

УДК 577.25

Потенциалчувствительный домен из третьего повтора канала скелетных мышц человека $Na_v1.4$ – новая мишень действия «вольт-сенсорных» токсинов из ядов пауков

М. Ю. Мышкин¹, А. С. Парамонов¹, Д. С. Кульбацкий¹, Е. А. Суркова¹, А. А. Беркут¹,
А. А. Василевский¹, Е. Н. Люкманова^{1,2}, М. П. Кирпичников^{1,2}, З. О. Шенкарев^{1*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

*E-mail: zakhar-shenkarev@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.11.2020

Принята к печати 19.01.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11279

РЕФЕРАТ Потенциалзависимые натриевые каналы (Na_v) имеют модульное строение и содержат пять мембранных доменов. Центральный поровый домен отвечает за проводимость ионов и их селективную фильтрацию, а четыре периферических потенциалчувствительных домена (ПЧД-I/IV) отвечают за активацию и быструю инактивацию канала. «Вольт-сенсорные» токсины из яда членистоногих взаимодействуют с ПЧД, оказывая влияние на активацию и/или инактивацию канала, и могут выступать прообразом новых препаратов для лечения различных каналопатий и болевых синдромов. Токсинсвязывающие сайты, расположенные в ПЧД-I, II и IV Na_v -каналов млекопитающих, описаны ранее. На примере токсина Hm-3 из яда паука *Heriades mellotei* нами показано наличие токсинсвязывающего сайта в ПЧД-III $Na_v1.4$ -канала скелетных мышц человека. Разработана система бесклеточного синтеза белка, позволяющая получать препараты изолированного (отделенного от канала) ПЧД-III и его ¹⁵N-меченого аналога в миллиграммовых количествах. Методом ЯМР-спектроскопии в мембраноподобном окружении мицелл DPC/LDAO (1 : 1) показано, что Hm-3 имеет сравнительно высокое сродство к ПЧД-III (константа диссоциации комплекса $K_d \sim 6$ мкМ), сравнимое со сродством токсина к ПЧД-I и превышающее аффинность токсина к ПЧД-II. При образовании комплекса положительно заряженные остатки Lys25 и Lys28 токсина, по-видимому, взаимодействуют с внеклеточной петлей S1-S2 ПЧД-III. При этом молекула Hm-3 также контактирует с фрагментом липидной мембраны, окружающей канал.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бесклеточный синтез белка, взаимодействие лиганд-рецептор, ЯМР-спектроскопия, натриевые каналы, «вольт-сенсорные» токсины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DPC – додецилфосфолин; LDAO – N,N-диметилдодециламин-N-оксид; Na_v – потенциалзависимый натриевый канал; ПЧД – потенциалчувствительный домен; ПЧД-III – потенциалчувствительный домен из третьего повтора α -субъединицы канала $Na_v1.4$ человека; ТМ – трансмембранный; ТС – трансляционная смесь.

ВВЕДЕНИЕ

Потенциалзависимые Na^+ -каналы (Na_v) – трансмембранные (ТМ) белки, отвечающие за восходящую фазу потенциала действия в возбудимых клетках. Эти каналы состоят из порообразующей α -субъединицы, с которой ассоциированы регуляторные β -субъединицы (рис. 1А). α -Субъединица включает в себя четыре гомологичных повтора (I–

IV), каждый из которых содержит потенциалчувствительный домен (ПЧД, ТМ-сегменты S1–S4) и сегменты S5–S6, формирующие пору канала [1]. β -Субъединицы имеют один ТМ-сегмент и внеклеточный иммуноглобулиновый домен [2]. В геноме человека представлено 10 генов, кодирующих α -субъединицы Na_v , и четыре гена β -субъединиц. Канал $Na_v1.4$ экспрессируется в скелетных мышцах,

и мутации в гене его α -субъединицы (*SCN4A*) приводят к ряду врожденных заболеваний опорно-двигательного аппарата, таких, как миотония, парамитония, гиперкалиемический и гипокалиемический периодический паралич, миастения и миопатия [3].

Na_v являются мишенями для множества нейротоксинов из разных организмов. В ПЧД и поре канала идентифицировано как минимум восемь рецепторных сайтов связывания токсинов [4]. Во внеклеточных петлях ПЧД повторов II и IV идентифицированы два канонических сайта связывания токсинов пауков и скорпионов (рис. 1А) [5]. Токсины, действующие на ПЧД-IV (сайт 3), ингибируют инактивацию канала, а токсины, действующие на ПЧД-II (сайт 4), например, «вольт-сенсорные» токсины пауков, влияют на активацию канала [5]. Несмотря на то что внеклеточные интерфейсы ПЧД-I и III могут быть частично закрыты иммуноглобулиновыми доменами β -субъединиц [6, 7], эти домены, задействованные в активации канала, также могут содержать токсинсвязывающие сайты, доступные при некоторых патофизиологических состояниях. Например, показано [8], что некоторые токсины ингибируют активацию химерного канала $\text{K}_v2.1$, содержащего петли S3–S4 из ПЧД-I или III канала $\text{Na}_v1.2$, и при этом не ингибируют исходный канал $\text{K}_v2.1$. Поиск места связывания нейротоксинов в каналах эукариот методом сайт-направленного мутагенеза затруднен, так как α -субъединица Na_v содержит четыре ПЧД, каждый из которых может принимать участие в формировании отклика на действие токсина.

Ранее мы показали, что основным сайтом связывания токсина Hm-3 из яда паука *Heriades melloteei* в канале $\text{Na}_v1.4$ человека является внеклеточная петля S3–S4 ПЧД-I [9]. Кроме того, Hm-3 взаимодействует с внеклеточной петлей S1–S2 ПЧД-II, но со значительно меньшей аффинностью [10]. Токсин Hm-3 состоит из 35 аминокислотных остатков и при нейтральных pH имеет заряд +4. Вторичная структура Hm-3 включает в себя несколько β -поворотов и β -шпильку, сформированную остатками Cys23–Cys34. Пространственная структура Hm-3 стабилизирована тремя дисульфидными связями, формирующими так называемый «цистиновый узел» [11]. Несколько ароматических остатков образуют на поверхности Hm-3 гидрофобный кластер.

Ранее мы показали, что основным сайтом связывания токсина Hm-3 из яда паука *Heriades melloteei* в канале $\text{Na}_v1.4$ человека является внеклеточная петля S3–S4 ПЧД-I [9]. Кроме того, Hm-3 взаимодействует с внеклеточной петлей S1–S2 ПЧД-II, но со значительно меньшей аффинностью [10]. Токсин Hm-3 состоит из 35 аминокислотных остатков и при нейтральных pH имеет заряд +4. Вторичная структура Hm-3 включает в себя несколько β -поворотов и β -шпильку, сформированную остатками Cys23–Cys34. Пространственная структура Hm-3 стабилизирована тремя дисульфидными связями, формирующими так называемый «цистиновый узел» [11]. Несколько ароматических остатков образуют на поверхности Hm-3 гидрофобный кластер.

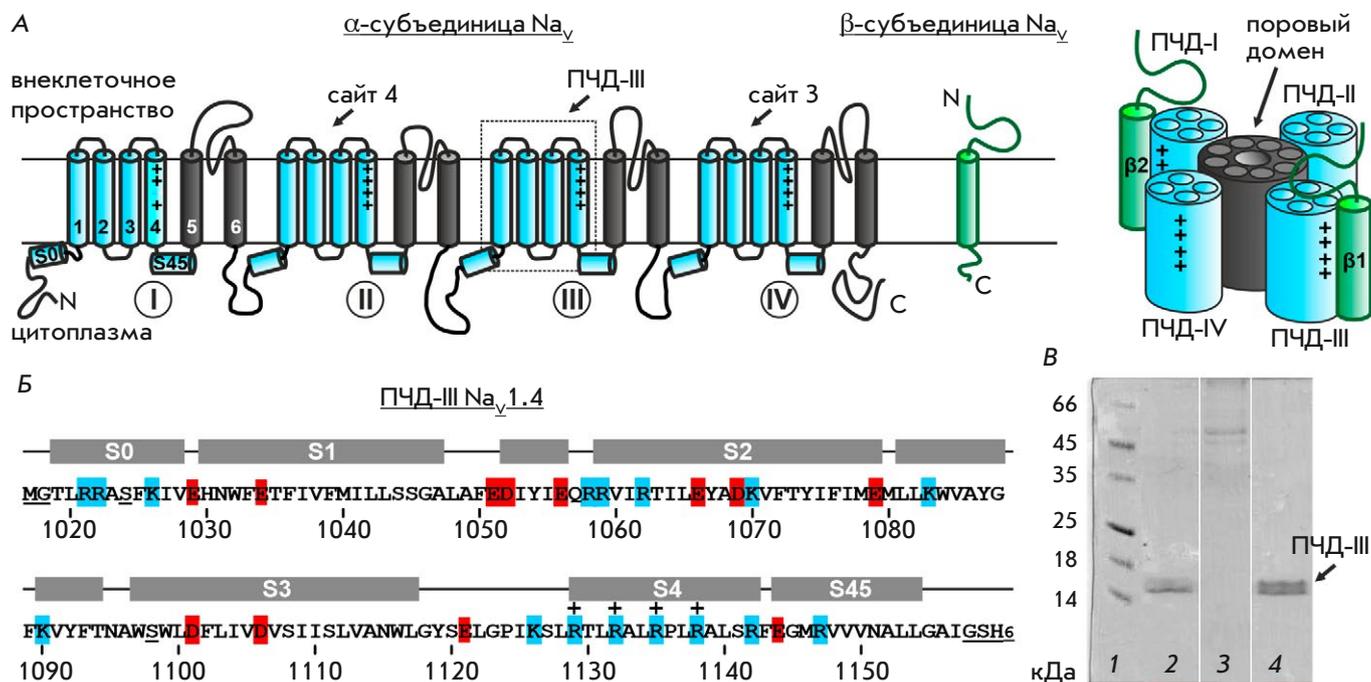


Рис. 1. Схематическое изображение пространственной организации Na_v эукариот в мембране (А). Аминокислотная последовательность варианта ПЧД-III, использованного в работе (Б). Подчеркнуты остатки, искусственно введенные в последовательность. Вторичная структура показана согласно известной пространственной структуре [6] (PDB ID: 6AGF). Отрицательно и положительно заряженные остатки обозначены красным и голубым фоном соответственно. Знаком «+» обозначены положительно заряженные остатки в спирали S4, служащей сенсором потенциала. Очистка образца ПЧД-III на Ni^{2+} -аффинной смоле (В). Дорожки: 1 – маркер молекулярных масс; 2 – растворенный осадок ТС; 3 – промывка колонки; 4 – элюция 500-мМ имидазолом. Молекулярная масса ПЧД-III: 16.3 кДа

стер, поэтому, как и другие «вольт-сенсорные» токсины пауков, Hm-3 имеет сродство к мембранам [11] и, по-видимому, атакует ПЧД из мембраносвязанного состояния. Токсины этого семейства интересны не только как инструменты для структурно-функциональных исследований Na_v , но также могут служить прообразами новых лекарств. Например, Hm-3 способен блокировать аберрантные токи утечки (ω -токи), возникающие в канале $\text{Na}_v1.4$ при мутациях ПЧД-I и II, приводящих к развитию периодического паралича [9, 10].

В представленной работе на примере токсина Hm-3 нами впервые показано наличие токсинсвязывающего сайта в ПЧД-III канала $\text{Na}_v1.4$ человека. С этой целью мы использовали альтернативный подход, основанный на рекомбинантной продукции изолированного (отделенного от канала) ПЧД и анализе сайтов связывания методом ЯМР-спектроскопии. Возможность структурных ЯМР-исследований изолированных ПЧД [12] и их комплексов с токсинами [9, 10] показана ранее.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Изолированный ПЧД-III (остатки 1019–1157, *рис. 1Б*) получали с помощью сопряженной бесклеточной системы синтеза диализного типа на основе экстракта S30 из *Escherichia coli*, используя протоколы, разработанные для других ПЧД [9, 10]. Генетическую конструкцию для синтеза ПЧД-III с С-концевым His6-тагом клонировали в плазмидный вектор pIVEX2.3d, обеспечивающий высокую эффективность бесклеточного синтеза. Последовательность ПЧД-III содержит два остатка Cys, не участвующих в образовании дисульфидных связей. Для уменьшения тенденции к агрегации рекомбинантного домена эти остатки были заменены на Ser (*рис. 1Б*, подчеркнуты). Бесклеточный синтез проводили без добавления мембраномоделирующих компонентов в трансляционную смесь (ТС). При этом синтезированный ПЧД-III накапливался в виде осадка с чистотой более 90% (*рис. 1В*). ^{15}N -меченый аналог ПЧД-III синтезировали с использованием обогащенной изотопом ^{15}N смеси 16 аминокислот (Cortecnet, Лез-Юлис, Франция), полученной из водорослей, и отдельных ^{15}N -меченых аминокислот Asn, Gln и Trp. Цистеин в реакцию синтеза не добавляли, так как использованный в работе вариант ПЧД-III не содержит этой аминокислоты. Выходы препаратов ПЧД-III немеченого и ^{15}N -меченого белка составили 0.5 и 0.35 мг на 1 мл ТС соответственно. Для ЯМР-исследования осадок, содержащий синтезированный ПЧД-III, растворяли в 10% растворе додецилфосфохолина (DPC), очищали с помощью Ni^{2+} -аффинной хроматографии в присутствии 0.5% DPC (*рис. 1В*), переводили в це-

левой буфер (20 mM Трис-ацетат, pH 5.5) и добавляли детергент N,N-диметилдодециламин-N-оксид (LDAO) до молярного соотношения DPC/LDAO 1 : 1. Ранее эту мембраномоделирующую среду применяли для исследования комплексов ПЧД-I и II с токсином Hm-3 [9, 10]. Концентрацию детергентов контролировали по спектрам 1D ^1H -ЯМР. ЯМР-спектры получали на спектрометре AVANCE III 800 (Bruker).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общий вид 2D ^1H , ^{15}N корреляционного ЯМР-спектра ПЧД-III (*рис. 2А*) соответствовал спектрам ПЧД-I и II, полученным ранее [9, 10]. Наблюдаемая небольшая дисперсия сигналов $^1\text{H}^{\text{N}}$ характерна для спиральных ТМ-белков. Однако в спектре наблюдалось не более 90 сигналов HN-групп основной цепи из 130–140 ожидаемых. В соответствующих областях спектра представлены шесть из восьми HN-сигналов остатков Gly и четыре из пяти сигналов HN^{e1} боковых цепей остатков Trp. Отсутствие части сигналов в спектре, а также неоднородная интенсивность и полуширина наблюдаемых сигналов указывают на процессы конформационного обмена в мкс-мс-диапазоне. Эти процессы связаны, вероятно, с пластичностью структуры ПЧД-III и динамикой контактов между ТМ-спиралями. Наблюдаемые уширения сигналов не позволили получить отнесение сигналов ЯМР ПЧД-III, поэтому взаимодействие с Hm-3 исследовали качественно, без картирования сайта связывания в ПЧД.

Образцы немеченого и ^{15}N -меченого Hm-3 получали, используя рекомбинантную продукцию в клетках *E. coli* [9, 11]. Для исследования взаимодействия ПЧД-III/Hm-3 в образец ^{15}N -меченого ПЧД в мицеллах DPC/LDAO поэтапно добавляли немеченый Hm-3 до молярного соотношения ПЧД/токсин 1 : 4. Концентрацию детергентов поддерживали постоянной, чтобы предотвратить изменение в распределении токсина между водной фазой и мицеллами. Согласно полученным ранее данным о взаимодействии Hm-3 с мицеллами DPC/LDAO [9], ~97% молекул токсина в условиях эксперимента были связаны с мицеллами. При добавлении токсина в спектре ПЧД-III наблюдались изменения химических сдвигов и амплитуд некоторых сигналов (*рис. 2Б*). Эти изменения указали на специфическое взаимодействие ПЧД/токсин. Обратимый процесс образования-диссоциации комплекса ПЧД/Hm-3 идет с характерным временем в мкс-мс-диапазоне, и для разных сигналов ПЧД этот обменный процесс является либо быстрым, либо промежуточным (по шкале времен ЯМР). Константу диссоциации комплекса определили путем аппроксимации зависимости химического сдвига сигналов ПЧД-III от концентрации Hm-3

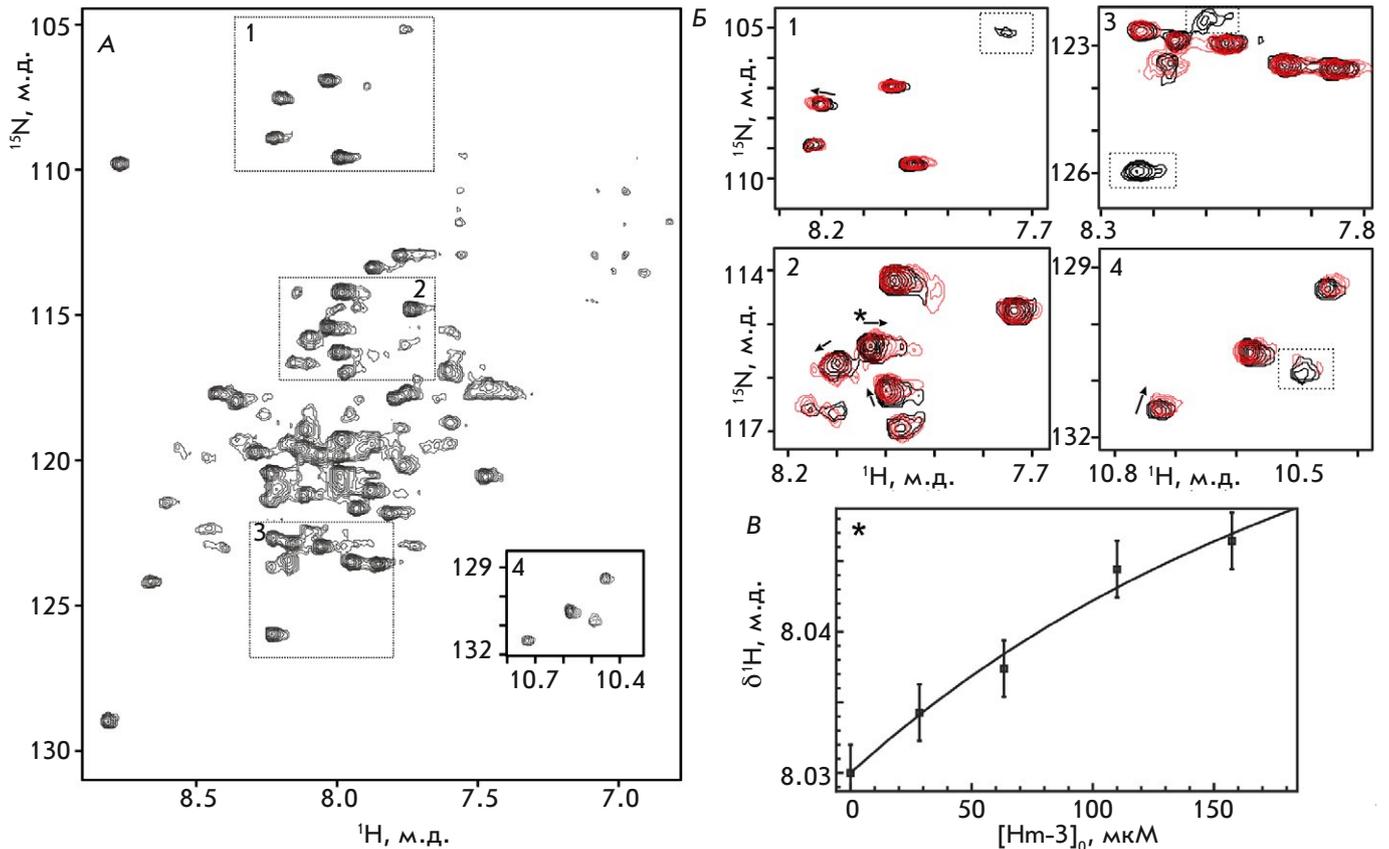


Рис. 2. ЯМР-исследование взаимодействия ^{15}N -меченого ПЧД-III с немеченым Hm-3. А – 2D ^1H , ^{15}N -TROSY-спектр 43 μM ПЧД-III в мицеллах DPC/LDAO (45/45 мМ, 800 МГц, рН 5.5, 45°C). Б – наложение фрагментов спектров ПЧД-III, полученных без Hm-3 (черные контуры) и после добавления 160 μM Hm-3 (красные контуры). Стрелками показано направление изменения положения сигналов. Пунктирными линиями обозначены сигналы, «исчезающие» при добавлении токсина. В – изменение ^1H химического сдвига HN-сигнала при 8.03/115.4 м.д. (показан звездочкой на панели Б2) аппроксимировано уравнением, описывающим связывание в присутствии избытка мицелл детергента

(рис. 2В), учитывая вклад взаимодействия Hm-3/мицелла [9]. Полученное значение (5.8 ± 3.8 μM) соответствовало константе диссоциации комплекса ПЧД-I/Hm-3 (6.2 ± 0.6 μM) [9] и было меньше значения для комплекса с ПЧД-II (~ 11 μM) [10], что указывает на более сильное взаимодействие токсина с ПЧД-I и ПЧД-III.

Обратное титрование, когда к образцу ^{15}N -меченого Hm-3 добавляли немеченый ПЧД-III, показало, что положительно заряженные остатки Lys25 и Lys28, находящиеся в β -шпильке токсина, а также остаток Phe12, заглубленный в гидрофобную область мицеллы, принимают участие в образовании комплекса с ПЧД (рис. 3). Этот сайт связывания совпадает с сайтами, ответственными за взаимодействие Hm-3 с ПЧД-I и II [9, 10]. В ходе этих более ранних исследований показано, что пара заряженных остатков Hm-3 – Lys25 и Lys28 – способна специфически взаимодействовать со спиральными мотивами, со-

держащими два отрицательно заряженных остатка (Asp или Glu), разделенных двумя или тремя незаряженными остатками. В последовательности ПЧД-III такие мотивы встречаются только во внеклеточной петле S1–S2 и в ТМ-части спирали S2 (рис. 1Б). Однако, согласно известной пространственной структуре канала $\text{Na}_v1.4$ человека [6], остатки Glu1066 и Asp1069 расположены глубоко в трансмембранной части спирали S2, а их боковые цепи обращены внутрь молекулы ПЧД-III. Учитывая амфипатические свойства Hm-3 [11], мы предполагаем, что токсин не может погружаться глубоко в мембрану и взаимодействовать с этими остатками. В то же время боковые цепи остатков Glu1051, Asp1052 и Glu1056, расположенных в петлевом участке S1–S2, доступны растворителю и могут взаимодействовать с молекулой Hm-3, связанной с поверхностью мембраны.

Напротив, другая внеклеточная петля ПЧД-III – S3–S4 – содержит только один отрицательно заря-

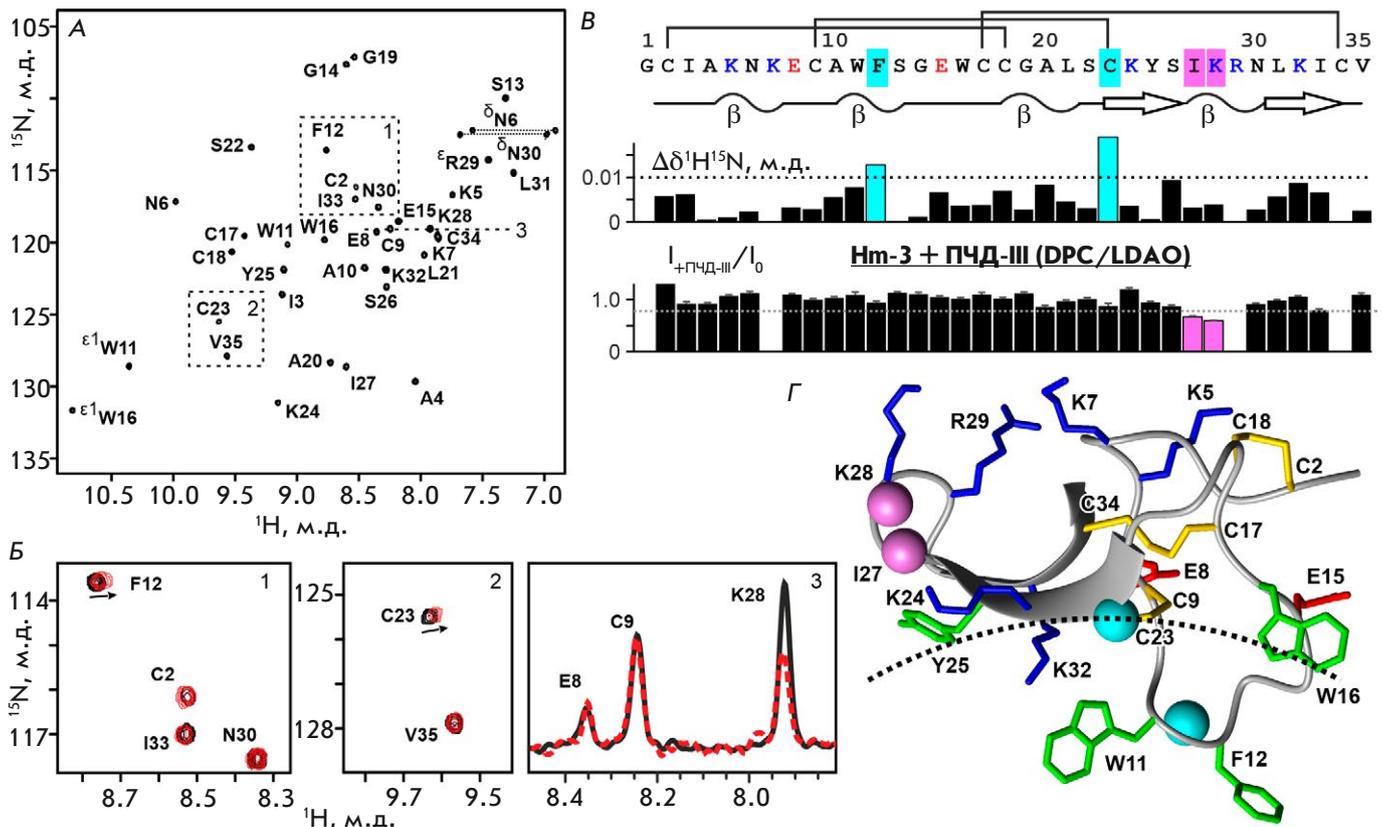


Рис. 3. ЯМР-исследование взаимодействия ^{15}N -меченого Hm-3 с немеченым ПЧД-III. А – 2D ^1H , ^{15}N -HSQC-спектр 30 мкМ Hm-3 в мицеллах DPC/LDAO (45/45 мМ, 800 МГц, pH 5.5, 45°C). Б – наложение фрагментов спектров Hm-3, полученных без ПЧД-III (черные контуры/линии) и после добавления 40 мкМ ПЧД-III (красные контуры/линии, конечное соотношение ПЧД-III/Hm-3 3 : 2). Стрелками показано направление изменения положения сигналов. На панели Б3 показано селективное уменьшение амплитуды сигнала Lys28 при добавлении ПЧД-III. В, Г – первичная, вторичная и пространственная структуры токсина Hm-3 [11] (PDB ID: 2MQU), а также изменение химических сдвигов и амплитуд сигналов Hm-3 при добавлении ПЧД-III. Показаны положительно и отрицательно заряженные остатки и дисульфидные мостики. Остатки, для которых наблюдаются значительные изменения, выделены фоном (Б) и обозначены шариками (Г). Пунктирной линией изображена поверхность мицеллы детергента [9]

женный остаток Glu1121 и, вероятно, не может выступать в качестве сайта связывания токсина Hm-3. Это согласуется с результатами предыдущего исследования химерного канала $\text{K}_v2.1$, содержащего петлю S3–S4, пересаженную из ПЧД-III канала $\text{Na}_v1.4$, в ходе которого не выявлено значимого взаимодействия с токсином Hm-3 [9]. Таким образом, полученные данные указывают на то, что внеклеточная петля S1–S2 ПЧД-III канала $\text{Na}_v1.4$ человека содержит сайт, способный взаимодействовать с «вольт-сенсорными» токсинами пауков. Следует отметить, что исследование токсинсвязывающих сайтов, которые располагаются на участке S1–S2 ПЧД каналов Na_v , с помощью химерных каналов, по-видимому, невозможно. Попытки пересаживать петли S1–S2 из различных каналов в $\text{K}_v2.1$ приводили к нефункциональным химерам [13].

Разработанная в настоящей работе система бесклеточного синтеза ПЧД-III позволит в дальнейшем исследовать взаимодействие домена и с другими токсинами, а также может быть использована для скрининга прототипов лекарственных препаратов, селективно взаимодействующих с ПЧД-III. Предложенный метод исследования фармакологических свойств изолированных ПЧД каналов Na_v с использованием спектроскопии ЯМР имеет преимущество перед методами, основанными на исследовании химерных каналов, так как позволяет, во-первых, картировать остатки токсинов, важные для взаимодействия с доменами, а во-вторых, изучать токсинсвязывающие сайты, которые располагаются не только в петле S3–S4, но и на участке S1–S2. ●

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-14-10338.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Catterall W.A. // *J. Physiol.* 2012. V. 590. P. 2577–2589.
2. O'Malley H.A., Isom L.L. // *Annu. Rev. Physiol.* 2015. V. 77. P. 481–504.
3. Cannon S.C. // *Handbook Exp. Pharmacol.* 2018. V. 246. P. 309–330.
4. Xu L., Ding X., Wang T., Mou S., Sun H., Hou T. // *Drug Discov. Today.* 2019. V. 24. P. 1389–1397.
5. Stevens M., Peigneur S., Tytgat J. // *Front. Pharmacol.* 2011. V. 2. P. 71.
6. Pan X., Li Z., Zhou Q., Shen H., Wu K., Huang X., Chen J., Zhang J., Zhu X., Lei J., et al. // *Science.* 2018. V. 362. P. eaau2486.
7. Shen H., Liu D., Wu K., Lei J., Yan N. // *Science.* 2019. V. 363. P. 1303–1308.
8. Bosmans F., Martin-Eauclaire M.F., Swartz K.J. // *Nature.* 2008. V. 456. P. 202–208.
9. Männikkö R., Shenkarev Z.O., Thor M.G., Berkut A.A., Myshkin M.Y., Paramonov A.S., Kulbatskii D.S., Kuzmin D.A., Sampedro Castañeda M., King L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. P. 4495–4500.
10. Myshkin M.Y., Männikkö R., Krumkacheva O.A., Kulbatskii D.S., Chugunov A.O., Berkut A.A., Paramonov A.S., Shulepko M.A., Fedin M.V., Hanna M.G., et al. // *Front. Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 953.
11. Berkut A.A., Peigneur S., Myshkin M.Y., Paramonov A.S., Lyukmanova E.N., Arseniev A.S., Grishin E.V., Tytgat J., Shenkarev Z.O., Vassilevski A.A. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. P. 492–504.
12. 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. P. 5630–5637.
13. Alabi A., Bahamonde M., Jung H., Kim J.I., Swartz K.J. // *Nature.* 2007. V. 450. P. 370–375.