

## СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНОГО КАНАЛА Kv1.2, СОБРАННОГО ИЗ КОНКАТЕМЕРОВ АЛЬФА-СУБЪЕДИНИЦ

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

\*Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,  
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: okatja@yandex.ru

Поступила в редакцию 13.12.2024 г.

После доработки 13.12.2024 г.

Принята к публикации 18.12.2024 г.

$\alpha$ -Субъединицы калиевого потенциал-зависимого канала Kv1.2, функцией которого является регуляция нейронной проводимости в центральной нервной системе, образуют с  $\alpha$ -субъединицами родственных Kv1-каналов различные по составу и стехиометрии гетеротетрамеры. Для изучения гетеротетрамernih каналов *in vitro* проводят конструирование конкатемеров, соединяя последовательно необходимые  $\alpha$ -субъединицы. Вопрос о способе конструирования конкатемеров, позволяющем воспроизвести свойства нативных каналов, требует детального изучения. В работе были сконструированы меченые флуоресцентным белком mKate2 конкатемеры (димеры)  $\alpha$ -субъединиц Kv1.2 (mKate2-Kv1.2-Kv1.2) и осуществлена их экспрессия в клетках нейробластомы мыши Neuro-2a. Показано, что канал Kv1.2, собранный из этих конкатемеров, по своим свойствам, таким как внутриклеточное распределение, способность встраиваться в плазматическую мембрану, эффективность взаимодействия с пептидным блокатором, а также по электрофизиологическим характеристикам, практически не отличается от канала Kv1.2 на основе мономерных  $\alpha$ -субъединиц mKate2-Kv1.2.

**Ключевые слова:** калиевые каналы, потенциал-зависимые, гетеротетрамеры, пептидные блокаторы, электрофизиология, конфокальная микроскопия.

DOI: 10.31857/S0006302925010101, EDN: LWVPVB

Потенциал-зависимые калиевые каналы семейства Kv1 широко распространены в центральной и периферической нервной системе, где они выполняют роль регуляторов нейронной проводимости [1]. Характерной особенностью большинства каналов Kv1 является их способность к высокоаффинному взаимодействию с пептидными токсинами из животных ядов, которые являются блокаторами ионной проводимости каналов и широко используются при изучении структуры и функции каналов Kv1 [2]. Большая часть данных, полученных в гетерологичных системах экспрессии (в ооцитах лягушки или на клеточных линиях), характеризует электрофизиологические и лиганд-связывающие свойства гомотетрамernih каналов Kv1, образованных идентичными  $\alpha$ -субъединицами [3, 4]. Вместе с тем известно, что *in vivo* каналы Kv1 могут являться гетеротетрамерами, содержащими в своем составе  $\alpha$ -субъединицы Kv1 различных типов. Способность к гетеротетрамеризации, характерная для представи-

телей семейства каналов Kv1, основана на гомологии N-концевого тетрамеризирующего домена этих каналов. При этом в нейронах реализуются лишь определенные комбинации гетеротетрамernih каналов [5, 6]. Функциональное значение гетеротетрамеризации заключается в увеличении разнообразия регуляторных функций каналов Kv1 [7]. Кроме того, гетеротетрамеризация оказывает модулирующее действие на активность каналов Kv1 на уровне регуляции клеточного транспорта и встраивания в мембрану каналов, содержащих определенные  $\alpha$ -субъединицы. Так,  $\alpha$ -субъединица Kv1.1 является «молчашей», а ее встраивание в мембрану опосредуется гетеротетрамеризацией с  $\alpha$ -субъединицами Kv1.2 или Kv1.4 [8].

Каналы, содержащие  $\alpha$ -субъединицы Kv1.2, участвуют в проведении нервных импульсов в аксонах и секреции нейромедиаторов. Они локализованы в строго определенных участках аксона (в начальном сегменте аксона, вблизи перехватов

Ранвье, в синаптических мембранах) и представлены там гетеротетрамерами Kv1.2/Kv1.1 [6, 9]. Именно гетеротетрамеры Kv1.1/1.2 наиболее распространены в центральной нервной системе [6].

Для систематического изучения гетеротетрамерных каналов необходимо контролировать стехиометрию  $\alpha$ -субъединиц в канале. Это труднодостижимо при со-экспрессии комбинаций отдельных  $\alpha$ -субъединиц в клетках [10]. Поэтому для исследования гетеротетрамерных каналов предложено использовать конкатемерные конструкции с заданным числом и порядком ковалентно связанных между собой  $\alpha$ -субъединиц [11]. Известны два биоинженерных способа конструирования конкатемеров, отличающиеся по структуре линкеров между соседними  $\alpha$ -субъединицами. В конструкциях, используемых для экспрессии гетеротетрамеров в ооцитах лягушки, в качестве линкера использовали протяженную последовательность  $\beta$ -глобина *Xenopus* [12].  $\alpha$ -Субъединицы Kv1.3 объединяли в димеры дипептидом Lys-Leu, соответствующим последовательности сайта узнавания рестриктазы HindIII, по которому проводилось клонирование [12].

С целью изучения применимости второго способа для формирования и изучения в клетках гетеротетрамерных каналов Kv1.2/Kv1.x (где  $x = 1, 4, 5, 6$ ) со стехиометрией 2 : 2 нами создан гомодимер из  $\alpha$ -субъединиц Kv1.2, соединенных линкером Lys-Leu. Следуя разработанному нами ранее подходу к изучению Kv1-каналов в клетках млекопитающих [13–15], конкатемеры Kv1.2–Kv1.2 были слиты по N-концу с красным флуоресцирующим белком mKate2. Проведено сравнительное исследование свойств гомотетрамерных каналов Kv1.2, образованных мономерными  $\alpha$ -субъединицами mKate2-Kv1.2 (К-Kv1.2) и димерами mKate2-Kv1.2-Kv1.2 (К-Kv1.2-Kv1.2). Изучены клеточное распределение, способность к связыванию с пептидным блокатором и электрофизиологические характеристики обоих типов каналов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Хонготоксин 1 (HgTx1) получали по методике, описанной ранее [16]. HgTx1, меченный по C-концу флуоресцентным белком eGFP (HgTx–GFP), получали, как описано ранее [15].

В работе использовали плазмиду pmKate2-KCNA2, кодирующую  $\alpha$ -субъединицу Kv1.2 человека, слитую на N-конце с красным флуоресцентным белком mKate2 (К-Kv1.2) [15].  $\alpha$ -Субъединица Kv1.2 содержала мутацию S371T, способствующую выносу канала Kv1.2 на мембрану клетки [17]. Для получения конкатемера К-Kv1.2-Kv1.2 сначала была получена плазида pmKate2-KCNA2stopless путем амплификации в реакции

ПЦР гена *KCNA2*, не содержащего стоп-кодона ТАА, с помощью пары олигонуклеотидных праймеров Kcna2-f1 5'-TTCTCAGATCTATGACAGTGGCCACCGGAGACCCA-3' и Kcna2-Stop-r1 5'-CTTCAAGCTTGACATCAGTTAACAATTTTGGTA (подчеркнуты сайты узнавания рестриктаз BglII и HindIII). Полученный фрагмент ДНК гидролизировали рестриктазами BglII/HindIII и клонировали по соответствующим сайтам в плазмиду pmKate2-KCNA2, замещая ген *KCNA2* геном *KCNA2stopless*. Далее проводили амплификацию гена *KCNA2* с помощью праймеров Kcna2-Hind-f1 5'-CT-TCAAGCTTACAGTGGCCACCGGAGACCCAGCAGA-3' и Kcna2-Sal-r1 5'-TTCGTCGAC-TCTCCTGCAGTTA-GACATCAGTTAACAATTTTGTAATATTC-3' (сайты узнавания рестриктаз HindIII, SalGI и PstI подчеркнуты; стоп-кодон ТАА выделен жирным шрифтом) и полученный фрагмент ДНК клонировали по сайтам HindIII/SalI плазмиды pmKate2-KCNA2stopless. Полученная плазида pmKate2-KCNA2-KCNA2 кодировала флуоресцентно-меченый димерный белок К-Kv1.2-Kv1.2, в котором  $\alpha$ -субъединицы Kv1.2 объединены линкером Lys-Leu. Структуру полученной плазмиды подтверждали секвенированием фрагментов ДНК, полученных при гидролизе плазмиды рестриктазами BamHI/HindIII и HindIII/SalGI («Евроген», Москва, Россия).

Клетки нейробластомы мыши Neuro-2a выращивали в среде DMEM/F12 (среда Игла в модификации Дульбекко), содержащей 2 мМ L-глутамин («Панэко», Москва, Россия) и 5% эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США) (далее именуемой полной средой). Пересевы клеток проводили дважды в неделю. Для проведения трансфекции клетки (30000 ед./лунка) сажали в 24-луночные планшеты на круглые покровные стекла, предварительно покрытые поли-L-лизинном, и выращивали в течение 20–22 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Трансфекцию клеток плазмидами pmKate2-KCNA2 или pmKate2-KCNA2-KCNA2 проводили с помощью реагента GenJector-U в соответствии с протоколом производителя. Эксперименты проводили через 24–48 ч после трансфекции.

Для анализа связывания HgTx–GFP с каналами К-Kv1.2-Kv1.2 к трансфицированным клеткам в полной среде добавляли HgTx–GFP в диапазоне концентраций 0.032–2.0 нМ и инкубировали в течение 1 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Для анализа конкурентного связывания к клеткам в полной среде добавляли HgTx–GFP (0.2 нМ) вместе с HgTx1 (10 нМ) и инкубировали в течение 1 ч.

Исследования проводили с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа SP2 (Leica Microsystems GmbH, Германия) с водно-иммерсионным объективом 63× (HCX PL APO, NA = 1.2). Разрешение в аксиальном и

латеральном направлении составляло 0.6 и 0.2 мкм.

Флуоресценцию каналов возбуждали светом с длиной волны 561 нм и детектировали в диапазоне 680–750 нм. Флуоресценцию HgTx–GFP возбуждали светом с длиной волны 488 нм и регистрировали в диапазоне 500–530 нм. Чтобы избежать интерференции флуоресценции mKate2 с клеточной автофлуоресценцией, возбуждаемой при 488 нм, для измерения клеточного распределения флуоресценции HgTx–GFP и K-Kv1.2-Kv1.2 применяли последовательное сканирование.

Количественный анализ взаимодействия HgTx–GFP с каналом K-Kv1.2-Kv1.2 проводили с использованием программы ImageJ (версия 1.48, Национальный институт здравоохранения, США) в соответствии с процедурой, разработанной ранее [13]. Этот анализ основан на измерении отношения интенсивностей флуоресценции связанного лиганда HgTx–GFP и канала K-Kv1.2-Kv1.2 на плазматической мембране для выборки клеток с последующим расчетом среднего значения этого отношения ( $R_{av}$ ) и стандартного отклонения.

Для определения константы диссоциации ( $K_d$ ) комплексов HgTx–GFP с K-Kv1.2-Kv1.2 зависимость  $R_{av}$  от концентрации флуоресцентного лиганда  $L$  аппроксимировали следующим уравнением:

$$R_{av}(L)/R_m = L/(K_d + L),$$

где  $R_m$  — максимальное значение  $R_{av}$ , соответствующее насыщению связывания. Величину  $K_d$  определяли в независимых экспериментах, усредняли и представляли как среднее  $\pm$  ошибка среднего.

Ионные токи каналов K-Kv1.2-Kv1.2 регистрировали при комнатной температуре методом локальной фиксации потенциала в стандартной конфигурации «целая клетка» [13]. Через 24–48 ч после трансфекции стекла диаметром 10 мм, преобработанные поли-D-лизин, с прикрепленными клетками Neuro-2a помещали в камеру с непрерывной перфузией внеклеточного раствора, имеющего следующий состав: 140 мМ NaCl, 2.8 мМ KCl, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ HEPES и 10 мМ глюкозы, pH 7.4. Микропипетки вытягивали из боросиликатного стекла с микрофиламентом (Sutter Instrument, США) и заполняли раствором следующего состава: 140 мМ KCl, 6 мМ CaCl<sub>2</sub>, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ MgATP, 0.4 мМ NaGTP, 10 мМ HEPES, 20 мМ BAPTA/КОН, pH 7.3. Соппротивление кончика микропипетки составляло 6–8 МОм, удерживающий потенциал –70 мВ. Тестовые импульсы длительно 250 мс подавали ступенчато от –70 мВ до 70 мВ с шагом 20 мВ. Токи записывали с помо-

щью усилителя ЕРС-10 (НЕКА Elektronik, Германия). Для регистрации токов выбирали красные флуоресцирующие клетки. Для обработки результатов отбирали клетки, в которых выходящие токи составляли более 2 нА.

Для расчета константы времени активации канала ( $\tau_{act}$ ) участки выходящего тока ионов калия на отрезке от момента активации до максимального ( $I_m$ ) были аппроксимированы моноэкспоненциальной функцией:

$$I(t) = I_m(1 - \exp(-t/\tau_{act})).$$

Для расчета потенциала полуактивации  $V_{1/2}$  рассчитывали проводимость ( $g$ ) клеток по формуле:

$$g = I/(V - E_K),$$

где  $I$  — величина калиевых токов через 200 мс после начала активации,  $V$  — активирующий потенциал,  $E_K$  — потенциал реверсии (–80 мВ).

Зависимость нормализованной проводимости от потенциала была аппроксимирована с помощью уравнения Больцмана:

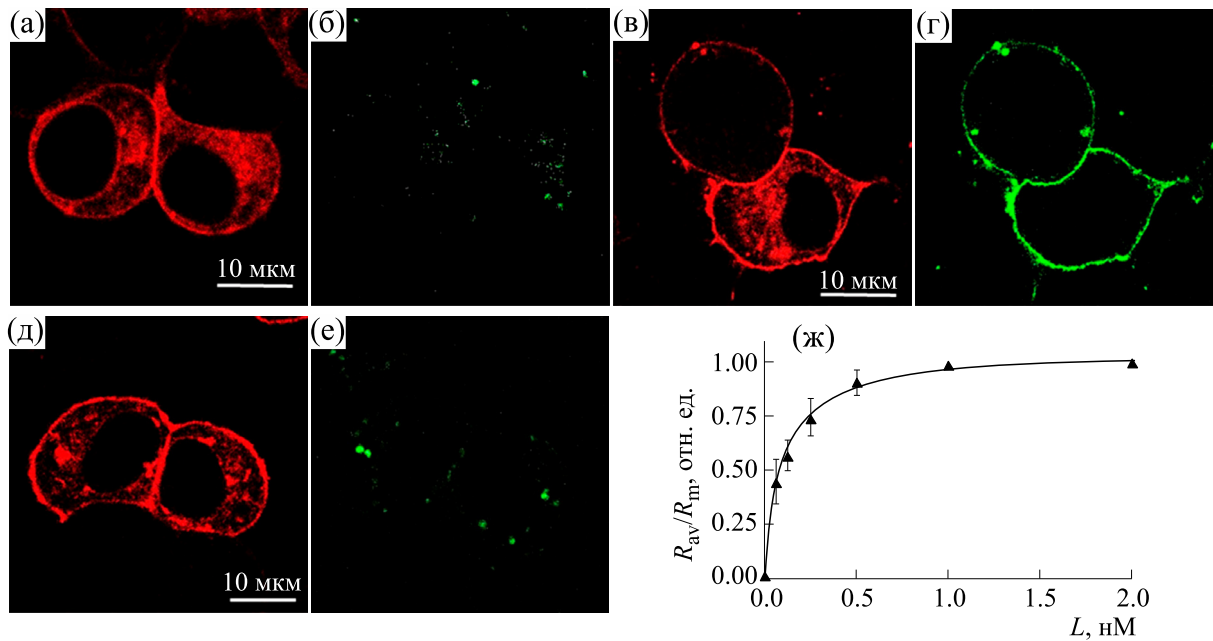
$$g = g_{max}/(1 + \exp((V_{1/2} - V)/k)),$$

где  $g_{max}$  — максимальная нормализованная проводимость,  $k$  — коэффициент наклона кривой.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Конструирование конкатемеров K-Kv1.2-Kv1.2 было выполнено на основе  $\alpha$ -субъединицы Kv1.2, меченной по N-концу красным флуоресцентным белком mKate2 (K-Kv1.2). Ранее нами было показано, что N-концевое присоединение mKate2 не мешает переносу канала в плазматическую мембрану, в отличие от C-концевого мечения  $\alpha$ -субъединицы [13]. Вторую  $\alpha$ -субъединицу присоединили, как предложено ранее [12], через линкер Lys-Leu.

Транзиентная трансфекция клеток Neuro-2a плазмидой pmKate2-KCNA2-KCNA2 приводит к появлению значительной доли клеток, экспрессирующих K-Kv1.2-Kv1.2. Все эти клетки демонстрируют сходное сетчатое распределение каналов в цитоплазме, которое характерно для эндоплазматической локализации канала [15], а также отчетливое окрашивание плазматической мембраны (рис. 1а,в,д). Наблюдаемое внутриклеточное распределение K-Kv1.2-Kv1.2 полностью согласуется с распределением каналов K-Kv1.2 [15]. Для подтверждения мембранной презентации и формирования канала K-Kv1.2-Kv1.2 клетки инкубировали с HgTx–GFP — с высокоаффинным флуоресцентным лигандом каналов Kv1.2, в котором пептидный блокатор HgTx1 соединен на C-конце с зеленым флуоресцентным белком eGFP [15]. Связывание HgTx–GFP с каналами



**Рис. 1.** Распределение каналов на основе K-Kv1.2-Kv1.2 в клетках Neuro-2a (а, в, д) и их взаимодействие с флуоресцентным лигандом HgTx-GFP. (а–г) – Конфокальные флуоресцентные изображения клеток Neuro-2a, экспрессирующих K-Kv1.2-Kv1.2, в отсутствие HgTx-GFP (а, б); в присутствии 0.2 нМ HgTx-GFP (в, г) или в присутствии 0.2 нМ HgTx-GFP и 10 нМ HgTx1 (д, е). (а, в, д) – Распределение флуоресценции K-Kv1.2-Kv1.2; (г, е) – распределение флуоресценции HgTx-GFP, добавленного в клеточную среду; (б) – контрольное изображение свечения клеток в диапазоне флуоресценции HgTx-GFP в отсутствие лиганда. (ж) – Концентрационная зависимость связывания HgTx-GFP ( $L$ ) на мембране клеток, экспрессирующих каналы на основе K-Kv1.2-Kv1.2.  $R_{av}$  и  $R_m$  – расчетные величины, характеризующие текущее ( $R_{av}$ ) и максимальное ( $R_m$ ) связывание лиганда с каналом на мембране клеток (см. раздел «Материалы и методы»). Данные представлены как среднее  $\pm$  ошибка среднего по трем независимым экспериментам.

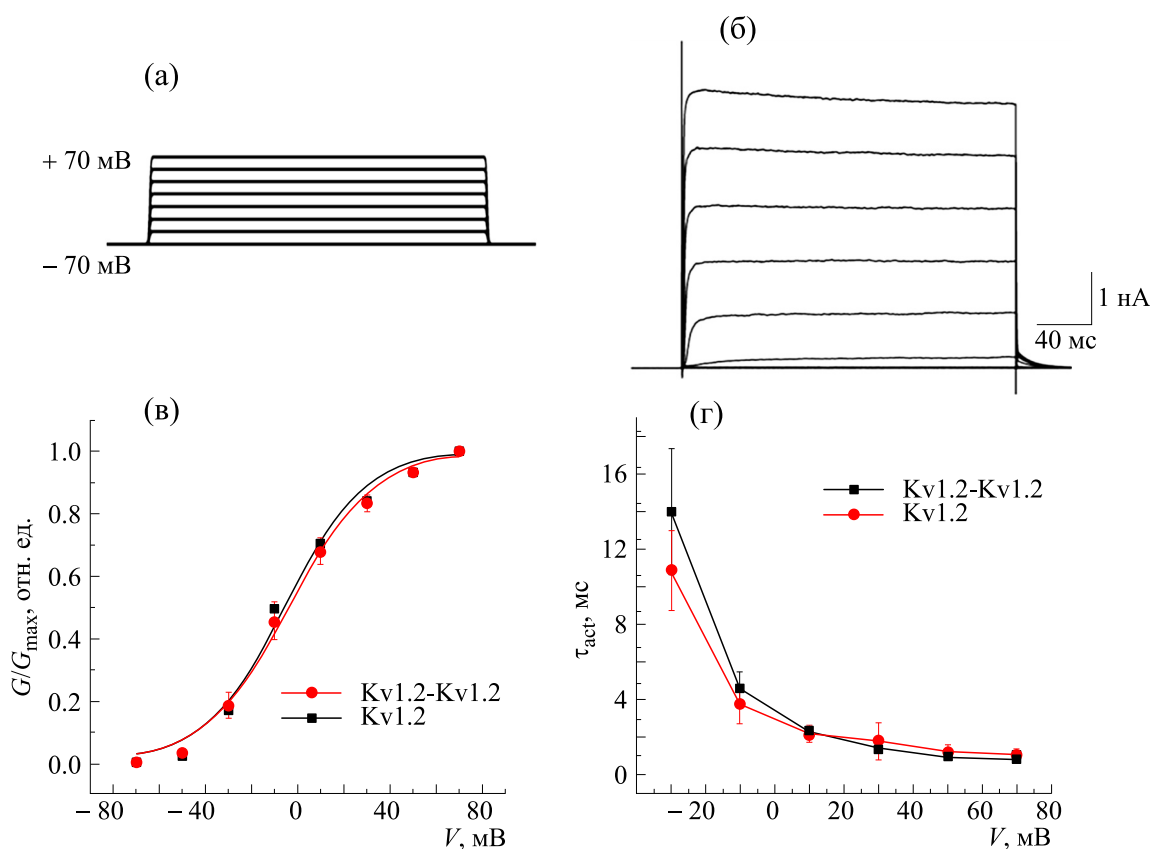
K-Kv1.2-Kv1.2 на мембране живых клеток Neuro-2a наблюдалось при субнаномолярных концентрациях и достигало насыщения при  $\sim 0.5$  нМ (рис. 1в,г,ж). Анализ концентрационно-зависимого связывания HgTx-GFP с каналами K-Kv1.2-Kv1.2 (рис. 1ж) показал, что образующиеся комплексы характеризуются константой диссоциации  $K_d = 0.10 \pm 0.02$  нМ, которая равна  $K_d$  комплексов этого лиганда с каналами K-Kv1.2 [15]. HgTx-GFP вытесняется из комплексов с K-Kv1.2-Kv1.2 на мембране избытком немеченого HgTx1 (рис. 1д,е). Полученные данные свидетельствуют о наличии специфического лиганд-связывающего сайта на внеклеточной поверхности канала, что, в свою очередь, указывает на сохранение каналом K-Kv1.2-Kv1.2 природной тетрамерной структуры.

Электрофизиологические характеристики канала K-Kv1.2-Kv1.2 изучали методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» на клетках Neuro-2a, транзюгентно трансфицированных плазмидой pmKate2-KCNA2-KCNA2. С использованием стандартного протокола (рис. 2а) установлено, что в клетках, экспрессирующих конкатемеры K-Kv1.2-Kv1.2, ве-

личина выходящих токов определяется потенциалом мембраны и составляет от 2 до 10 нА (рис. 2б), т. е. эти конструкции формируют в мембране клеток потенциал-зависимые каналы. Каналы K-Kv1.2-Kv1.2 быстро активировались и практически не инактивировались в условиях эксперимента (рис. 2б), что соответствует свойствам каналов K-Kv1.2 [15] и природных гомотетрамерных каналов Kv1.2 [3].

Для характеристики кинетических свойств канала K-Kv1.2-Kv1.2 были исследованы особенности его активации в сравнении с каналом K-Kv1.2 (рис. 2г). Константы активации каналов ( $\tau_{act}$ ) были измерены путем аппроксимирования выходящих калиевых токов в процессе открытия каналов моноэкспоненциальной функцией при различных заданных потенциалах мембраны. Обнаружено, что значения  $\tau_{act}$  выходящих токов канала K-Kv1.2-Kv1.2 одинаковы с каналом K-Kv1.2 при всех заданных потенциалах мембраны (рис. 2г).

Константой, характеризующей вероятность открытия калиевого канала, является потенциал полуактивации ( $V_{1/2}$ ), при котором половина каналов в клетке открыта. Для оценки  $V_{1/2}$  была изучена зависимость проводимости каналов от



**Рис. 2.** Электрофизиологические свойства каналов, сформированных из конкатемеров K-Kv1.2-Kv1.2 или четырех индивидуальных субъединиц K-Kv1.2. (а) – Протокол измерений. Тестовые импульсы длительностью 250 мс подавали ступенчато от  $-70$  мВ до  $+70$  мВ с шагом 20 мВ. (б) – Репрезентативные токи через каналы, сформированные из конкатемеров K-Kv1.2-Kv1.2, в клетках Neuro-2a. Токи измерены по протоколу (а). Удерживающий потенциал  $-70$  мВ. (в) – Нормализованные проводимости каналов, сформированных из конкатемеров K-Kv1.2-Kv1.2 или четырех индивидуальных субъединиц K-Kv1.2, в клетках Neuro-2a в зависимости от заданного потенциала мембраны. Данные аппроксимированы с помощью уравнения Больцмана. Проводимости рассчитаны для токов через 200 мс после начала активации канала. Значения представлены как среднее  $\pm$  ошибка среднего ( $n = 11$ ). (г) – Константы времени активации ( $\tau_{\text{act}}$ ) каналов, сформированных из конкатемеров K-Kv1.2-Kv1.2 или четырех индивидуальных субъединиц K-Kv1.2, в зависимости от заданного потенциала мембраны.

заданного потенциала мембраны. Нормализованная проводимость каналов была измерена как функция активирующего потенциала и аппроксимирована уравнением Больцмана. Установлено, что для канала K-Kv1.2-Kv1.2 величина  $V_{1/2}$  равна  $-(4 \pm 1)$  мВ, что практически совпадает с величиной  $V_{1/2}$  для гомотетрамерного канала K-Kv1.2  $-(6 \pm 2)$  мВ (рис. 2в). Таким образом, объединение  $\alpha$ -субъединиц в конкатемер K-Kv1.2-Kv1.2 не вызывает смещения потенциала полуактивации канала.

Полученные данные свидетельствуют о сохранении функциональной активности и кинетических свойств флуоресцентного канала Kv1.2, собранного из конкатемеров K-Kv1.2-Kv1.2, и позволяют заключить, что наличие линкера Lys-Leu между  $\alpha$ -субъединицами не оказывает существенного влияния на электрофизиологические характеристики канала Kv1.2.

## ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В работе было проведено конструирование флуоресцентно меченных конкатемеров K-Kv1.2-Kv1.2 и изучены свойства образующегося в гетерологической системе экспрессии флуоресцентно меченного канала. Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии было продемонстрировано, что в клетках Neuro-2a наблюдается высокий уровень экспрессии флуоресцентно-меченных субъединиц. Образование на основе конкатемеров K-Kv1.2-Kv1.2 функционально активного канала, имеющего нативную тетрамерную структуру, было подтверждено двумя методами. Методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии показано, что флуоресцентный лиганд HgTx-GFP канала K-Kv1.2 [15] способен связываться на мембране клеток Neuro-2a с каналом K-Kv1.2-Kv1.2 с высокой аффинностью и специфичностью. Сохранение ка-

налами Kv1 правильной тетрамерной структуры является необходимым условием связывания с пептидными блокаторами [2], так как во взаимодействии с пептидом участвуют остатки нескольких  $\alpha$ -субъединиц канала Kv1. Примечательно, что величина  $K_d$  комплексов HgTx–GFP с каналом K-Kv1.2-Kv1.2 полностью совпадает с  $K_d$  комплексов лиганда с каналом K-Kv1.2, что указывает на идентичность всех межмолекулярных контактов в рассматриваемых комплексах «пептид-канал». На образование правильной укладки канала косвенно указывает и высокий уровень встраивания канала K-Kv1.2-Kv1.2 в плазматическую мембрану. Биогенез каналов Kv1 в клетке включает сборку тетрамерных каналов в эндоплазматическом ретикулуме с последующим транспортом в аппарат Гольджи, а затем в клеточную мембрану. Известно, что в аппарате Гольджи деградировавшие или неправильно сложенные каналы претерпевают «обратный» трафик и исключаются из процесса встраивания в мембрану клетки [8].

В работе были получены данные об электрофизиологических свойствах канала K-Kv1.2-Kv1.2. Канал Kv1.2 на основе конкатемеров K-Kv1.2-Kv1.2 проявил электрическую активность, присущую каналу на основе K-Kv1.2. Полученные данные свидетельствуют о сохранении кинетических свойств (времени активации,  $\tau_{act}$ ) канала, который является каналом с быстрой активацией и медленной инактивацией [3]. Надо отметить, что измерения кинетических параметров каналов Kv1 требуют стандартизации условий измерений. В частности, температура значительно влияет на величину времени активации канала. Увеличение температуры приводит к снижению времени активации [3]. Практически идентичные величины потенциала полуактивации  $V_{1/2}$  каналов K-Kv1.2-Kv1.2 и K-Kv1.2 также свидетельствуют о сохранении функциональной активности конкатемерного канала, в частности о сохранении «воротного» механизма канала, обеспечивающего взаимодействие потенциал-чувствительного и порового доменов. По литературным данным, величина  $V_{1/2}$  для канала Kv1.2 крысы, экспрессированного в ооцитах лягушки, равна  $-(4.9 \pm 0.9)$  мВ [18], что практически совпадает с полученными нами значениями. Широкий интервал значений  $V_{1/2}$  (от  $-5$  до  $5$  мВ) указан для различных по видовому происхождению каналов Kv1.2, экспрессированных в гетерологических системах [19]. При сравнении полученных в эксперименте электрофизиологических параметров с опубликованными данными важно учитывать, что условия эксперимента (например, температура, различия в концентрациях ионов  $K^+$  или  $Mg^{2+}$  во внеклеточном или внутриклеточном раство-

рах) могут сказываться на измеряемых величинах [3]. Сравнивая параметры каналов, экспрессированных в гетерологических системах, с нативными каналами, надо учитывать, что природные каналы образуют мультикомпонентные комплексы, состоящие не только из различных  $\alpha$ -субъединиц каналов, но и из вспомогательных субъединиц, таких как, например, Kv $\beta$ 1 и Kv $\beta$ 2 [20].

Согласно полученным данным объединение двух  $\alpha$ -субъединиц Kv1.2 в конкатемер выбранным нами способом не препятствует формированию функционально-активных потенциал-зависимых каналов и не искажает их электрофизиологические характеристики. Данный результат обосновывает возможность использования аналогичного способа объединения двух различных  $\alpha$ -субъединиц в конкатемер для создания различных вариантов Kv1.2-содержащих гетеротетрамерных каналов с контролируемой стехиометрией и свойствами, близкими к природным гетеротетрамерным каналам.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

1. Gonzalez C., Baez-Nieto D., Valencia I., Oyarzún I., Rojas P., Naranjo D., and Latorre R. K<sup>+</sup> channels: Function-structural overview. *Compr. Physiol.*, **2** (3), 2087–2149 (2012). DOI: 10.1002/cphy.c110047
2. Kuzmenkov A. I., Grishin E. V., and Vassilevski A. A. Diversity of potassium channel ligands: focus on scorpion toxins. *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1764–1799 (2015). DOI: 10.1134/S0006297915130118
3. Ranjan R., Logette E., Marani M., Herzog M., Tâche V., Scantamburlo E., Buchillier V., and Markram H. A kinetic map of the homomeric voltage-gated potassium channel (Kv) family. *Front. Cell. Neurosci.*, **13**, 358 (2019). DOI: 10.3389/fncel.2019.00358
4. Grissmer S., Nguyen A. N., Aiyar J., Hanson D. C., Mather R. J., Gutman G. A., Karmilowicz M. J., Auperin D. D., and Chandy K. G. Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol. Pharmacol.*, **45**, 1227 (1994).

5. Yu W., Xu J., and Li M. NAB domain is essential for the subunit assembly of both alpha-alpha and alpha-beta complexes of shaker-like potassium channels. *Neuron*, **16**, 441–453 (1996). DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80062-8
6. Shamotienko O. G., Parcej D. N., and Dolly J. O. Subunit combinations defined for K<sup>+</sup> channel Kv1 subtypes in synaptic membranes from bovine brain. *Biochemistry*, **36**, 8195–8201 (1997). DOI: 10.1021/BI970237G
7. Dodson P. D., Barker M. C., and Forsythe I. D. Two heteromeric Kv1 potassium channels differentially regulate action potential firing. *J. Neurosci.*, **22**, 6953–6961 (2002). DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-16-06953.2002
8. 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** (3), 734 (2019). DOI: 10.3390/ijms20030734
9. 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
10. Rea R., Spauschus A., Eunson L. H., Hanna M. G., and Kullmann D. M. Variable K(+) channel subunit dysfunction in inherited mutations of KCNA1. *J. Physiol.*, **538** (Pt 1), 5–23 (2002). DOI: 10.1113/jphysiol.2001.013242
11. Al-Sabi A., Shamotienko O., Ni Dhochartaigh S., Muniyappa N., Le Berre M., Shaban H., Wang J., Sack J. T., and Dolly J. O. Arrangement of Kv1 alpha subunits dictates sensitivity to tetraethylammonium. *J. Gen. Physiol.*, **136** (3), 273–282 (2010). DOI: 10.1085/jgp.200910398
12. Solé L., Sastre D., Colomer-Molera M., Vallejo-Gracia A., Roig S. R., Pérez-Verdaguer M., Lillo P., Tamkun M. M., and Felipe A. Functional consequences of the variable stoichiometry of the Kv1.3-KCNE4 complex. *Cells*, **9** (5), 1128 (2020). DOI: 10.3390/cells9051128
13. 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
14. 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
15. Ignatova A. A., Kryukova E. V., Novoseletsky V. N., Kazakov O. V., Orlov N. A., Korabeynikova V. N., Larina 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
16. Nekrasova O., Kudryashova K., Fradkov A., Yakimov S., Savelieva M., Kirpichnikov M., and Feofanov A. Straight-forward approach to produce recombinant scorpion toxins — Pore blockers of potassium channels. *J. Biotechnol.*, **241**, 127 (2017). DOI: 10.1016/j.jbiotec.2016.11.030
17. 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
18. Nilsson M., Lindström S. H., Kaneko M., and Pantazis A. An epilepsy-associated KV1.2 charge-transfer-center mutation impairs KV1.2 and KV1.4 trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **119** (17), e2113675119 (2022). DOI: 10.1073/pnas.2113675119
19. Coetzee W. A., Amarillo Y., Chiu J., Chow A., Lau D., McCormack T., Moreno H., Nadal M. S., Ozaita A., Pountney D., Saganich M., Vega-Saenz de Miera E., and Rudy B. Molecular diversity of K<sup>+</sup> channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **868**, 233–285 (1999). DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb11293.x
20. Yee J. X., Rastani A., and Soden M. E. The potassium channel auxiliary subunit Kvβ2 (Kcnab2) regulates Kv1 channels and dopamine neuron firing. *J. Neurophysiol.*, **128**, 62–72 (2022). DOI: 10.1152/JN.00194.2022

## Properties of the Fluorescent Kv1.2 Channel Assembled from Concatemers of Alpha-Subunits

E.V. Kryukova\*, A.V. Efremenko\*, O.V. Kazakov\*, A.V. Feofanov\*, \*\*, and O.V. Nekrasova\*

\*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

α-Subunits of the potassium voltage-gated channel Kv1.2, whose function is to regulate neuronal conductivity in the central nervous system, form heterotetramers with α-subunits of related Kv1 channels, which differ in composition and stoichiometry. To study heterotetrameric channels *in vitro*, concatemers are constructed by sequentially connecting the Kv1 α-subunits. The method for constructing concatemers that allows one to reproduce the properties of native channels requires detailed study. In this work, concatemers (dimers) of Kv1.2 α-subunits (mKate2-Kv1.2-Kv1.2) labeled with the fluorescent protein mKate2 were constructed and their expression was carried out in mouse neuroblastoma Neuro-2a cells. It was shown that the Kv1.2 channel assembled from concatemers is almost identical in its properties, namely, intracellular distribution, ability to integrate into the plasma membrane, efficiency of interaction with a peptide blocker, as well as in its electrophysiological characteristics, to the Kv1.2 channel based on monomeric α-subunits mKate2-Kv1.2.

**Keywords:** potassium channels, voltage-gated, heterotetramers, peptide blockers, electrophysiology, confocal microscopy