

Практикум 9. Структура и функция

Иосиф Финкельберг

1 Введение

В этом практикуме мы рассмотрели потенциал-зависимый K^+ -канал утки кряквы *Anas platyrhynchos platyrhynchos*. Этот белок участвует в потенциале действия. В ответ на изменение потенциала, связанного с заходом в клетку ионов Na^+ , Ca^{2+} , калиевый канал открывается и позволяет выходить из клетки ионам K^+ . Таким образом, он отвечает за восстановление отрицательного потенциала покоя на клеточной мембране.

У млекопитающих белок является гомотетрамером, субъединицы которого окружают пору канала. Каждая субъединица состоит из 6 α -спиралей, которые называются S_1, \dots, S_6 , соответственно [Chen et al. (2010)]. Спирали S_5, S_6 лежат в центральной части канала (pore domain, PD). Они образуют ворота (lower gate: С-концы S_6 -спиралей) и селективный фильтр для ионов K^+ (upper gate: петли между S_5 и S_6 и С-концы S_5) (см. рис. 1). При установлении потенциала покоя четыре С-конца S_6 -спиралей скрещиваются и перекрывают канал (lower gate). Это сопровождается движением сильно положительно заряженной S_4 -спирали и S_4, S_5 -линкерного участка (см. рис. 2). Далее пространство между lower gate и upper gate будем называть 'вестибулем' канала.

Спирали S_1, S_2, S_3, S_4 образуют потенциал-чувствительный домен, находящийся в периферийной части белка (voltage sensing domain, VSD) [Grizel et al. (2014)] (см. рис. 1). Изменения потенциала улавливают в первую очередь сильно положительно заряженные спирали S_4 [Yellen (2002)].

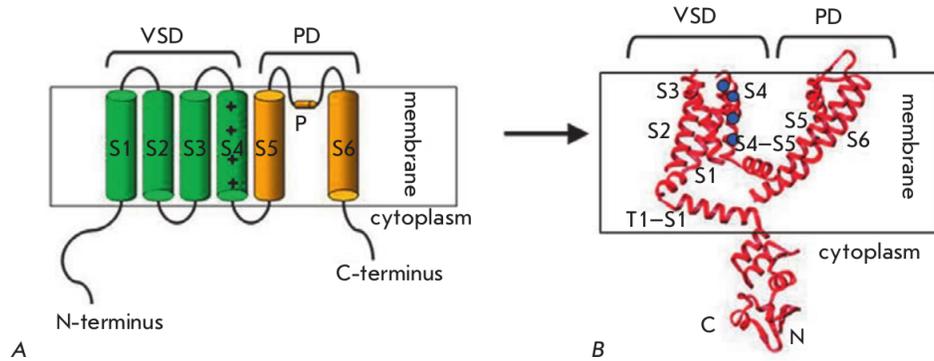


Рис. 1: Схема строения потенциал-зависимого калиевого канала, взятая из Grizel et al. (2014).

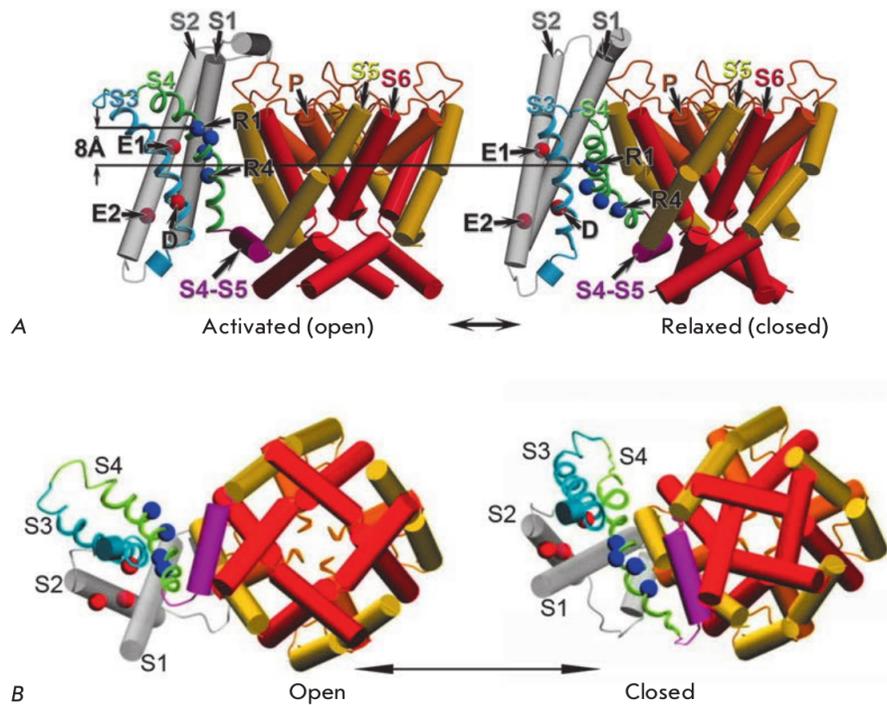


Рис. 2: Схема работы потенциал-зависимого калиевого канала, взятая из Grizel et al. (2014).

Потенциал-зависимые K^+ -каналы высоко селективны к ионам K^+ и при этом проводят эти ионы через непроницаемую для них мембрану со скоро-

стью, близкой к предельной возможной (т.е. примерно со скоростью диффузии K^+ в воде). Выделяют четыре особенности строения K^+ -каналов, позволяющие им осуществлять это [Yellen (2002)]. Во-первых, полость канала со стороны цитоплазмы 'выстлана' молекулами воды, с которой K^+ образует электростатические взаимодействия. Во-вторых, на 'вестибюль' канала, в который ионы K^+ заходят из цитоплазмы, направлены своими С-концами 4 α -спирали (S_5 – по одной от каждой субъединицы). Считается, что эти спирали образуют диполи, которые взаимодействуют с положительно-заряженными ионами K^+ электростатически [Doyle et al. (1998)]. В-третьих, в 'вестибюль' канала попадает одновременно несколько ионов K^+ , которые оказываются на небольшом расстоянии (≈ 7 Å) друг от друга и взаимоотталкиваются. Вследствие этого, ионы не задерживаются в 'вестибюле', а проходят по каналу ('single file diffusion': см., например, Hille and Schwarz (1978)). Эти три обстоятельства обосновывают высокую производительность канала. Селективность же объясняется следующим образом. Выход из 'вестибюля' во внеклеточную среду образуют четыре петли (это петли между спиралями S_5 и S_6). Атомы кислорода остовов этих петель по ходу следования из 'вестибюля' во внеклеточную среду мимикрируют под водную шубу иона K^+ : 4 атома кислорода сверху, 4 – снизу. Эти наборы из 8 атомов кислорода образуют фильтр для ионов K^+ (см. рис. 9, 10). Другие ионы оказываются слишком крупными для образуемого ими канала [Yellen (2002)]. Особенно интересно здесь, как этот фильтр работает против ионов Na^+ . Несмотря на то, что сам по себе ион Na^+ имеет меньший радиус, вместе со своей водной шубой он оказывается крупнее иона K^+ [Degrève et al. (1996)] и не проходит в канал (т.е. он не в состоянии заменить водное окружение на связи с кислородами остова белка).

2 Задание 1. Blast against PDB

Для белка кряквы известна лишь последовательность (Uniprot: U3I0J4). Мы воспользовались сервером Protein blast, чтобы найти гомологов U3I0J4-белка. Мы привели выдачу Blast в [таблице](#) на сервере. Blast выдал более 100 находок, 13 из которых обладали *identity* > 90%. Вполне ожидаемо, большая часть находок припала на млекопитающих (причем лучшими находками оказались белки крысы *Rattus norvegicus*). Наилучшее покрытие последовательности белка кряквы составило 100% при идентичности выравнивания 96-97%. Нашлись сразу две структуры с такими показателями: [2a79](#) и [3lut](#). Обе структуры получены для белка *Rattus norvegicus*. Любопытно, что хотя наш белок является мембранным, обе структуры получены с помощью рентгено-структурного анализа (РСА). Вероятно дело в том, что размеры белка (56.6 кДа) не позволяют получить его структуру с помощью ядерного-магнитного резонанса. Вместе с тем, в годы, когда структуру белка активно изучали (первое десятилетие XXI века), крио-электронная микроскопия еще не была развита настолько, чтобы получать с ее помощью качественные белковые структуры. Удивительным образом,

авторам структуры 2a79 [Long et al. (2005)] удалось даже впоследствии закристаллизовать белок вместе с липидным аналогом мембраны: 2r9r [Long et al. (2007)]. Эта структура также оказалась среди Blast-находок, однако для нас она является непригодной, так как для ее получения авторы использовали химерный белок со вставкой в области S_3 , S_4 из другого калиевого канала. Мы решили для дальнейших заданий использовать в первую очередь 3lut (канал в открытом состоянии), а также в случае затруднений смотреть на 2a79.

3 Задание 2. Локализация позиций

В этом практикуме мы будем рассматривать позиции с индексами 399, 376, 417 по Uniprot-последовательности белка кряквы. Нам повезло, и в крысином белке на тех же позициях стоят те же аминокислотные остатки: Val-399, Gly-376, Tyr-417, причем контексты по последовательности для этих остатков те же, что и для белка утки: см, например, рис. 3.

Mammalian Shaker Kv1.2 potassium channel- beta subunit complex [Rattus norvegicus]Sequence ID: [2A79_B](#) Length: 499 Number of Matches: 1Range 1: 1 to 499 [GenPept](#) [Graphics](#)[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
1004 bits(2595)	0.0	Compositional matrix adjust.	485/499(97%)	491/499(98%)	0/499(0%)
Query 1		MTVATGDPADAAAALPGHPQDTYNPETDHECCERVVINISGLRFETQLKTLAQFPETLLG			60
Sbjct 1		MTVATGDP DEAAAALPGHPQDTY+PE DHECCERVVINISGLRFETQLKTLAQFPETLLG			60
Query 61		DPKKRMRYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYYYQSGGRLRRPVNVPLDIFSEEIRFYELGE			120
Sbjct 61		DPKKRMRYFDPLRNEYFFDRNRPSFDAILYYYQSGGRLRRPVNVPLDIFSEEIRFYELGE			120
Query 121		EAMEMFREDEGYIKEERPLPENEFQRQVWLLFEYPESGPARIIAIVSVMVILISIVSF			180
Sbjct 121		EAMEMFREDEGYIKEERPLPENEFQRQVWLLFEYPESGPARIIAIVSVMVILISIVSF			180
Query 181		CLETLPFRDENEDMHGSGLSHPPYSNSSMGYQQSTSFTDPFFIVETLCIIWFSFEFLVR			240
Sbjct 181		CLETLPFRDENEDMHG G++ YSNS++GYQQSTSFTDPFFIVETLCIIWFSFEFLVR			240
Query 241		FFACPSKAGFFTNIMNIIDIVAIIPYFITLGTLEAEKPEDGQQGQAMSLAILRVIRLVR			300
Sbjct 241		FFACPSKAGFFTNIMNIIDIVAIIPYFITLGTLEAEKPED QQGQAMSLAILRVIRLVR			300
Query 301		VFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEAESESQFPS			360
Sbjct 301		VFRIFKLSRHSKGLQILGQTLKASMRELGLLIFFLFIGVILFSSAVYFAEADERDSQFPS			360
Query 361		IPDAFWWAVVSMTTVGYGDMVPTTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNFYFHRE			420
Sbjct 361		IPDAFWWAVVSMTTVGYGDMVPTTIGGKIVGSLCAIAGVLTIALPVPVIVSNFNFYFHRE			420
Query 421		TEGEEQAQYLQVTSCPkipSSPDLKKSRSASTISKSDYMEIQEGVNNSNEDFREENLKTA			480
Sbjct 421		TEGEEQAQYLQVTSCPkipSSPDLKKSRSASTISKSDYMEIQEGVNNSNEDFREENLKTA			480
Query 481		NCTLANTNYVNITKMLTDV 499			
Sbjct 481		NCTLANTNYVNITKMLTDV 499			

Рис. 3: Blast-выравнивание белков утки и крысы.

4 Задание 3. 'Мутагенез' в Rasmol: результаты и выводы

Сперва, чтобы соотнести информацию о функции белка со структурой в Rasmol, мы раскрасили упомянутые во введении элементы структуры: см. рис. 4.

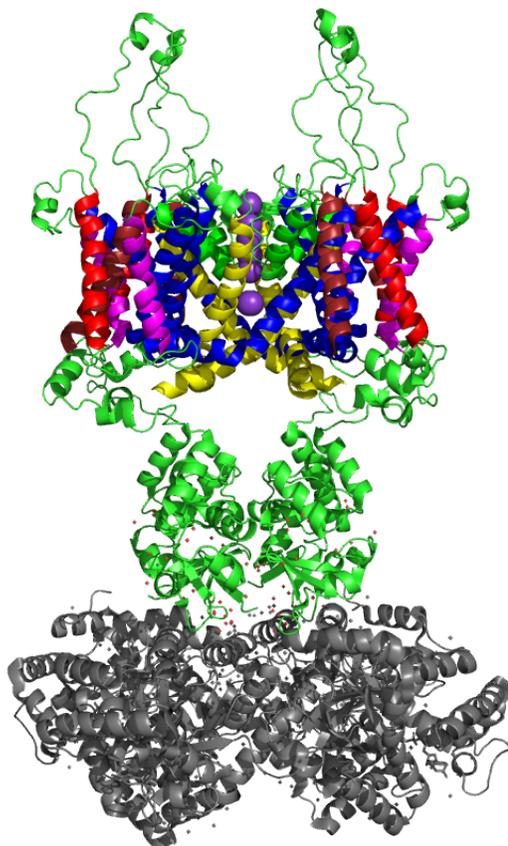


Рис. 4: Структура калиевого канала Kv1.2 крысы. Показаны все 4 изомера. Покрашены спирали S_1 (bromine), S_2 (red), S_3 (magenta), $S_4 + S_4, S_5$ -linker (blue), S_5 (green), S_6 (yellow). Серым цветом покрашена цепь A – цитозольная часть белка (весь остальной белок – цепь B, находится в мембране). Видим, что молекулы воды избегают гидрофобной, мембранной части белка. Фиолетовым показаны ионы калия. В соответствии с моделью 'single file diffusion' мы видим сразу несколько ионов K^+ !

Далее мы будем раскрашивать спирали так же, как сделали это на рисунке 4. Теперь рассмотрим по-отдельности позиции 399, 376, 417. Val-399 находится внутри α -спирали S_6 и смотрит в 'вестибюль' канала (см. рис 5, 6). Это ключевая для функционирования белка полость.

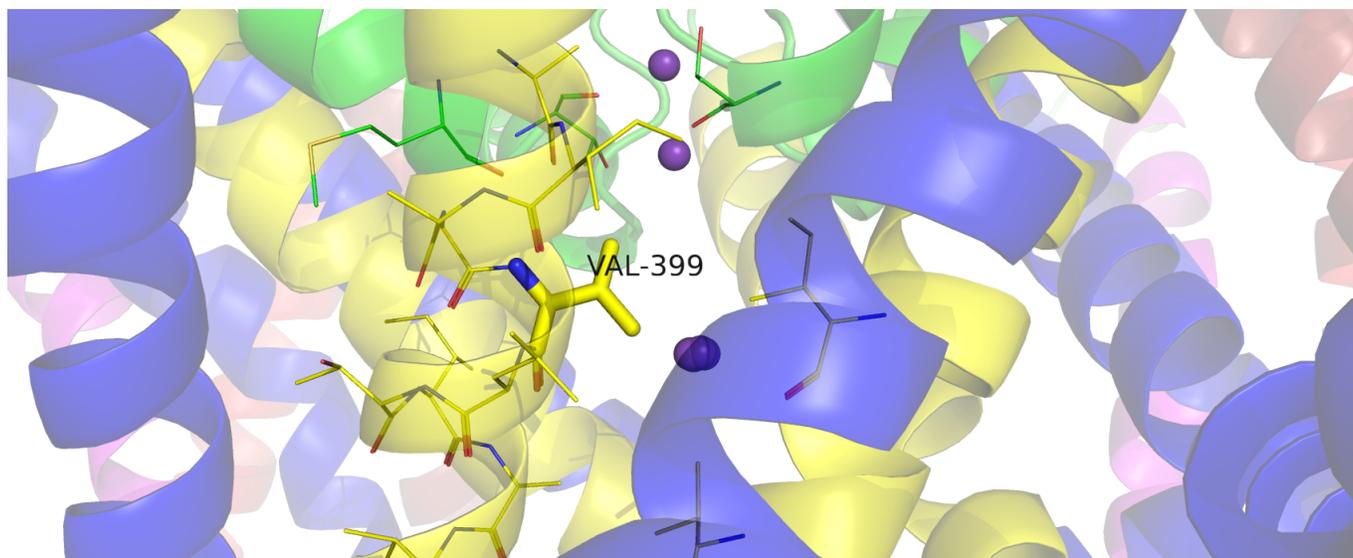


Рис. 5: Валин 399. Вид сбоку: снизу находится цитоплазма. Видим, что, находясь на S_6 α -спирали, Val-399 смотрит в полость 'вестибюля' канала. Здесь и далее 'тетрамер' калия – это баг rumol. На этом месте подразумевается единственный ион K^+ .

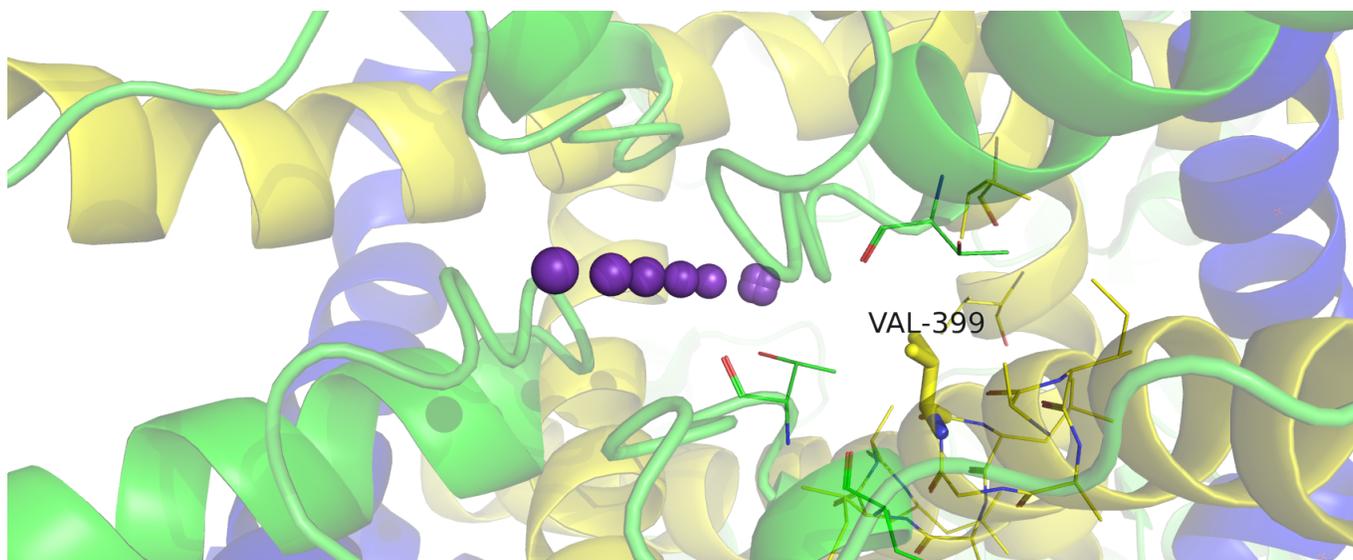


Рис. 6: Валин 399. Вид с внешней стороны клетки. Здесь хорошо видно, что четыре α -спирали S_5 смотрят своими C-концами в одну точку – это как раз то, что мы выше называли upper gate, – селективный для K^+ фильтр.

Водородные связи мы точно не потеряем при замене валина на любую другую аминокислоту, но существенные изменения в структуру мы при этом можем внести. Более крупные аминокислоты могут не поместиться в полость, в которую направлен валин. Кроме того, заменяя валин на аргинин, мы должны учитывать, что мы вносим в эту полость положительный заряд, который, вероятно, сделает белок нефункциональным: +заряженный аргинин будет препятствовать прохождению ионов K^+ по полости канала.

С помощью инструмента Mutagenesis (внутри Wizard) мы сделали замену Val-399 -> Arg-399 (см. рис. 7, 8). Любой из возможных ротамеров аргинина имеет непопустительно высокие показатели Ван-дер-Ваальсовых перекрытий с окружением (предельными допустимыми значениями мы считаем $strain = 20 - 25$, при этом минимальное значение $strain$ для возможных ротамеров аргина оказалось равным 48). На рисунках мы привели ротамер аргинина, имеющий наименьшее перекрытие с соседними остатками ($strain = 48$). Мы видим, что аргинин, пребывая в этом ротамере, как бы 'отворачивается' от полости вестибюля. Представленность этого ротамера в природных структурах составляет 1%.

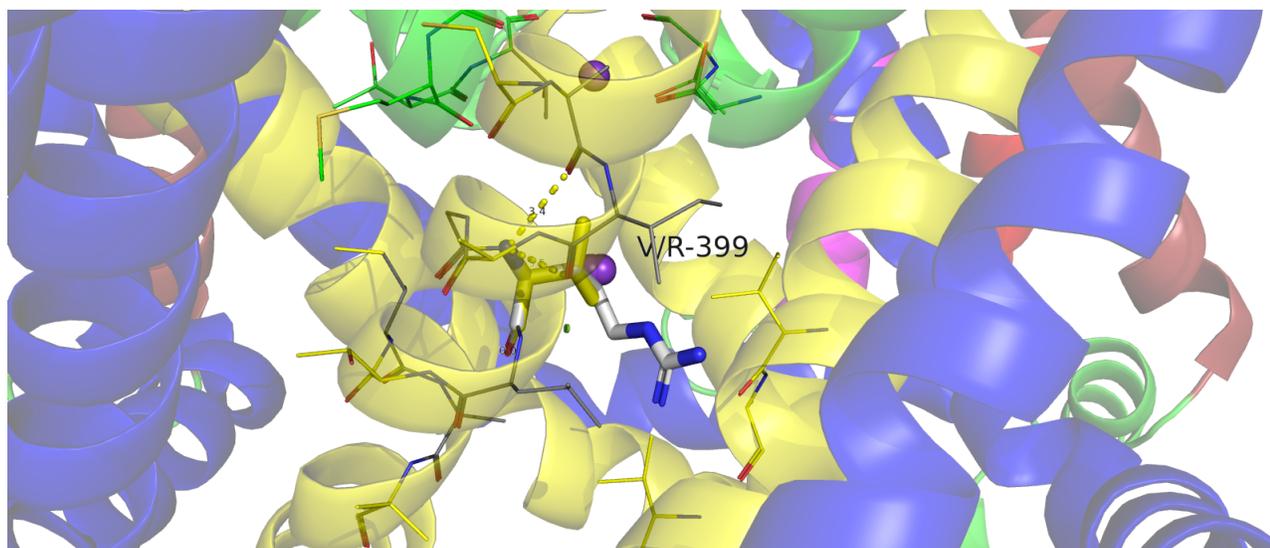


Рис. 7: Аргинин 399. Вид сбоку: снизу находится цитоплазма. Видим, что, находясь на S_6 α -спирали, Arg-399 'отворачивается' от полости 'вестибюля' канала.

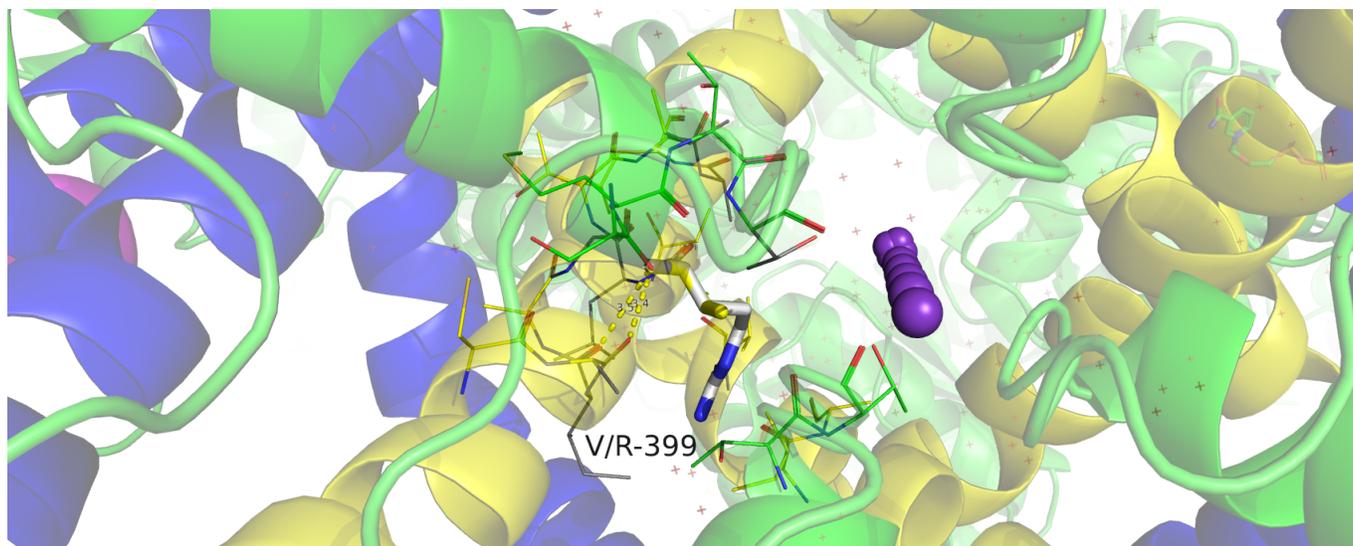


Рис. 8: Аргинин 399. Вид с внешней стороны клетки.

Итак, можно сделать вывод, что подобная мутация, во-первых, несовместима со структурой белка: остаток аргинина не помещается в отведенную для Val-399 полость. Во-вторых, наличие положительно-заряженного остатка в 'вестибюле' канала, вероятно, несовместимо с транспортировкой по каналу ионов K^+ .

Перейдем теперь к остатку Gly-376. Этот остаток находится в петле между α -спиралями S_5 и S_6 . Эти петли выводят 'вестибюль' во внеклеточное пространство. Как мы помним, этот участок обеспечивает селективность к ионам K^+ , мимикрируя атомами кислорода своего остова под водную шубу K^+ (см. рис. 9, 10).

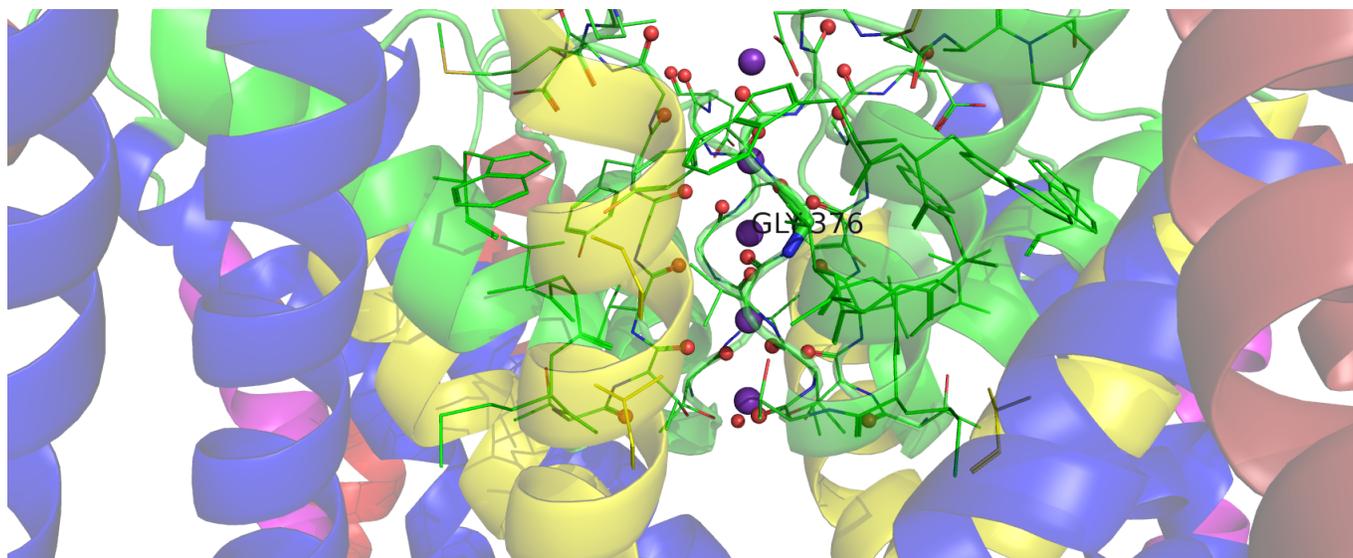


Рис. 9: Глицин 376. Вид сбоку: снизу находится цитоплазма. Кислороды остовов петель между спиральями S_5 и S_6 изображены шариками. Они образуют селективный для ионов калия фильтр. Фиолетовыми шарами, как и раньше, показаны ионы K^+ . Выделенные атомы кислорода изображают водную шубу, характерную для K^+ : по 4 сверху и по 4 снизу от иона калия.

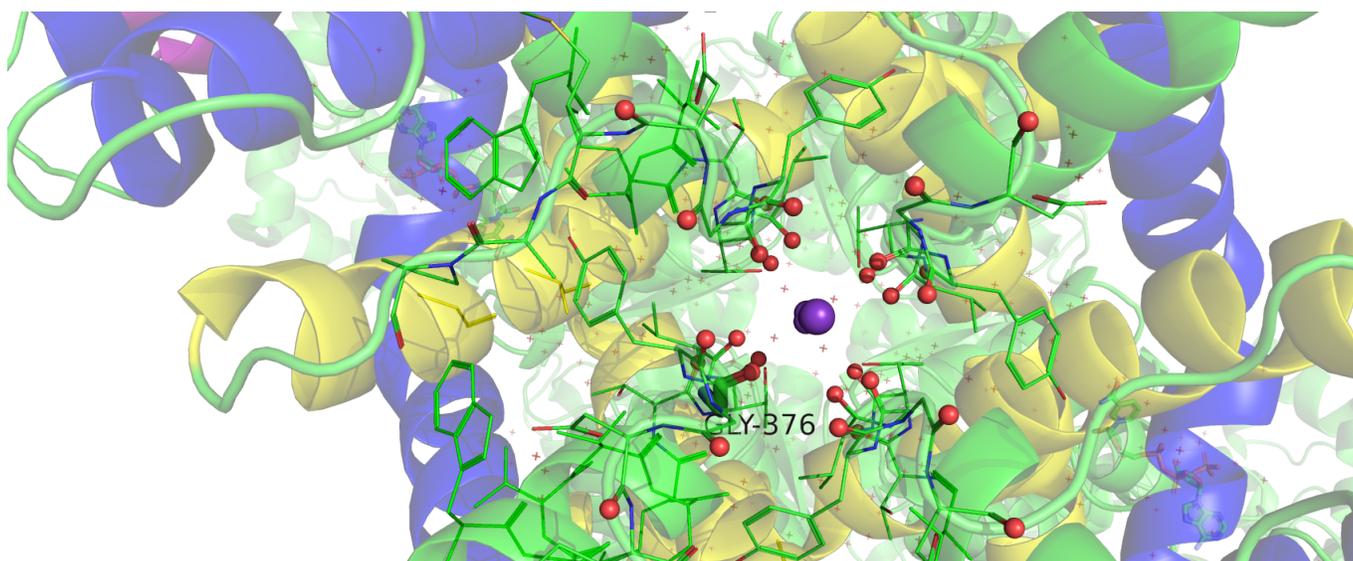


Рис. 10: Глицин 376. Вид с внешней стороны клетки.

Здесь, как и в предыдущем случае, для функционирования белка необходимо оставлять канал пустым (не заслонять его боковыми остатками) (см. рис. 10). Следовательно, если мутировать Gly-376 в лейцин, нужно размещать массивный боковой радикал лейцина вне полости канала. Посмотрим, возможно ли это. Оказывается, что перекрытия для каждого из возможных ротамеров лейцина с окружающими аминокислотными остатками даже хуже, чем в предыдущем случае ($strain_{min} = 104$) (см. рис. 11). При этом оптимальный по перекрытию ротамер имеет представленность в природе около 40%, что не так плохо (но все равно для нас не актуально: лейцин просто не влезает в эту позицию).

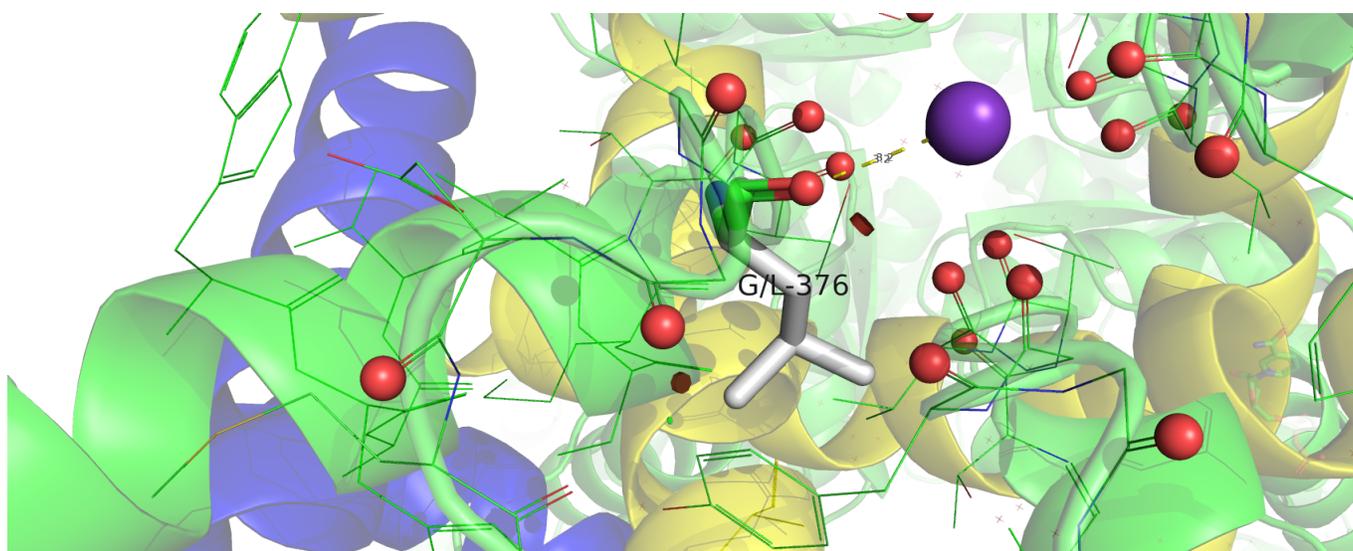


Рис. 11: Лейцин 376. Вид с внешней стороны клетки.

Таким образом, мутация Gly-376 \rightarrow Leu-376 снова оказывается несовместимой со структурой белка, необходимой для выполнения его функции.

Наконец, рассмотрим остаток Tyr-417. Этот остаток принадлежит S_6 α -спирали. В отличие от предыдущих двух случаев, он находится достаточно далеко от полости канала. Тем не менее, область, в которой он лежит, тоже может являться функционально важной. Действительно, остаток тирозина смотрит в сторону S_4, S_5 -линкера (см. рис. 12). Выдвигалась гипотеза, что этот участок белка может быть задействован в закрывании канала в ответ на реполяризацию мембраны [Long et al. (2007)]; см. рис. 13. Кроме того, на сегодняшний день считается установленным, что закрывание / открывание канала сопровождаются движениями сильно положительно заряженной спирали S_4 относительно, в частности, S_6 спирали [Grizel et al. (2014)]; см. рис. 2. Теоретически, остаток Tyr-417 мог бы участвовать в закреплении S_4 относительно S_6 .

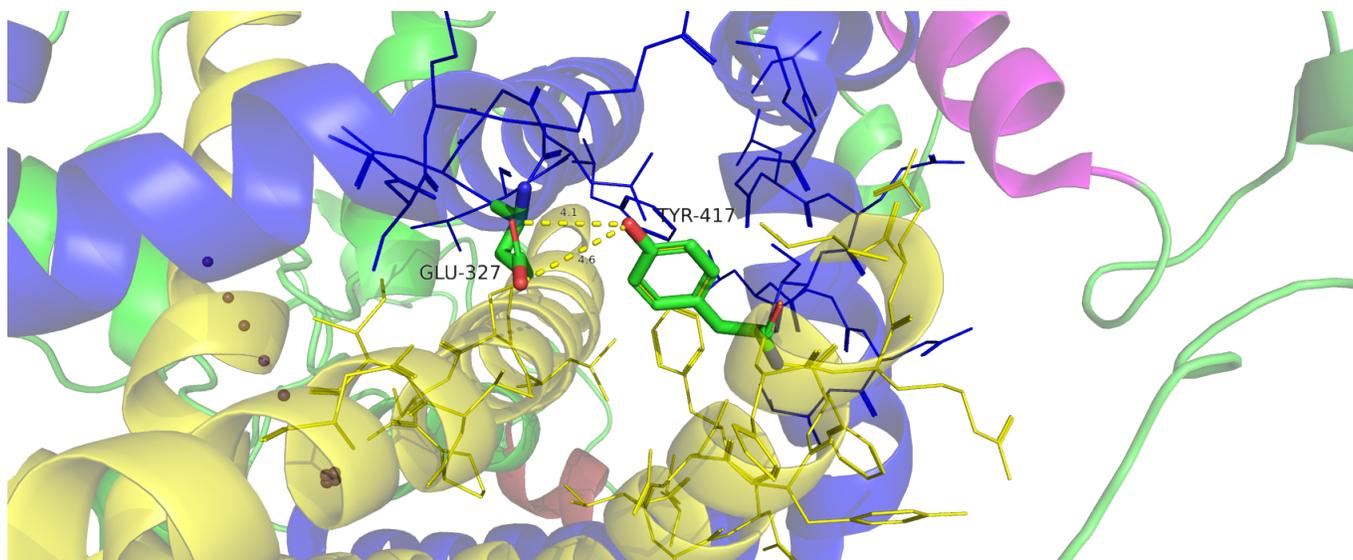


Рис. 12: Тирозин 417. Гипотетическая водородная связь с Glu 327. Видим, что согласно структуре 3lut водородную связь между этими остатками тяжело реализовать.

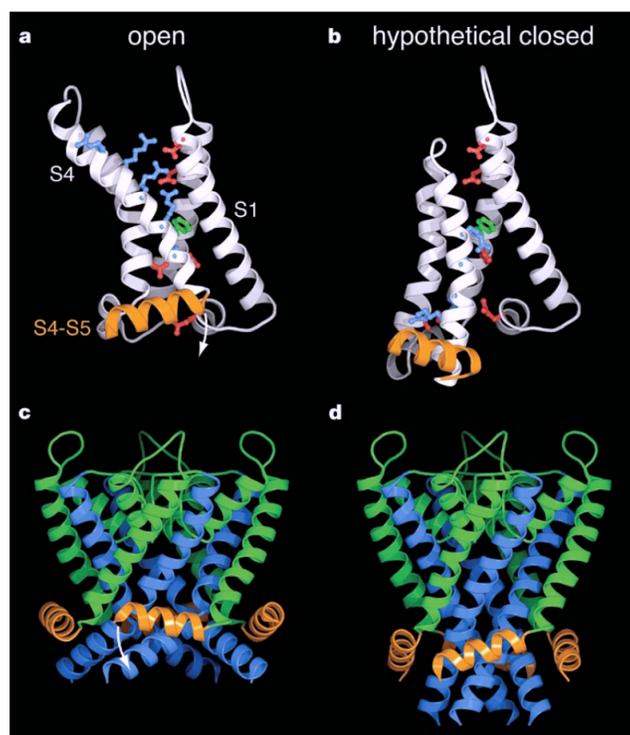


Рис. 13: Гипотетическое участие S_4 , S_5 –линкера в закрывании канала: схема взята из Long et al. (2007).

Мы видим (рис. 12), что согласно 3lut структуре расстояние между остатками Tyr-417 и Glu-327 слишком велико, чтобы между ними могла образовываться водородная связь. Мы решили проверить возможность этого взаимодействия также с точки зрения нашей запасной структуры: 2a79 (см. рис. 14).

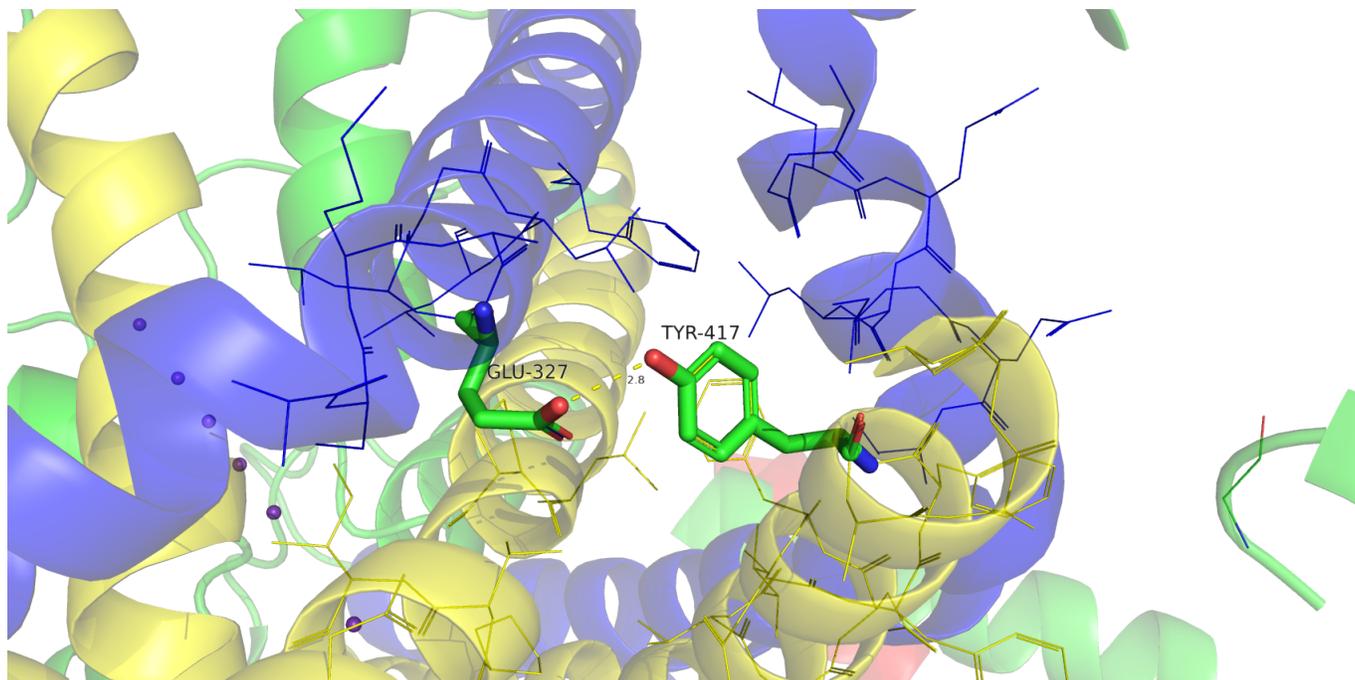


Рис. 14: Тирозин 417. Гипотетическая водородная связь с Glu 327. Видим, что согласно структуре 2a79 водородная связь между этими остатками вполне может существовать.

Здесь расстояние между остатками вполне благоприятствует образованию водородной связи. При замене Tyr-417 -> Phe-417 эта водородная связь, естественно, исчезнет (если она в самом деле существует). Можно спекулировать, что при этом канал может менять свою функцию из-за дестабилизации структуры. В данном случае, замечательным образом оказалось, что мы можем проверить данное утверждение. Действительно, данная мутация была проделана экспериментально в работе [Hattan et al. \(2002\)](#). Оказывается, что она ведет к сильному снижению тока калия через канал. Возможно, эффект объясняется нарушением регуляции открывания / закрывания канала.

5 Благодарности

Я хотел бы поблагодарить Сою Гайдукову за обсуждение практикума и, в частности, эффекта мутации Tyr-417 -> Phe-417!

6 Сессии Румол

https://kodomo.fbb.msu.ru/~osyafinkelberg/term7/prac9/FBB_bioinformatics_Zlobin_prac9.pdf

<https://kodomo.fbb.msu.ru/~osyafinkelberg/term7/prac9/session0.pse>

<https://kodomo.fbb.msu.ru/~osyafinkelberg/term7/prac9/session1.pse>

<https://kodomo.fbb.msu.ru/~osyafinkelberg/term7/prac9/session2.pse>

<https://kodomo.fbb.msu.ru/~osyafinkelberg/term7/prac9/session3.pse>

<https://kodomo.fbb.msu.ru/~osyafinkelberg/term7/prac9/session4.pse>

Список литературы

- Chen, X., Wang, Q., Ni, F., and Ma, J. (2010). Structure of the full-length Shaker potassium channel Kv1.2 by normal-mode-based X-ray crystallographic refinement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(25):11352–11357.
- Degrève, L., Vecchi, S. M., and Junior, C. Q. (1996). The hydration structure of the Na⁺ and K⁺ ions and the selectivity of their ionic channels. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1274(3):149–156.
- Doyle, D. A., Cabral, J. M., Pfuetzner, R. A., Kuo, A., Gulbis, J. M., Cohen, S. L., Chait, B. T., and MacKinnon, R. (1998). The Structure of the Potassium Channel: Molecular Basis of K⁺ Conduction and Selectivity. *Science*, 280(5360):69–77.
- Grizel, A. V., Glukhov, G. S., and Sokolova, O. S. (2014). Mechanisms of activation of voltage-gated potassium channels. *Acta Naturae*, 6(4):10–26.
- Hattan, D., Nesti, E., Cachero, T. G., and Morielli, A. D. (2002). Tyrosine Phosphorylation of Kv1.2 Modulates Its Interaction with the Actin-binding Protein Cortactin. *Journal of Biological Chemistry*, 277(41):38596–38606.
- Hille, B. and Schwarz, W. (1978). Potassium channels as multi-ion single-file pores. *Journal of General Physiology*, 72(4):409–442.

Long, S. B., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2005). Crystal Structure of a Mammalian Voltage-Dependent *Shaker* Family K⁺ Channel. *Science*, 309(5736):897–903.

Long, S. B., Tao, X., Campbell, E. B., and MacKinnon, R. (2007). Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature*, 450(7168):376–382.

Yellen, G. (2002). The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature*, 419(6902):35–42.