116]. При этом короткий участок спирали S4 (~ 10 а.о.) имеет конформацию 3_{10} -спирали. На стадии открытого канала (О) 3_{10} -спираль располагается посередине S4, при движении S4 вниз 3_{10} -спираль перемещается по сегменту S4, оставаясь все время в центре мембраны. При этом 3_{10} -участок с обеих сторон ограничивается двумя из пяти заряженных аминокислот (R1–R4, K5), а центральная его часть располагается напротив ЦПЗ (F290). На стадии С4 участок 3_{10} полностью переходит в α -спираль. Arg, расположенный выше F290, формирует солевой мостик с E283, а Arg, находящийся ниже, – мостик с E293 (и E283 и E293 располагаются в спирали S2) (рис. 10). Деформация, вызванная этими солевыми мостиками, является основным стабилизирующим фактором 3_{10} -спирали. На стадии С4 последний остаток R1 проходит ниже гидрофобного замка, сформированного F290, и не может сформировать солевой мостик с E283, в результате чего структура S4 релаксирует в α -спираль. Стадия С4 труднодостижи-

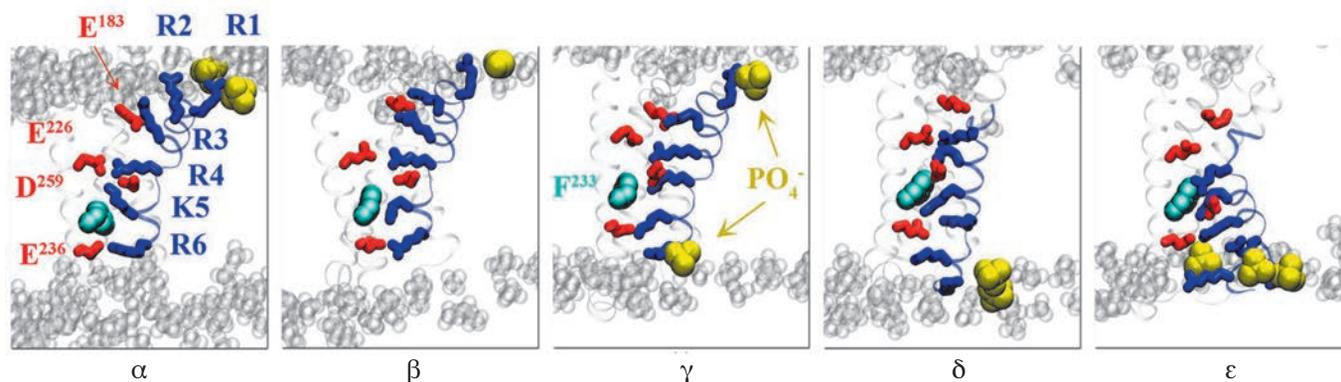


Рис. 9. Пять ключевых промежуточных стадий домена VSD канала Kv1.2 согласно модели МПЗ: начальное верхнее положение, α ; три промежуточных, β , γ , δ ; и нижнее закрытое положение, ε . Основные остатки спирали S4 показаны синими палочками, аминокислотные остатки и PO_4^- -группа липидов, с которыми R1–R5 образуют солевые мостики, подписаны и обозначены красными палочками и желтыми шариками соответственно. Высококонсервативный остаток F233 спирали S2 показан голубыми шариками [115]

ма и возможна только при значительной гиперполяризации [117]. Для достижения стадии C4 сегмент S4 должен передвинуться на 17 Å [116]. Существование C4 подтверждается экспериментальными данными [114, 118].

ЭЛЕКТРОМЕХАНИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ ПОРОВЫМ И VSD-ДОМЕНАМИ

До сих пор невыясненным остается вопрос, как движение VSD приводит к открытию поры канала, т.е. как осуществляется электромеханическая связь между VSD- и поровым доменами. Известно, что основная роль в этом процессе отводится линкеру S4–S5 [31, 56], но структурные данные отсутствуют. Для объяснения функционирования Kv-канала и выяснения механизма электромеханической связи порового и VSD-доменов группа исследователей [56] изучила кристаллическую структуру открытого состояния канала Kv1.2/Kv2.1 [44, 119] с помощью метода МД.

Была создана цельная и подробная (9) *механическая модель активации/деактивации Kv-канала (ММД)* (рис. 11), объясняющая многие ранее неизвестные черты этого процесса [56].

При деактивации канала происходит уменьшение ионного транспорта, сопровождаемое выходом воды из гидрофобной полости поры и конкурентным закрытием поры (коллапс поры), что объясняет осмотическую зависимость всего процесса функционирования канала [17, 18]. Далее происходит (1) полная релаксация доменов VSD – передвижение S4 внутрь на ~15 Å относительно более неподвижных спиралей S1–S3a, а также (2) вращение S4 на ~120°, благодаря которому заряженные аминокислотные остатки остаются направленными в полость VSD,

и (3) боковое разделение VSD и порового доменов за счет вращения и передвижения VSD наружу относительно поры, что позволяет поре оставаться закрытой. Остаток R4 при активированном состоянии канала располагается по центру мембраны в точке наибольшего трансмембранного электрического поля и является инициатором движения воротных зарядов. ЦПЗ – центральный гидрофобный остаток F233, разделяющий внешнюю и внутреннюю гидратированные полости домена VSD. Остатки R3 и R2 движутся последовательно, при этом движение S4 во внутреннем направлении обычно останавливается, когда R1(Q) достигает F233. В VSD-доме образуются несколько солевых мостиков, но в основном S4 взаимодействует с фосфатными группами липидов. Эти данные согласуются с данными о функциональном взаимодействии VSD-домена с липидами [13, 120].

При активации канал проходит те же этапы, но в обратном направлении (рис. 11): S4 стремительно передвигается наружу на ~5–10 Å. На первом этапе воротные заряды передвигаются быстро, так как большинство солевых мостиков между S4 и другими сегментами домена VSD в закрытом состоянии разрушены; при движении S4 наружу эти солевые мостики временно восстанавливаются, приводя к постепенному замедлению движения S4. Как только движение S4 подходит к завершению, домены VSD приближаются к состоянию, характерному для активированного канала. Ключевое отличие от деактивации состоит в том, что все четыре домена VSD должны быть подняты перед полным открытием поры канала; канал с полностью перемещенными вверх сегментами S4 нарушает упаковку линкера S4–S5 со спиралью S6, что позволяет воде и выходящим ионам вновь зайти в пору и восстано-

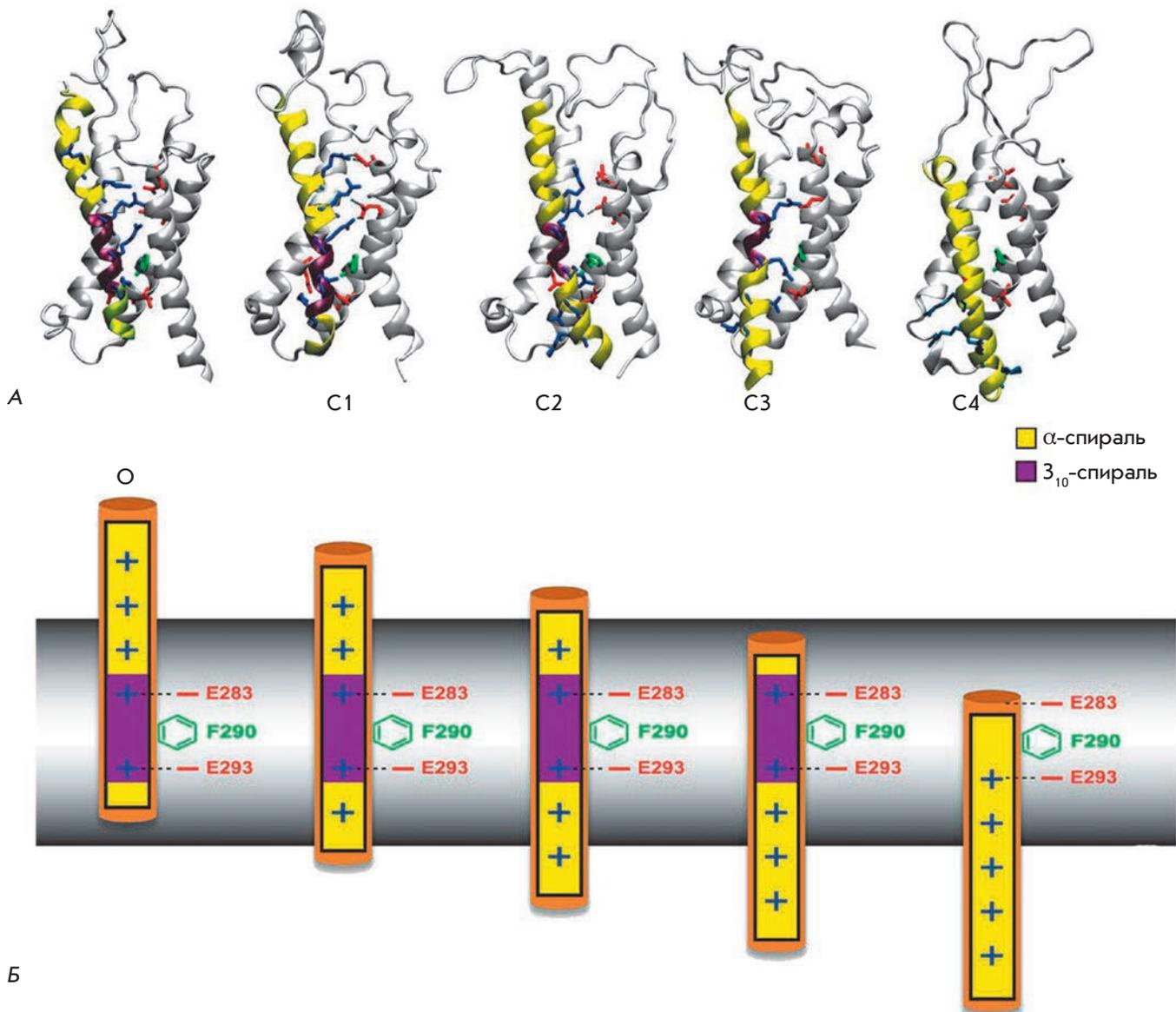


Рис. 10. Модель МДК. Промежуточные стадии, которые проходит VSD-домен канала *Shaker* при деактивации [116]. А – молекулярные модели домена VSD: О – открытый канал, С1–С2 – промежуточные состояния, С3 – закрытая конформация, С4 – глубокое закрытое состояние, возникающее при особых условиях. На каждой стадии боковая цепь одного из Arg спирали S4 (голубые палочки) проходит через ЦПЗ (F290, зеленая палочка), при этом боковые цепи Arg, оказавшиеся рядом с ЦПЗ, формируют солевые мостики с отрицательно заряженными остатками спиралей S1–S3 (красные палочки; E247 в S1 и E283 в S2 выше F290, и E293 в S2 и 316D в S3 ниже F290). На всех стадиях участок спирали S4, располагающийся напротив F290, переходит в 3₁₀-спираль (фиолетовая), однако на стадии С4 этот участок релаксирует в α-спираль (желтая). Таким образом, участок 3₁₀-спирали скользит вдоль сегмента S4 без затрат энергии, что предотвращает вращение этого участка во время активации/деактивации канала. Б – схема, показывающая движения спирали S4. Цвета как на рис. 10А

вить проводимость. Боковые цепи L331 (S5) и P405 (S6) переходят в положение, позволяющее им взаимодействовать [17]. Такие перестройки способствуют связыванию спирали S6 с мотивом PVP, что приводит к расширению с внутриклеточной стороны и полной гидратации поры. Сопутствующее этому откры-

тие верхних (гидрофобных) ворот (I402) позволяет сайту S5 селективного фильтра заполниться ионами K⁺ [121], а каналу перейти в полностью открытое состояние. Спираль S6 и линкер S4–S5 принимают плотноупакованную конфигурацию, которая стабилизирует открытие поры.

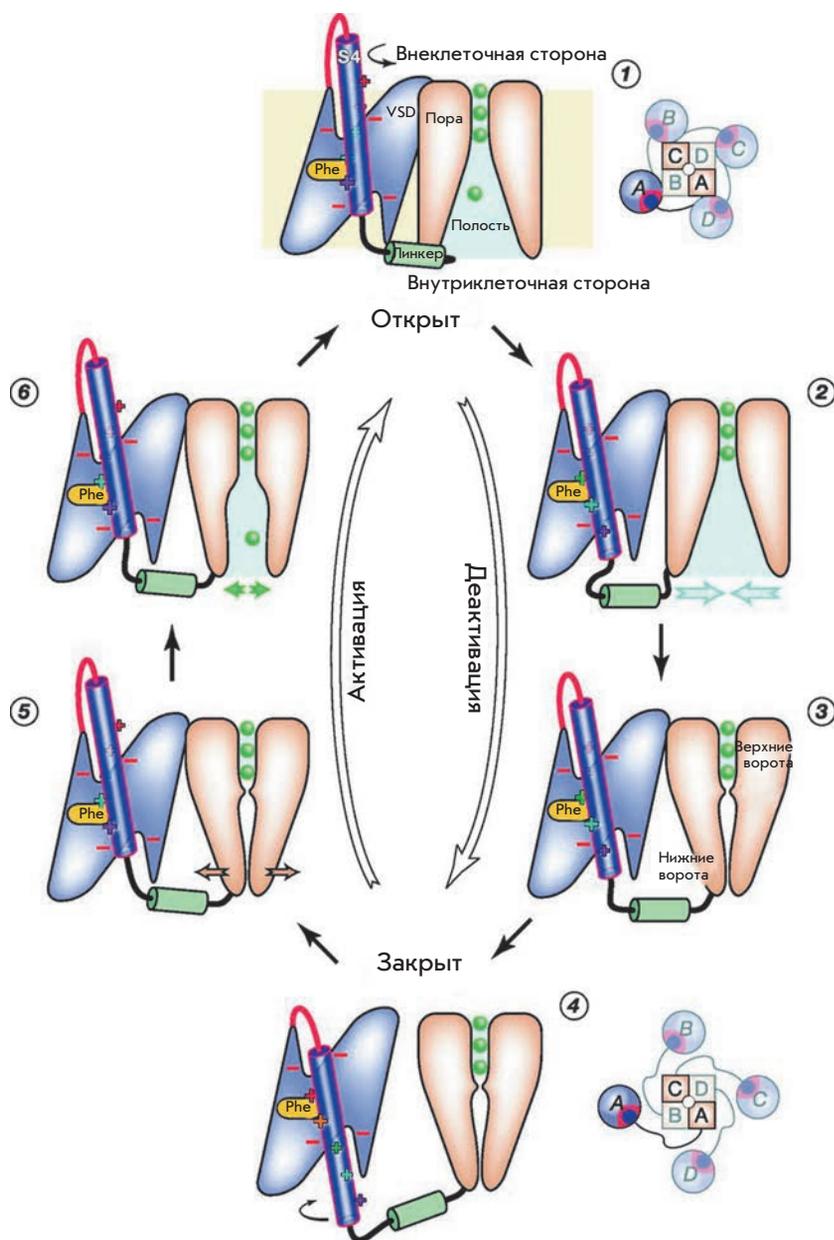


Рис. 11. ММд-модель активации Kv-канала [56]. Воздействие на канал в активированном состоянии (1) потенциала гиперполяризации инициирует движение спирали S4 во внутреннем направлении и ослабление связи между VSD- и поровым доменами. В результате происходит истощение ионного транспорта в полости поры (2) и дальнейший ее гидрофобный коллапс. Закрытие верхних (Ile402 в Kv1.2) и нижних ворот [PVP мотив; Leu331 (S5)–Pro405 (S6)] останавливает ток ионов (3). S4 продолжает движение во внутреннем направлении; как только S4 заканчивает движение, линкер S4–S5 полностью опускается, и домены VSD отстраняются от поры – канал переходит в закрытое состояние (4). Воздействие потенциала деполяризации на канал в закрытом состоянии приводит к движению спирали S4 во внешнем направлении. Когда все четыре сегмента S4 и линкера S4–S5 поднимутся (5) и все VSD-домены снова приблизятся к поро, тогда нижние ворота дестабилизируются; переход 4 => 5 – этап, лимитирующий скорость активации канала. Флуктуация нижних ворот вызывает открытие поры и частичную ее регидратацию, что позволяет ионам калия войти внутрь и инициировать проводимость канала (6); переход 5 => 6 не зависит от потенциала. Присутствие ионов способствует полной регидратации поры, что приводит к полному открытию верхних и нижних ворот, возвращая канал к открытому состоянию (1). Расположение доменов VSD (кружки) относительно порового домена (квадраты) показано схематически (вид с внеклеточной стороны) [56]

Мы приходим к выводу, что открытие и закрытие Kv-канала – это энергетически асимметричный процесс [56]. Поскольку пора более стабильна в дегидратированном закрытом состоянии [17, 122] (в связи с гидрофобностью полости поры [17]), для ее закрытия нет необходимости в сильном давлении спирали S4 на линкер S4–S5. Напротив, активация канала требует приложения работы деполяризации, стимулирующей передвижение спирали S4 через мембрану, которая в конечном счете сильно тянет линкер S4–S5, что приводит к нарушению взаимодействия S4–S5/S6 и открытию поры. Только когда все воротные заряженные аминокислотные остатки и линкер S4–S5 находятся в поднятом состоянии, происходит

достаточно сильная дестабилизация закрытой поры, в результате чего флуктуации нижних ворот (за счет нарушения взаимодействий линкера со спиралью S6) позволяют частично, а затем и полностью гидратировать полость поры. Линкер S4–S5 находится в напряжении в активированном состоянии канала и ослаблен в состоянии покоя, что, возможно, объясняет консервативность длины линкера: более короткий линкер ингибирует закрытие канала, так как S4 не может переместиться на достаточное расстояние, а более длинный линкер ингибирует открытие, потому что даже полное перемещение S4 во внешнем направлении не может эффективно тянуть спираль S6 посредством линкера S4–S5 [56].

Таким образом, модель ММд показала, что линкер S4–S5 и С-конец спирали S6 управляют процессом открытия/закрытия канала независимо от механизма, поднимающего и опускающего домен VSD [56]. Тот факт, что лопасть S3b–S4 можно заменить гомологичной последовательностью с сохранением химерным каналом свойств нативного канала [123, 124], свидетельствует о том, что эта лопасть является ключевым механистическим элементом в процессе активации/деактивации канала. Если учесть природную вариабельность последовательности данного функционального участка (лопасть S3b–S4 и взаимодействующий участок линкера S4–S5 со спиралью S6), то понятными становятся различия в параметрах активации Kv-каналов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе длительной истории изучения механизма активации Kv-каналов было предложено большое количество моделей, начиная с основополагающих (ВСМ, ЛМ и ТМА) и заканчивая современными: СДС, КМ, МПЗ, МДК, МД, ММд [53, 54, 56, 115, 116], основанными на данных кристаллографии, мутационного анализа, ММ и биофизических данных. Подобный синтез различных методов и подходов позволил решить сложнейшую задачу – определить процессы, лежащие в основе активации Kv-канала, без использования прямых структурных данных о закрытой конформации и промежуточных состояниях.

К настоящему времени исследователи все больше и больше приходят к единой модели активации Kv-канала. Группам ученых [53, 54, 56, 115, 116] удалось добиться сходных результатов, однако количество стадий, амплитуды движений и их направления различаются в разных моделях. Оценка вертикального передвижения S4 зависит от того, как оно было выровнено относительно открытой структуры канала, а также от флуктуаций, значительных в виду динамичности промежуточных конформаций [55].

Сравнение всех доступных моделей VSD-доменов канала в закрытой конформации [53, 54, 56, 115, 116] показало, что все они лежат в пределах $\sim 3.5 \text{ \AA}$ RMSD относительно положения атомов C α [125]. Остается только одно несоответствие, которое заключается в определении позиции боковой цепи остатка R1. Этот остаток в одних моделях [53, 55] взаимодействует с E226, а в других [56, 115] – с D283. Каждая группа ученых утверждает, что полученные ими данные подтверждаются экспериментально [50, 114, 118, 126]. Возможно, что обе конформации существуют одновременно при наличии потенциала гиперполяризации [127].

Модели активации рассматривают две – три промежуточные стадии [53, 54, 56, 115, 116]. Следует иметь

в виду, что промежуточные конформации нестабильны и трудно отделимы друг от друга [116], поэтому разные авторы вполне могут рассматривать одни и те же этапы активации. Так, в моделях МПЗ, ММд [56, 115] рассматриваются три промежуточные стадии, в то время как в модели МДК [116] таких стадий две, но все эти модели описывают очень схожие процессы. Вероятно, все модели представляют один и тот же процесс, но выбирают разные промежуточные точки. Несмотря на небольшие различия в моделях [53, 54, 56, 115, 116], все они хорошо описывают обобщенный процесс активации Kv-канала и объясняют основные принципы его функционирования. Особенно полно изложена модель ММд [56]. Согласно этим принципам, в каждом VSD-домене канала имеются глубокие водные полости с обеих сторон мембраны, разделенные тонким перешейком, содержащим консервативный Phe, который служит катализатором передвижения воротных зарядов S4. Положительные основные аминокислотные остатки S4 стабилизируются, взаимодействуя попарно с отрицательными зарядами в спиральях S1–S3, расположенных вдоль поверхности S4 [49, 69, 71]. Во время активации положительные заряды «перепрыгивают» от одного отрицательного заряда к следующему, что приводит к конформационному изменению в VSD. Движение S4 представляет собой комбинацию нескольких процессов: 1) наклон спирали S4 в мембране, 2) вращение вокруг своей оси и 3) вертикальное и радиальное передвижение. Это движение смещает линкер S4–S5 и таким образом приводит к открытию поры. Внутренняя часть спирали S4 растягивается, в то время как два ее конца закручиваются подобно винту. Открытие канала происходит после того, как переместились все четыре VSD-домена, в то время как закрытие канала требует перемещения только одного из них. Для установления точного механизма активации/деактивации, особенно процесса электро-механической связи доменов, необходимо получить атомарную структуру Kv-канала не только в двух конечных конформациях (открытой и закрытой), а также в промежуточных состояниях, что представляется чрезвычайно сложной задачей, так как эти состояния нестабильные и короткоживущие по сравнению со временем всего процесса активации. ●

*Авторы благодарят профессора МГУ
Г.В. Максимова за плодотворные обсуждения.*

*Работа частично финансирована грантом
Седьмой Рамочной программы Евросоюза (EDICT
#201924). А.В. Гризель получает финансирование
за счет Программы развития Санкт-
Петербургского государственного университета
(№ 1.50.1038.2014).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yu F.H., Yarov-Yarovoy V., Gutman G.A., Catterall W.A. // *Pharmacol. Rev.* 2005. V. 57. P. 387–395.
2. Gutman G.A., Chandry K.G., Grissmer S., Lazdunski M., McKinnon D., Pardo L.A., Robertson G.A., Rudy B., Sanguinetti M.C., Stühmer W., Wang X. // *Pharmacol. Rev.* 2005. V. 57. P. 473–508.
3. Hoshi T., Zagotta W.N., Aldrich R. W. // *Science.* 1990. V. 250. P. 533–538.
4. Yellen G. // *Nature.* 2002. V. 419. P. 35–42.
5. Bosma M.M., Hille B. // *Endocrinology.* 1992. V. 130. P. 3411–3420.
6. Pal S.K., Takimoto K., Aizenman E., Levitan E.S. // *Cell Death. Differ.* 2006. V. 13. P. 661–667.
7. Deutsch C., Chen L.Q. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 10036–10040.
8. Singer-Lahat D., Sheinin A., Chikvashvili D., Tsuk S., Greitzer D., Friedrich R., Feinshreiber L., Ashery U., Benveniste M., Levitan E.S., et al. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. P. 1651–1658.
9. MacDonald P.E., Sewing S., Wang J., Joseph J.W., Smukler S.R., Sakellaropoulos G., Saleh M.C., Chan C.B., Tsushima R.G., Salapatek A.M., et al. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 44938–44945.
10. Kim S.J., Widenmaier S.B., Choi W.S., Nian C., Ao Z., Warnock G., McIntosh C.H. // *Cell Death. Differ.* 2012. V. 19. P. 333–344.
11. Wang Q., Curran M.E., Splawski I., Burn T.C., Millholland J.M., VanRaay T.J., Shen J., Timothy K.W., Vincent G.M., de Jager T., et al. // *Nat. Genet.* 1996. V. 12. P. 17–23.
12. Wray D. // *Eur. Biophys. J.* 2009. V. 38. P. 271–272.
13. Watanabe H., Nagata E., Kosakai A., Nakamura M., Yokoyama M., Tanaka K., Sasai H. // *J. Neurochem.* 2000. V. 75. P. 28–33.
14. Beekwilder J.P., O’Leary M.E., van den Broek L.P., van Kempen G.T., Ypey D.L., van den Berg R.J. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. V. 304. P. 531–538.
15. Camacho J. // *Cancer Lett.* 2006. V. 233. P. 1–9.
16. Milescu M., Lee H.C., Bae C.H., Kim J.I., Swartz K.J. // *J. Gen. Physiol.* 2013. V. 141. P. 203–216.
17. Thomas D., Wimmer A.B., Wu K., Hammerling B.C., Ficker E.K., Kuryshv Y.A., Kiehn J., Katus H.A., Schoels W., Karle C.A. // *Naunyn Schmiedeberg Arch. Pharmacol.* 2004. V. 369. P. 462–472.
18. Ikeda M., Tomita Y., Mouri A., Koga M., Okochi T., Yoshimura R., Yamanouchi Y., Kinoshita Y., Hashimoto R., Williams H.J., et al. // *Biol. Psychiatry.* 2010. V. 67. P. 263–269.
19. Sokolova O. // *FEBS Lett.* 2004. V. 564. P. 251–256.
20. Carrington J.C., Freed D.D. // *J. Virol.* 1990. V. 64. P. 1590–1597.
21. Long S.B., Campbell E.B., Mackinnon R. // *Science.* 2005. V. 309. P. 897–903.
22. Brandt F., Etehell S.A., Ortiz J.O., Elcock A.H., Hartl F.U., Baumeister W. // *Cell.* 2009. V. 136. P. 261–271.
23. Myasnikov A.G., Afonina Z.A., Klaholz B.P. // *Ultramicroscopy.* 2013. V. 126. P. 33–39.
24. Doyle D.A., Morais Cabral J., Pfuetzner R.A., Kuo A., Gulbis J.M., Cohen S.L., Chait B.T., MacKinnon R. // *Science.* 1998. V. 280. P. 69–77.
25. Lu Z., Klem A.M., Ramu Y. // *J. Gen. Physiol.* 2002. V. 120. P. 663–676.
26. Lu Z., Klem A.M., Ramu Y. // *Nature.* 2001. V. 413. P. 809–813.
27. Labro A.J., Raes A.L., Grottesi A., van Hoorick D., Sansom M.S., Snyders D.J. // *J. Gen. Physiol.* 2008. V. 132. P. 667–680.
28. Barghaan J., Bahrng R. // *J. Gen. Physiol.* 2009. V. 133. P. 205–224.
29. Batulan Z., Haddad G.A., Blunck R. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 14005–14019.
30. Haddad G.A., Blunck R. // *J. Gen. Physiol.* 2011. V. 137. P. 455–472.
31. Pischalnikova A.V., Sokolova O.S. // *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2009. V. 4. P. 71–82.
32. Leicher T., Bahrng R., Isbrandt D., Pongs O. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 35095–35101.
33. Shi G., Nakahira K., Hammond S., Rhodes K. J., Schechter L.E., Trimmer J.S. // *Neuron.* 1996. V. 16. P. 843–852.
34. Wray D. // *Eur. Biophys. J.* 2004. V. 33. P. 194–200.
35. Rasmusson R.L., Morales M.J., Wang S., Liu S., Campbell D.L., Brahmajothi M.V., Strauss H.C. // *Circ. Res.* 1998. V. 82. P. 739–750.
36. Sigworth F.J. // *Q. Rev. Biophys.* 1994. V. 27. P. 1–40.
37. Rettig J., Heinemann S.H., Wunder F., Lorra C., Parcej D.N., Dolly J.O., Pongs O. // *Nature.* 1994. V. 369. P. 289–294.
38. Armstrong C.M., Bezanilla F. // *J. Gen. Physiol.* 1977. V. 70. P. 567–590.
39. Zagotta W.N., Hoshi T., Aldrich R.W. // *Science.* 1990. V. 250. P. 568–571.
40. Blunck R., Cordero-Morales J.F., Cuello L.G., Perozo E., Bezanilla F. // *J. Gen. Physiol.* 2006. V. 128. P. 569–581.
41. Cordero-Morales J.F., Cuello L.G., Zhao Y., Jogini V., Cortes D.M., Roux B., Perozo E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. V. 13. P. 311–318.
42. Cordero-Morales J.F., Cuello L.G., Perozo E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. V. 13. P. 319–322.
43. Jiang Y., Lee A., Chen J., Ruta V., Cadene M., Chait B.T., MacKinnon R. // *Nature.* 2003. V. 423. P. 33–41.
44. Long S.B., Tao X., Campbell E.B., MacKinnon R. // *Nature.* 2007. V. 450. P. 376–382.
45. Laine M., Lin M.C., Bannister J.P., Silverman W.R., Mock A.F., Roux B., Papazian D.M. // *Neuron.* 2003. V. 39. P. 467–481.
46. Ruta V., Chen J., MacKinnon R. // *Cell.* 2005. V. 123. P. 463–475.
47. Posson D.J., Ge P., Miller C., Bezanilla F., Selvin P.R. // *Nature.* 2005. V. 436. P. 848–851.
48. Chanda B., Asamoah O.K., Blunck R., Roux B., Bezanilla F. // *Nature.* 2005. V. 436. P. 852–856.
49. Yarov-Yarovoy V., Baker D., Catterall W.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 7292–7297.
50. Campos F.V., Chanda B., Roux B., Bezanilla F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 7904–7909.
51. Grabe M., Lai H.C., Jain M., Jan Y.N., Jan L.Y. // *Nature.* 2007. V. 445. P. 550–553.
52. Lewis A., Jogini V., Blachowicz L., Laine M., Roux B. // *J. Gen. Physiol.* 2008. V. 131. P. 549–561.
53. Pathak M.M., Yarov-Yarovoy V., Agarwal G., Roux B., Barth P., Kohout S., Tombola F., Isacoff E.Y. // *Neuron.* 2007. V. 56. P. 124–140.
54. Khalili-Araghi F., Jogini V., Yarov-Yarovoy V., Tajkhorshid E., Roux B., Schulten K. // *Biophys. J.* 2010. V. 98. P. 2189–2198.
55. Vargas E., Bezanilla F., Roux B. // *Neuron.* 2011. V. 72. P. 713–720.
56. Jensen M.O., Jogini V., Borhani D.W., Leffler A.E., Dror R.O., Shaw D.E. // *Science.* 2012. V. 336. P. 229–233.
57. Yarov-Yarovoy V., DeCaen P.G., Westenbroek R.E., Pan C.Y., Scheuer T., Baker D., Catterall W.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. E93–102.
58. Goldstein S.A., Miller C. // *Biophys. J.* 1992. V. 62. P. 5–7.
59. Gandhi C.S., Isacoff E.Y. // *J. Gen. Physiol.* 2002. V. 120. P. 455–463.
60. Li-Smerin Y., Hackos D.H., Swartz K.J. // *Neuron.* 2000. V. 25. P. 411–423.

61. Schonherr R., Mannuzzu L.M., Isacoff E.Y., Heinemann S.H. // *Neuron*. 2002. V. 35. P. 935–949.
62. Schoppa N.E., McCormack K., Tanouye M.A., Sigworth F.J. // *Science*. 1992. V. 255. P. 1712–1715.
63. Seoh S.A., Sigg D., Papazian D.M., Bezanilla F. // *Neuron*. 1996. V. 16. P. 1159–1167.
64. Aggarwal S.K., MacKinnon R. // *Neuron*. 1996. V. 16. P. 1169–1177.
65. Starace D.M., Stefani E., Bezanilla F. // *Neuron*. 1997. V. 19. P. 1319–1327.
66. Starace D.M., Bezanilla F. // *J. Gen. Physiol.* 2001. V. 117. P. 469–490.
67. Larsson H.P., Baker O.S., Dhillon D.S., Isacoff E.Y. // *Neuron*. 1996. V. 16. P. 387–397.
68. Baker O.S., Larsson H.P., Mannuzzu L.M., Isacoff E.Y. // *Neuron*. 1998. V. 20. P. 1283–1294.
69. Papazian D.M., Shao X.M., Seoh S.A., Mock A.F., Huang Y., Wainstock D.H. // *Neuron*. 1995. V. 14. P. 1293–1301.
70. Tiwari-Woodruff S.K., Schulteis C.T., Mock A.F., Papazian D.M. // *Biophys. J.* 1997. V. 72. P. 1489–1500.
71. Tiwari-Woodruff S.K., Lin M.A., Schulteis C.T., Papazian D.M. // *J. Gen. Physiol.* 2000. V. 115. P. 123–138.
72. Li-Smerin Y., Hackos D.H., Swartz K.J. // *J. Gen. Physiol.* 2000. V. 115. P. 33–50.
73. Gandhi C.S., Clark E., Loots E., Pralle A., Isacoff E.Y. // *Neuron*. 2003. V. 40. P. 515–525.
74. Elinder F., Mannikko R., Larsson H.P. // *J. Gen. Physiol.* 2001. V. 118. P. 1–10.
75. Elinder F., Arhem P., Larsson H.P. // *Biophys. J.* 2001. V. 80. P. 1802–1809.
76. Mannuzzu L.M., Moronne M.M., Isacoff E.Y. // *Science*. 1996. V. 271. P. 213–216.
77. Yusuf S.P., Wray D., Sivaprasadarao A. // *Pflugers Arch.* 1996. V. 433. P. 91–97.
78. Cha A., Ruben P.C., George A.L., Jr., Fujimoto E., Bezanilla F. // *Neuron*. 1999. V. 22. P. 73–87.
79. Glauner K.S., Mannuzzu L.M., Gandhi C.S., Isacoff E.Y. // *Nature*. 1999. V. 402. P. 813–817.
80. Bezanilla F., Perozo E., Stefani E. // *Biophys. J.* 1994. V. 66. P. 1011–1021.
81. Jiang Y., Ruta V., Chen J., Lee A., MacKinnon R. // *Nature*. 2003. V. 423. P. 42–48.
82. Lee S.Y., Lee A., Chen J., MacKinnon R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 15441–15446.
83. Yang N., George A.L., Jr., Horn R. // *Neuron*. 1996. V. 16. P. 113–122.
84. Starace D.M., Bezanilla F. // *Nature*. 2004. V. 427. P. 548–553.
85. Ahern C.A., Horn R. // *J. Gen. Physiol.* 2004. V. 123. P. 205–216.
86. Gonzalez C., Rosenman E., Bezanilla F., Alvarez O., Latorre R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 9617–9623.
87. Durell S.R., Shrivastava I.H., Guy H.R. // *Biophys. J.* 2004. V. 87. P. 2116–2130.
88. Durell S.R., Hao Y., Guy H.R. // *J. Struct. Biol.* 1998. V. 121. P. 263–284.
89. Asamoah O.K., Wuskell J.P., Loew L.M., Bezanilla F. // *Neuron*. 2003. V. 37. P. 85–97.
90. Islas L.D., Sigworth F.J. // *J. Gen. Physiol.* 2001. V. 117. P. 69–89.
91. Bezanilla F. // *Physiol. Rev.* 2000. V. 80. P. 555–592.
92. Jiang Q.X., Wang D.N., MacKinnon R. // *Nature*. 2004. V. 430. P. 806–810.
93. Neale E.J., Elliott D.J., Hunter M., Sivaprasadarao A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 29079–29085.
94. Clayton G.M., Altieri S., Heginbotham L., Unger V.M., Morais-Cabral J.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 1511–1515.
95. Villalba-Galea C.A., Sandtner W., Starace D.M., Bezanilla F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 17600–17607.
96. Bjelkmar P., Niemela P.S., Vattulainen I., Lindahl E. // *PLoS Comput. Biol.* 2009. V. 5. P. e1000289.
97. Vieira-Pires R.S., Morais-Cabral J.H. // *J. Gen. Physiol.* 2010. V. 136. P. 585–592.
98. Broomand A., Elinder F. // *Neuron*. 2008. V. 59. P. 770–777.
99. Chen X., Wang Q., Ni F., Ma J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 11352–11357.
100. Tombola F., Pathak M.M., Gorostiza P., Isacoff E.Y. // *Nature*. 2007. V. 445. P. 546–549.
101. Ramsey I.S., Mokrab Y., Carvacho I., Sands Z.A., Sansom M.S., Clapham D.E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010. V. 17. P. 869–875.
102. Wood M.L., Schow E.V., Freitas J.A., White S.H., Tombola F., Tobias D.J. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. V. 1818. P. 286–293.
103. Horn R., Ding S., Gruber H.J. // *J. Gen. Physiol.* 2000. V. 116. P. 461–476.
104. del Camino D., Kanevsky M., Yellen G. // *J. Gen. Physiol.* 2005. V. 126. P. 419–428.
105. Pathak M., Kurtz L., Tombola F., Isacoff E. // *J. Gen. Physiol.* 2005. V. 125. P. 57–69.
106. Zagotta W.N., Hoshi T., Aldrich R.W. // *J. Gen. Physiol.* 1994. V. 103. P. 321–362.
107. Schmidt D., Jiang Q.X., MacKinnon R. // *Nature*. 2006. V. 444. P. 775–779.
108. Guy H.R., Seetharamulu P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986. V. 83. P. 508–512.
109. Khalili-Araghi F., Jogini V., Yarov-Yarovoy V., Tajkhorshid E., Roux B., Schulten K. // *Biophys. J.* 2010. V. 98. P. 2189–2198.
110. Ahern C.A., Horn R. // *Neuron*. 2005. V. 48. P. 25–29.
111. Freitas J.A., Tobias D.J., White S.H. // *Biophys. J.* 2006. V. 91. P. L90–92.
112. Sands Z.A., Sansom M.S. // *Structure*. 2007. V. 15. P. 235–244.
113. Jogini V., Roux B. // *Biophys. J.* 2007. V. 93. P. 3070–3082.
114. Tao X., Lee A., Limapichat W., Dougherty D.A., MacKinnon R. // *Science*. 2010. V. 328. P. 67–73.
115. Delemotte L., Tarek M., Klein M.L., Amaral C., Treptow W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 6109–6114.
116. Henrion U., Renhorn J., Börjesson S.I., Nelson E.M., Schwaiger C.S., Bjelkmar P., Wallner B., Lindahl E., Elinder F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2012. V. 109. P. 8552–8557.
117. Cole K.S., Moore J.W. // *Biophys. J.* 1960. V. 1. P. 1–14.
118. Lin M.C., Hsieh J.Y., Mock A.F., Papazian D.M. // *J. Gen. Physiol.* 2011. V. 138. P. 155–163.
119. Tao X., MacKinnon R. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. P. 24–33.
120. Madin K., Sawasaki T., Kamura N., Takai K., Ogasawara T., Yazaki K., Takei T., Miura K. I., Endo Y. // *FEBS Lett.* 2004. V. 562. P. 155–159.
121. Jensen M.O., Borhani D.W., Lindorff-Larsen K., Maragakis P., Jogini V., Eastwood M.P., Dror R.O., Shaw D.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 5833–5838.
122. Schwarz T.L., Tempel B.L., Papazian D.M., Jan Y.N., Jan L.Y. // *Nature*. 1988. V. 331. P. 137–142.
123. Zhou Y., Morais-Cabral J.H., Kaufman A., MacKinnon R. // *Nature*. 2001. V. 414. P. 43–48.
124. Berneche S., Roux B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. P. 8644–8648.
125. Vargas E., Yarov-Yarovoy V., Khalili-Araghi F., Catterall W.A., Klein M.L., Tarek M., Lindahl E., Schulten K., Perozo E., Bezanilla F., et al. // *J. Gen. Physiol.* 2012. V. 140. P. 587–594.
126. Delemotte L., Treptow W., Klein M.L., Tarek M. // *Biophys. J.* 2010. V. 99. P. L72–74.
127. Tarek M., Delemotte L. // *Acc. Chem. Res.* 2013. V. 46. P. 2755–2762.