

## ОБРАЗОВАНИЕ ГЕТЕРОТРАМЕРНЫХ КАЛИЕВЫХ КАНАЛОВ Kv1.1–Kv1.2 В КЛЕТКАХ NEURO-2A: АНАЛИЗ МЕТОДОМ ФЁРСТЕРОВСКОГО РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ

© 2025 г. А.В. Ефременко\*, О.В. Некрасова\*, А.В. Феофанов\*, \*\*, #

\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, ул. Миклухо-Маклая, 16/10, Москва, 117997, Россия

\*\*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

#E-mail: avfeofanov@yandex.ru

Поступила в редакцию 12.12.2024 г.

После доработки 12.12.2024 г.

Принята к публикации 18.12.2024 г.

Субъединицы потенциал-зависимых калиевых каналов Kv1.1 и Kv1.2 могут формировать в клетках как гомо-, так и гетеротетрамерные каналы, функциональные свойства и локализация которых значительно отличаются. Методом конфокальной микроскопии на основе фёрстеровского резонансного переноса энергии проведено исследование образования Kv1-каналов при совместной экспрессии в клетках нейробластомы мыши Neuro-2a субъединиц Kv1.1(S369T) и Kv1.2(S371T), слитых соответственно с флуоресцентным белком mKate2 и TagCFP и обладающих благодаря мутации усиленным выносом на мембрану. Установлено, что TagCFP-Kv1.1(S369T) и mKate2-Kv1.2(S371T) эффективно формируют гетероканалы, которые локализуются как на мемbrane, так и в цитоплазме клеток. При отсутствии мутации S369T гетероканалы в мембрану не встраиваются, что указывает на необходимость вспомогательных факторов для переноса нативных гетероканалов в мембрану клеток. Помимо гетероканалов в клетках Neuro-2a формируются и гомотетрамерные каналы, но эффективность образования гетероканалов намного выше.

**Ключевые слова:** калиевые каналы, потенциал-зависимые гетеротетрамеры, фёрстеровский резонансный перенос энергии, конфокальная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302925010098, EDN: LWZIFK

Представители семейства потенциал-зависимых калиевых Kv1-каналов Kv1.1 и Kv1.2 важны для нормального функционирования Т-лимфоцитов,  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, клеток гладкой мускулатуры сосудов, периферической нервной системы и головного мозга [1–6]. Каналы Kv1.1 и Kv1.2 формируются путем сборки четырех одинаковых  $\alpha$ -субъединиц в гомотетрамерные структуры. В то же время субъединицы Kv1.1 и Kv1.2 могут объединяться в гетеротетрамерные каналы (в том числе и с другими близкородственными  $\alpha$ -субъединицами из семейства Kv1) с разным соотношением двух типов субъединиц [1, 7]. Гетеротетрамеризация с участием субъединиц Kv1.1 и Kv1.2 влияет как на активность каналов, так и на их субклеточное распределение [1, 7].

Показано, что вспомогательные бета-субъединицы Kv $\beta$ 1 и Kv $\beta$ 2, взаимодействуя с каналами

Kv1, способствуют их переносу в мембрану клеток млекопитающих, а также обеспечивают направленный транспорт в аксоны в нейронах [8, 9]. Субъединичный состав гетероканалов, содержащих Kv1.2, также является важным фактором мембранныго транспорта. Гетеротетрамеризация  $\alpha$ -субъединиц Kv1.2 и Kv1.4 способствует мембранный экспрессии каналов, в то время как субъединица Kv1.1 оказывает доминантно-негативное влияние на мембранные нацеливание канала Kv1.2 [8].

В то же время при гетерологической экспрессии в клетках млекопитающих гомотетрамерные каналы Kv1.1 и Kv1.2, эффективно собираясь в эндоплазматическом ретикулуме, слабо транспортируются в плазматическую мембрану [10–13], что значительно затрудняет их исследования на клетках в культуре. Ранее, используя данные о мутациях, которые усиливают вынос каналов Kv1.1 и Kv1.2 на мембрану [12, 13], нами были созданы химерные белки, содержащие в своем

Сокращения: FRET – фёрстеровский резонансный перенос энергии, ПЦР – полимеразная цепная реакция.

составе  $\alpha$ -субъединицу Kv1.1 или Kv1.2 с единичной заменой S369T (для Kv1.1) или S371T (для Kv1.2), слитую с флуоресцентным белком TagCFP или mKate2 [14, 15]. Эти химерные белки формируют функционально активные каналы, которые эффективно транспортируются в мембрану клеток, а их флуоресценция обеспечивает возможность исследования каналов методами флуоресцентной микроскопии [14, 15].

В данной работе методом флуоресцентной конфокальной микроскопии на основе фёрстетровского резонансного переноса энергии (FRET) исследуется способность флуоресцирующих химерных белков mKate2-Kv1.1 и TagCFP-Kv1.2 формировать в клетках нейробластомы мыши Neuro-2a гетероканалы, а также взаимное влияние субъединиц Kv1.1 и Kv1.2 на мембранные локализацию этих каналов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды для экспрессии в клетках эукариот белковых конструкций mKate2-Kv1.1 и mKate2-Kv1.1wt получали, как описано ранее [14].

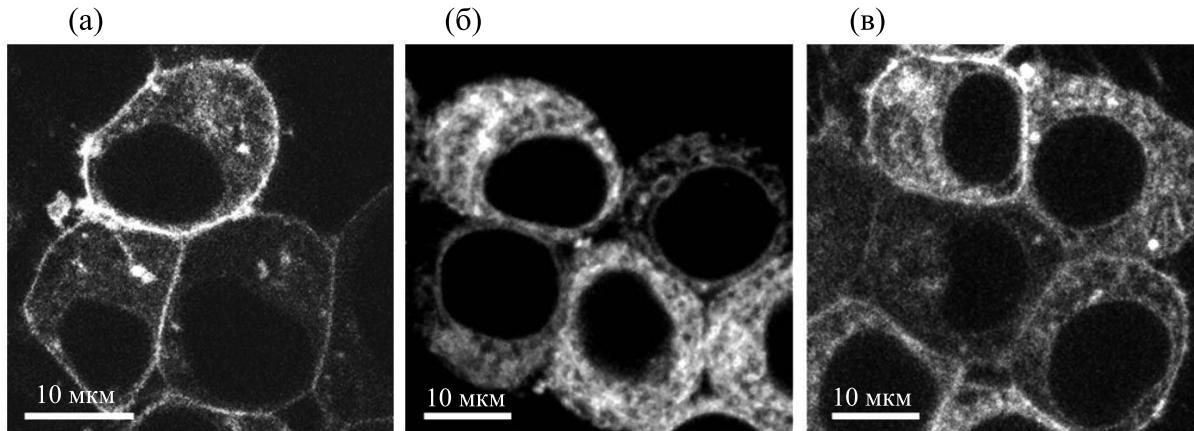
Для получения плазмида, кодирующей  $\alpha$ -субъединицу канала Kv1.2 человека, слитую с флуоресцирующим белком TagCFP, использовали полученную ранее плазмиду pmKate2-KCNA2, кодирующую эту субъединицу, слитую с флуоресцирующим белком mKate2 (mKate2-Kv1.2) [15]. В этом белке последовательности белка mKate2, занимающего N-концевое положение, и  $\alpha$ -субъединицы Kv1.2 разделены полипептидным линкером L1 (GGGGS-GLRS), а в структуре  $\alpha$ -субъединицы Kv1.2 содержится единичная замена S371T, способствующая более эффективному переносу канала в клеточную мембрану. Для получения аналогичной генетической конструкции TagCFP-Kv1.2, которая содержит на N-конце голубой флуоресцентный белок TagCFP, методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) был получен ген белка TagCFP. В ПЦР в качестве матрицы использовали плазмиду pTagCFP-C («Евроген», Россия), амплификацию гена проводили с помощью следующих олигонуклеотидных праймеров: прямой 5'-TTCTTCGCTAGCGCTAC-CGGTCGCCACC-3' (C-f1) и обратный 5'-TCTAGATCTGAGTCCAGACCCTCGCCACCGC-GGTACAGCTCGCCA-3' (C-r1). В структуре праймеров подчеркнуты сайты рестрикции NheI и BglII, по которым проводилось克隆ирование, а в праймере C-r1 жирным шрифтом обозначен участок ДНК, кодирующий линкер L1. В результате克隆ирования полученного ПЦР-фрагмента ДНК в плазмиду pmKate2-KCNA2 по сайтам рестрикции NheI и BglII была получена плазмода pTagCFP-KCNA2, кодирующая белок TagCFP-Kv1.2. Нуклеотидная последовательность целевого гена в составе плазмиды pTagCFP-KCNA2 подтверждена секвенированием («Евроген», Россия).

Клетки нейробластомы мыши Neuro-2a были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия) и культивировались, как описано ранее [14]. Трансфекцию клеток плазмидами проводили с помощью реагента GenJector-U (Molesta, Москва, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Со-трансфекцию двумя плазмидами выполняли, смешивая их в соотношении 1 : 1. Клетки к измерениям готовили, как описано ранее [14–16].

Исследования методом конфокальной микроскопии проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа SP2 (Leica Microsystems GmbH, Германия) с водоиммерсионным объективом 63 $\times$  (HCX PL APO, NA = 1.2). Разрешение в осевом и поперечном направлениях составляло 0.6 и 0.2 мкм. Флуоресценцию TagCFP-Kv1.2 возбуждали светом с длиной волны ( $\lambda_{возб}$ ) 458 нм и регистрировали в диапазоне 470–570 нм. Для прямого возбуждения флуоресценции mKate2-Kv1.1 и mKate2-Kv1.1wt использовали  $\lambda_{возб} = 561$  нм, а сигнал регистрировали в диапазоне 680–750 нм. Во FRET-экспериментах флуоресценцию возбуждали с  $\lambda_{возб} = 458$  нм, а регистрировали в двух диапазонах – 470–570 нм (сигнал TagCFP) и 680–750 нм (сигнал mKate2 в результате FRET).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для изучения формирования в клетках млекопитающих гетеротетрамерных каналов  $\alpha$ -субъединицами Kv1.1 и Kv1.2 нами были использованы химерные белки mKate2-Kv1.1, mKate2-Kv1.1wt и TagCFP-Kv1.2, транзиентно экспрессируемые в клетках Neuro-2a с помощью кодирующих их плазмид. Эти химерные белки на N-конце содержат флуоресцирующий белок TagCFP или mKate2, слитый с соответствующей  $\alpha$ -субъединицей канала через полипептидный линкер GG-GGSLRS. Поскольку ранее было установлено, что экспрессируемые в клетках  $\alpha$ -субъединицы Kv1.1 или Kv1.2 человека с природной аминокислотной последовательностью, а также соответствующие химерные белки очень слабо выносятся в составе гомотетрамерных каналов на плазматическую мембрану [10–15], в  $\alpha$ -субъединицы Kv1.1 и Kv1.2 были соответственно введены единичные замены S369T и S371T, способствующие эффективному переносу гомотетрамерных каналов (в том числе и в составе белковых химер TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1) в клеточную мембрану [12–15]. В химере mKate2-Kv1.1wt природная аминокислотная последовательность Kv1.1 была сохранена. Как показано ранее, химерные белки, содержащие Kv1.1 или Kv1.2 с указанными единичными заменами, полностью сохраняют спо-



**Рис. 1.** Конфокальные флуоресцентные изображения клеточного распределения каналов TagCFP-Kv1.2 ( $\lambda_{\text{возб}} = 458$  нм) (а) и mKate2-Kv1.1 ( $\lambda_{\text{возб}} = 561$  нм) (б, в) в клетках Neuro-2a через 24 ч (а, б) и 48 ч (в) после трансфекции клеток соответствующими плазмидами.

собность к образованию функционально-активных гомотетрамерных каналов [14, 15].

В согласии с ранее полученными результатами [14, 15] TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1 эффективно экспрессируются в клетках и встраиваются в плазматическую мембрану соответственно через 24 и 48 ч после трансфекции, на что указывает яркая флуоресценция на границах клеток (рис. 1а,в). При этом через 24 ч после трансфекции mKate2-Kv1.1 преимущественно локализован в цитоплазме, а его присутствие в плазматической мембране незначительно (рис. 1б).

Способность  $\alpha$ -субъединиц Kv1.1 или Kv1.2 образовывать гетеротетрамерные каналы была изучена нами методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии на основе FRET в условиях совместной экспрессии в клетках TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1 или TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1wt. Условия измерения эффекта FRET и диапазоны регистрации флуоресценции были подобраны так, чтобы при возбуждении TagCFP-Kv1.2 ( $\lambda_{\text{возб}} = 458$  нм) его сигнал не перекрывался с диапазоном регистрации сигнала mKate2-Kv1.1 (рис. 2а,б), а прямое возбуждение mKate2-Kv1.1 при длине волны 458 нм не происходило (рис. 2г,д). Таким образом, появление флуоресценции mKate2-Kv1.1 при  $\lambda_{\text{возб}} = 458$  нм в условиях со-экспрессии TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1 однозначно соответствует сигналу FRET и указывает на образование гетероканалов.

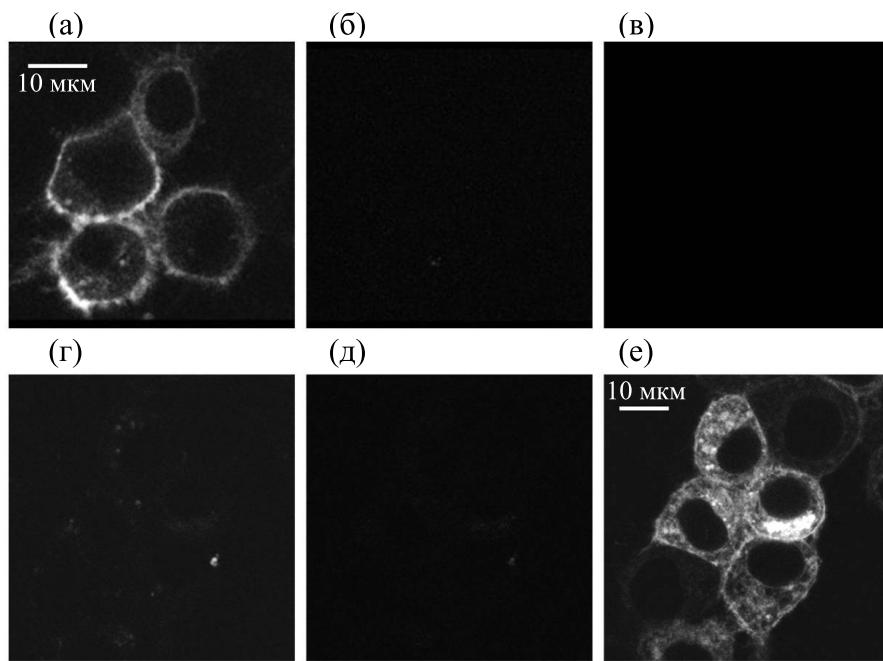
При совместной экспрессии в клетках TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1 через 24 ч после трансфекции в клетках наблюдается появление сигнала FRET, подтверждающего образование гетероканалов, содержащих субъединицы двух типов, Kv1.2 и Kv1.1 (рис. 3б). В 85–90% трансфицированных клеток гетероканалы распределены как в

цитоплазме, так и в плазматической мемbrane (рис. 3б). В 10–15% трансфицированных клеток доминирует либо мембранная, либо цитоплазматическая локализация гетероканалов.

Хотя через 24 ч после трансфекции сам по себе mKate2-Kv1.1 слабо экспрессируется в плазматической мембране (рис. 1б), при со-трансфекции с TagCFP-Kv1.2 присутствие mKate2-Kv1.1 в мембране резко увеличивается (рис. 3в). Это свидетельствует об усилении транспорта mKate2-Kv1.1 в мембрану, вероятнее всего, в составе гетероканалов. По-видимому, субъединица Kv1.2, содержащая мутацию S371T, обладает очень сильным сигналом, направляющим ее транспорт в мембрану, и этот сигнал доминирует в составе гетероканалов. Таким образом, флуоресценция mKate2-Kv1.1 в мембране клеток через 24 ч после со-трансфекции с TagCFP-Kv1.2 сама по себе характеризует мембранные распределение гетероканалов. Относительные интенсивности сигнала FRET и флуоресценции mKate2-Kv1.1 в мембране клеток не совпадают. Относительная интенсивность флуоресценции mKate2-Kv1.1 доминирует во многих участках плазматической мембраны, указывая на локализацию гетероканалов, эффективность FRET в которых низкая (рис. 3д).

Сравнение относительных интенсивностей флуоресценции mKate2-Kv1.1 и TagCFP-Kv1.2 при со-экспрессии данных белковых конструкций показывает, что распределение обеих субъединиц в клетках сходно, но есть отдельные области мембраны и отдельные цитоплазматические структуры, в которых доминирует та или другая субъединица (рис. 3е). Закономерность распределения таких областей и структур пока не ясна.

В согласии с ранее полученными данными [14]  $\alpha$ -субъединица Kv1.1, имеющая нативную амино-



**Рис. 2.** Анализ методом конфокальной микроскопии распределения флуоресценции в клетках, экспрессирующих TagCFP-Kv1.2 (а–в) или mKate2-Kv1.1 (г–е) при  $\lambda_{\text{возб}} = 458$  нм (а, б, г, д) или  $\lambda_{\text{возб}} = 561$  нм (в, е) в диапазонах длин волн 470–570 нм (а, г) и 680–750 нм (б, в, д, е). При возбуждении TagCFP-Kv1.2 (а) его флуоресценция не регистрируется в диапазоне 680–750 нм (б). Прямое возбуждение флуоресценции mKate2-Kv1.1 при длине волны 458 нм не происходит (г, д).

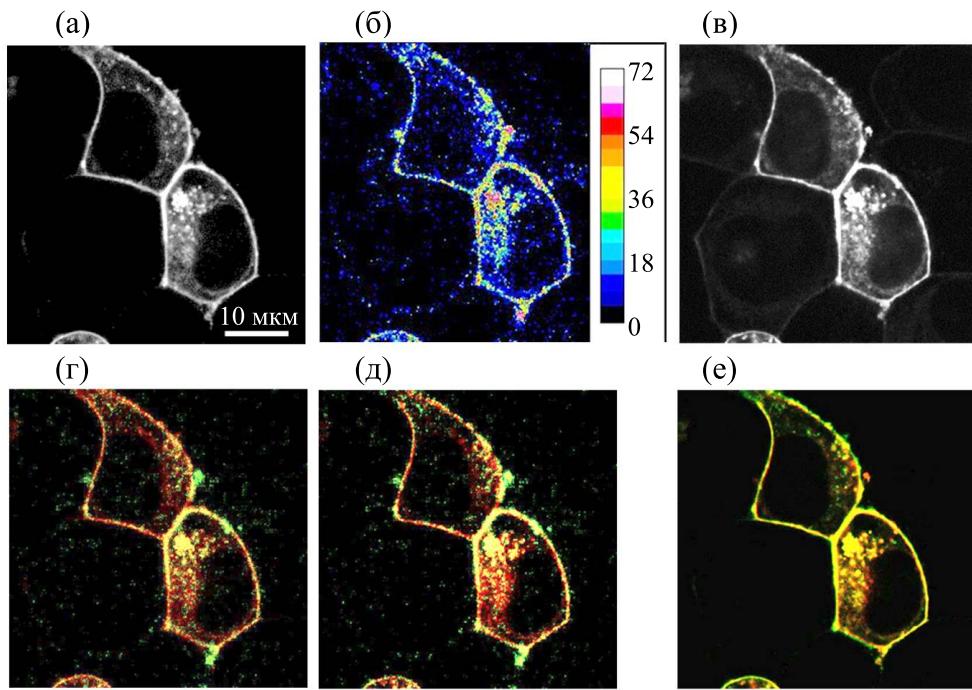
кислотную последовательность, в составе химерного белка mKate2-Kv1.1wt не экспрессируется на плазматической мемbrane клеток Neuro-2a ни через 24 ч, ни через 48 ч после трансфекции (рис. 4). В условиях со-экспрессии в клетках TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1wt мы изучили способность субъединицы Kv1.2, содержащей мутацию S371T, способствовать выносу mKate2-Kv1.1wt в составе гетероканала на плазматическую мембрану (рис. 5). Обнаружено, что при со-экспрессии TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1wt субъединица mKate2-Kv1.1wt распределяется в цитоплазме, а ее сигнал на мембране отсутствует (рис. 5в). При этом флуоресценция TagCFP-Kv1.2 доминирует в цитоплазме, а ее относительная интенсивность на мембране значительно слабее (рис. 5а), чем в случае со-экспрессии TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1 (рис. 3) или экспрессии только TagCFP-Kv1.2 (рис. 1а). Измерены отношения интенсивности мембранный флуоресценции к общей интенсивности флуоресценции TagCFP-Kv1.2 (без учета области ядра) в клетках, экспрессирующих TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1wt или только TagCFP-Kv1.2. При со-экспрессии двух  $\alpha$ -субъединиц это отношение снижается в 3.7 раза. Сигнал FRET, указывающий на образование гетероканалов, локализован только в цитоплазме (рис. 5б). Это позволяет заключить, что гетероканалы, содержащие субъединицы mKate2-Kv1.1wt и TagCFP-Kv1.2, на мембрану не выносятся, а присут-

ствует на мембране небольшая фракция гомотетрамерных каналов Kv1.2.

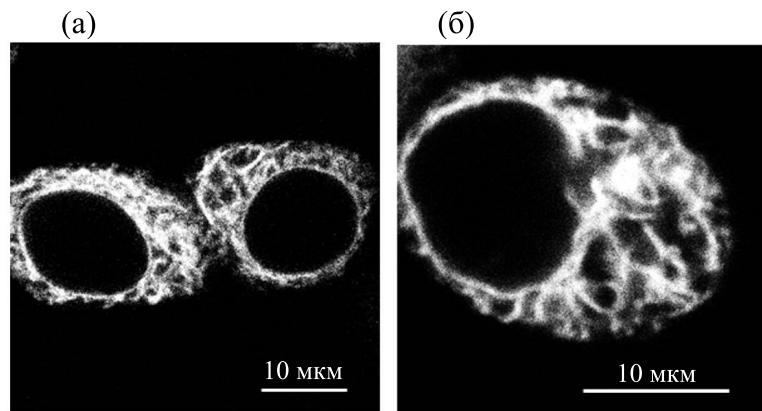
## ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Согласно полученным результатам,  $\alpha$ -субъединицы Kv1.2 и Kv1.1 в составе разработанных нами флуоресцирующих белковых конструкций TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1 сохраняют способность к образованию не только гомо-, но и гетеротетрамерных каналов. Образование таких гетероканалов в клетках Neuro-2a идет очень эффективно, и они хорошо переносятся из эндоплазматического ретикулума в плазматическую мембрану. В небольшой фракции клеток мембранные локализация гетероканалов является доминирующей, но во многих клетках значительная часть гетероканалов остается и в цитоплазме (рис. 3). Возможно, это связано с различной интенсивностью биосинтеза и неспособностью механизмов транспорта обеспечить перенос всех каналов в мембрану, если биосинтез идет слишком интенсивно, или же с эффектом насыщения мембраны каналами и наличием отрицательной обратной связи, останавливающей транспорт каналов из эндоплазматического ретикулума в мембрану.

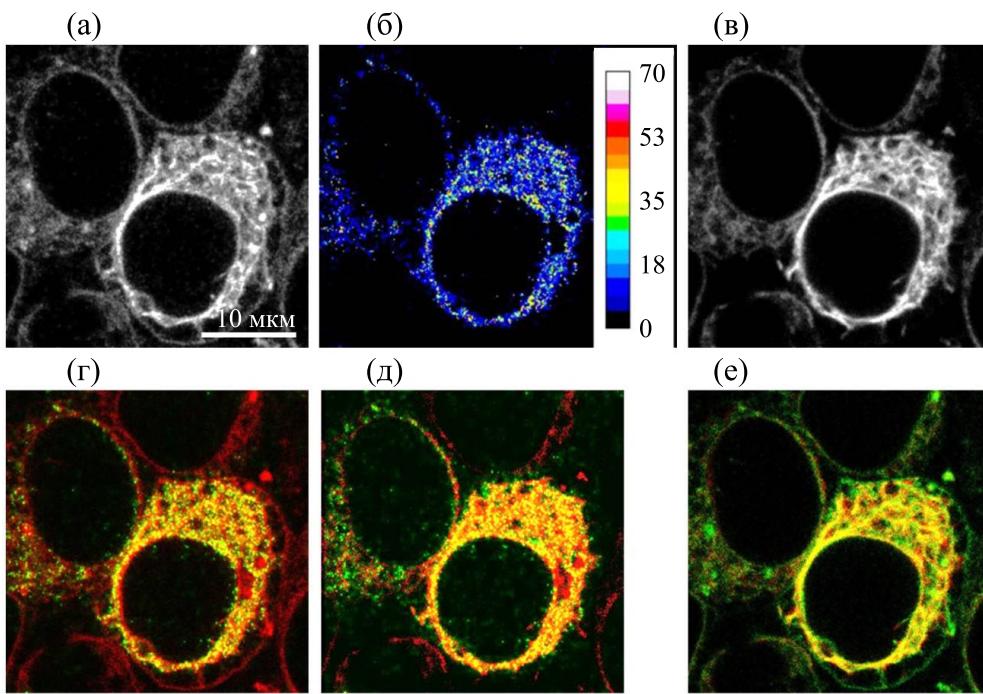
Образование гетероканалов Kv1.2/Kv1.1 само по себе не является сигналом для их переноса в мембрану. Как показали наши эксперименты,



**Рис. 3.** Анализ методом конфокальной FRET-микроскопии распределения TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1 в клетках Neuro-2a при их совместной экспрессии через 24 ч после трансфекции. (а) – Распределение в клетках флуоресценции TagCFP-Kv1.2 при  $\lambda_{возб} = 458$  нм. (б) – Распределение в клетках сигнала FRET, который характеризует локализацию гетероканалов, содержащих в своем составе субъединицы TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1. Изображение получено при  $\lambda_{возб} = 458$  нм и регистрации флуоресценции в диапазоне 680–750 нм. Шкала интенсивности отображает интенсивность флуоресценции в абсолютных значениях. (в) – Распределение в клетках флуоресценции mKate2-Kv1.1 при прямом возбуждении  $\lambda_{возб} = 561$  нм. (г) – Наложение распределений флуоресценции TagCFP-Kv1.2 (красный цвет) и сигнала FRET (зеленый цвет), характеризующее относительное распределение субъединиц TagCFP-Kv1.2 и гетероканалов. (д) – Наложение распределений флуоресценции mKate2-Kv1.1 (красный цвет) и сигнала FRET (зеленый цвет), характеризующее относительное распределение субъединиц mKate2-Kv1.1 и гетероканалов. (е) – Наложение распределений флуоресценции mKate2-Kv1.1 (красный цвет) и TagCFP-Kv1.2 (зеленый цвет), характеризующее относительное распределение субъединиц mKate2-Kv1.1 и TagCFP-Kv1.2. Желтый цвет на изображениях (г–е) соответствует областям с близкими по яркости зеленым и красным цветами.



**Рис. 4.** Конфокальные флуоресцентные изображения клеточного распределения субъединицы mKate2-Kv1.1wt в клетках Neuro-2a через 24 ч (а) и 48 ч (б) после трансфекции клеток ( $\lambda_{возб} = 561$  нм).



**Рис. 5.** Анализ методом конфокальной FRET-микроскопии распределения TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1wt в клетках Neuro-2a при их совместной экспрессии. (а) – Распределение в клетках флуоресценции TagCFP-Kv1.2 при  $\lambda_{\text{возб}} = 458$  нм. (б) – Распределение в клетках сигнала FRET, который характеризует локализацию гетероканалов, содержащих в своем составе субъединицы TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1wt. Изображение получено при  $\lambda_{\text{возб}} = 458$  нм и регистрации флуоресценции в диапазоне 680–750 нм. Шкала интенсивности отображает интенсивность флуоресценции в абсолютных значениях. (в) – Распределение в клетках флуоресценции mKate2-Kv1.1wt при прямом возбуждении  $\lambda_{\text{возб}} = 561$  нм. (г) – Наложение распределений флуоресценции TagCFP-Kv1.2 (красный цвет) и сигнала FRET (зеленый цвет), характеризующее относительное распределение субъединиц TagCFP-Kv1.2 и гетероканалов. (д) – Наложение распределений флуоресценции mKate2-Kv1.1wt (красный цвет) и сигнала FRET (зеленый цвет), характеризующее относительное распределение субъединиц mKate2-Kv1.1wt и гетероканалов. (е) – Наложение распределений флуоресценции mKate2-Kv1.1wt (красный цвет) и TagCFP-Kv1.2 (зеленый цвет), характеризующее относительное распределение субъединиц mKate2-Kv1.1wt и TagCFP-Kv1.2. Желтый цвет на изображениях (г–е) соответствует областям с близкими по яркости зеленым и красным цветами.

наличие в составе гетероканала субъединицы Kv1.1 с нативной аминокислотной последовательностью (mKate2-Kv1.1wt), которая очень плохо выносится на мембрану в составе гомотетрамерных каналов Kv1.1 (рис. 4), останавливает и транспорт гетероканала (рис. 5). Гетероканалы, сформированные из TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1, переносятся на мембрану благодаря специально введенным точечным мутациям S371T (в Kv1.2) и S369T (в Kv1.1). Для переноса в мембрану нативных гетероканалов Kv1.2/Kv1.1, по-видимому, необходимы вспомогательные факторы, возможно субъединицы Kvβ1 и/или Kvβ2, которых в клетках Neuro-2a мало или они совсем не синтезируются. Как подтверждают наши эксперименты с со-экспрессией TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1, сами субъединицы могут дополнительно модулировать эффективность транспорта каналов в мембрану: мутация S371T в субъединице Kv1.2 формирует настолько сильный сигнал мем-

бранный локализации, что заметно ускоряет в составе гетероканала вынос на мембрану субъединицы Kv1.1(S369T) (рис. 3), у которой собственная скорость транспорта медленная (рис. 1).

Проведенные исследования не позволяют определить стехиометрию субъединиц в составе образующихся гетероканалов. Однако на основе обнаруженных отличий в распределении сигнала FRET и флуоресценции mKate2-Kv1.1 в составе гетероканалов на мемbrane (рис. 3д) можно заключить, что стехиометрия субъединиц mKate2-Kv1.1 и TagCFP-Kv1.2 в образованных гетероканалах разная.

Наличие на мемbrane клеток сигнала только TagCFP-Kv1.2 в эксперименте по со-экспрессии TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1wt (рис. 5) свидетельствует об образовании гомотетрамерных каналов помимо гетероканалов. Сравнение интенсивностей сигналов гомотетрамерных каналов TagCFP-Kv1.2 на мембране при экспрессии в

клетках только TagCFP-Kv1.2 (рис. 1а) и при соэкспрессии TagCFP-Kv1.2 и mKate2-Kv1.1wt (рис. 5а), проведенное на большой выборке клеток, указывает на то, что в присутствии двух разных субъединиц равновесие сдвигается в сторону образования гетеро каналов по сравнению с гомотетрамерными каналами.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

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

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ovsepian S. V., Leberre M., Steuber V., O'Leary V. B., Leibold Ch. J., and Dolly O. Distinctive role of Kv1.1 subunit in the biology and functions of low threshold K<sup>+</sup> channels with implications for neurological disease. *Pharmacol. Ther.*, **159**, 93–101 (2016). DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.01.005
- Al-Sabi A., Kaza S. K., Dolly O. J., and Wang J. Pharmacological characteristics of Kv1.1- and Kv1.2-containing channels are influenced by the stoichiometry and positioning of their  $\alpha$  subunits. *Biochem. J.*, **454**, 101–108 (2013). DOI: 10.1042/BJ20130297
- Robbins C. A. and Tempel B. L. Kv1.1 and Kv1.2: similar channels, different seizure models. *Epilepsia*, **53** (Suppl 1), 134–141 (2012). DOI: 10.1111/J.1528-1167.2012.03484.X
- Ma Z., Lavebratt C., Almgren M., Portwood N., Forsberg L. E., Bränström R., Berglund E., Falkmer S., Sundler F., Wierup N., and Björklund A. Evidence for presence and functional effects of Kv1.1 channels in  $\beta$ -cells: general survey and results from mceph/mceph mice. *PLoS One*, **6** (4), e18213 (2011). DOI: 10.1371/journal.pone.0018213
- Fellerhoff-Losch B., Korol S. V., Ganor Y., Gu S., Cooper I., Eilam R., Besser M., Goldfinger M., Chowers Y., Wank R., Birnir B., and Levite M. Normal human CD4(+) helper T cells express Kv1.1 voltage-gated K<sup>+</sup> channels, and selective Kv1.1 block in T cells induces by it-self robust TNF $\alpha$  production and secretion and activation of the NF $\kappa$ B non-canonical pathway. *J. Neural Transm.(Vienna)*, **123**, 137–157 (2016). DOI: 10.1007/s00702-015-1446-9
- Park W. S., Firth A. L., Han J., and Ko E. A. Pathophysiological roles of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J. Smooth Muscle Res.*, **46**, 89–105 (2010). DOI: 10.1540/jsmr.46.89
- Pinatel D. and Faivre-Sarrailh C. Assembly and Function of the Juxtaparanodal Kv1 Complex in Health and Disease. *Life (Basel)*, **11**, 1–22 (2020). DOI: 10.3390/LIFE11010008
- Manganas L. N. and Trimmer J. S. Subunit composition determines Kv1 potassium channel surface expression. *J. Biol. Chem.*, **275**, 29685–29693 (2000). DOI: 10.1074/JBC.M005010200
- Duménieu M., Oulé M., Kreutz M. R., and Lopez-Rojas J. The segregated expression of voltage-gated potassium and sodium channels in neuronal membranes: functional implications and regulatory mechanisms. *Front. Cell. Neurosci.*, **11**, 115 (2017). DOI: 10.3389/fncel.2017.00115
- Capera J., Serrano-Novillo C., Navarro-Pérez M., Cassinelli S., and Felipe A. The potassium channel odyssey: Mechanisms of traffic and membrane arrangement. *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 734 (2019). DOI: 10.3390/ijms20030734
- Manganas L. N., Wang Q., Scannevin R. H., and Trimmer J. S. Identification of a trafficking determinant localized to the Kv1 potassium channel pore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 14055–14059 (2001). DOI: 10.1073/PNAS.241403898
- Zhu J., Watanabe I., Gomez B., and Thornhill W. B. Determinants involved in Kv1 potassium channel folding in the endoplasmic reticulum, glycosylation in the Golgi, and cell surface expression. *J. Biol. Chem.*, **276**, 39419–39427 (2001). DOI: 10.1074/JBC.M107399200
- Zhu J., Gomez B., Watanabe I., and Thornhill W. B. Amino acids in the pore region of Kv1 potassium channels dictate cell-surface protein levels: a possible trafficking code in the Kv1 subfamily. *Biochem. J.*, **388**, 355–362 (2005). DOI: 10.1042/BJ20041447
- Orlov N. A., Kryukova E. V., Efremenko A. V., Yakimov S. A., Toporova V. A., Kirpichnikov M. P., Nekrasova O. V., and Feofanov A. V. Interactions of the Kv1.1 channel with peptide pore blockers: A fluorescent analysis on mammalian cells. *Membranes (Basel)*, **13** (7), 645 (2023). DOI: 10.3390/membranes13070645
- Ignatova A. A., Kryukova E. V., Novoseletsky V. N., Kazakov O. V., Orlov N. A., Korabeynikova V. N., Lariana M. V., Fradkov A. F., Yakimov S. A., Kirpichnikov M. P., Feofanov A. V., and Nekrasova O. V. New high-affinity peptide ligands for Kv1.2 channel: selective blockers and fluorescent probes. *Cells*, **13** (24), 2096 (2024). DOI: 10.3390/cells13242096
- Orlov N. A., Ignatova A. A., Kryukova E. V., Yakimov S. A., Kirpichnikov M. P., Nekrasova O. V., and Feofanov A. V. Combining mKate2-Kv1.3 channel and Atto488-hongotoxin for the studies of peptide pore blockers on living eukaryotic cells. *Toxins (Basel)*, **14** (12), 858 (2022). DOI: 10.3390/toxins14120858

## Formation of Heterotetrameric Potassium Channels Kv1.1–Kv1.2 in Neuro-2a Cells: Analysis by the Förster Resonance Energy Transfer Technique

A.V. Efremenko\*, O.V. Nekrasova\*\*, and A.V. Feofanov\*, \*\*

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

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

The subunits of the voltage-gated potassium channels Kv1.1 and Kv1.2 can form both homo- and heterotetrameric channels in cells. This significantly affects the functional properties and localization of the formed Kv1 channels. Confocal microscopy based on Förster resonance energy transfer was used to study the formation of Kv1 channels during co-expression of subunits Kv1.1(S369T) and Kv1.2(S371T), fused with the fluorescent protein mKate2 and TagCFP, respectively, in murine neuroblastoma Neuro-2a cells. Due to mutation, these subunits provide enhanced transfer of Kv1 channels in plasma membrane. It was found that TagCFP-Kv1.1(S369T) and mKate2-Kv1.2(S371T) effectively form heterochannels that are localized both on the membrane and in the cytoplasm of cells. In the absence of the S369T mutation, heterochannels are not embedded in the membrane, which indicates the need for auxiliary factors for the transfer of native heterochannels into the cell membrane. In addition to heterochannels, homotetrameric channels are also formed in cells, but the effectiveness of the formation of heterochannels is much higher.

**Keywords:** potassium channels, potential-dependent, heterotetramers, Förster resonance energy transfer, confocal microscopy