

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Май Лиша

**Молекулярное моделирование структурных перестроек канала KCNQ1
под влиянием биоактивных соединений и мутаций**

Специальность 1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на кафедре биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

- Научный руководитель** – *Новоселецкий Валерий Николаевич*, кандидат физико-математических наук
- Официальные оппоненты** – *Крупянский Юрий Федорович*, доктор физико-математических наук, Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, руководитель Отдела строения вещества;
- Кубасова Наталия Алексеевна*, доктор физико-математических наук, Научно-исследовательский институт механики МГУ имени М.В. Ломоносова, ведущий научный сотрудник лаборатории биомеханики;
- Попинако Анна Владимировна*, кандидат биологических наук, Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, Направление «Вычислительная биология», старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится « 21 » мая 2026 г. в 14 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, ауд. «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3853>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

П.В. Фурсова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Ген *KCNQ1* кодирует основную субъединицу KCNQ1 потенциал-управляемого калиевого канала, так же имеющего обозначение KCNQ1 (далее во избежание путаницы мы будем использовать родовые слова «канал» или «субъединица»). В условиях *in vitro* четыре субъединицы KCNQ1 (иначе обозначаемой KvLQT1 или Kv7.1) образуют гомотетрамер, проявляющий свойства канала и обеспечивающий потенциал-зависимый быстро активирующийся и медленно деактивирующийся ток ионов калия из клетки наружу (I(Ks)). Однако *in vivo* субъединицы KCNQ1 всегда образуют гетеромультимерные комплексы с дополнительными субъединицами семейства KCNE (KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE4 или KCNE5) (Рисунки 1, 2), причем эти комплексы демонстрируют свойства, заметно отличающиеся от свойств канала из одних лишь субъединиц KCNQ1. Для тканей сердца характерно наличие комплекса KCNQ1/KCNE1, который принимает участие в регуляции возбудимости кардиомиоцитов и важен для нормального функционирования миокарда. В невозбудимых тканях отмечается существование комплекса KCNQ1/KCNE3, который стал первым комплексом такого типа с известной структурой (pdb id 6uzz, 6v00, 6v01, Sun & MacKinnon, 2020) (Рисунок 2). Вместе с тем, несмотря на значительный прогресс последних лет в изучении структуры каналов, конформация линкеров HA-NB и HC-HD остаётся неизвестной.

Принципиально важную роль в функционировании канала KCNQ1 и каналов KCNQ1/KCNE играют молекулы фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP2), которые обеспечивают сопряжение потенциал-чувствительного домена (ПЧД) и порового домена (ПД), необходимое для активации канала. Механизм этой активации, однако, в настоящее время изучен недостаточно.

Нарушения функции комплексов KCNQ1/KCNE связаны с рядом наследственных и приобретенных заболеваний, причем наиболее распространенным среди наследственных заболеваний является синдром удлиненного интервала QT (long QT syndrom, LQTS), который получил свое название из-за удлинения интервала QT пациента на ЭКГ.

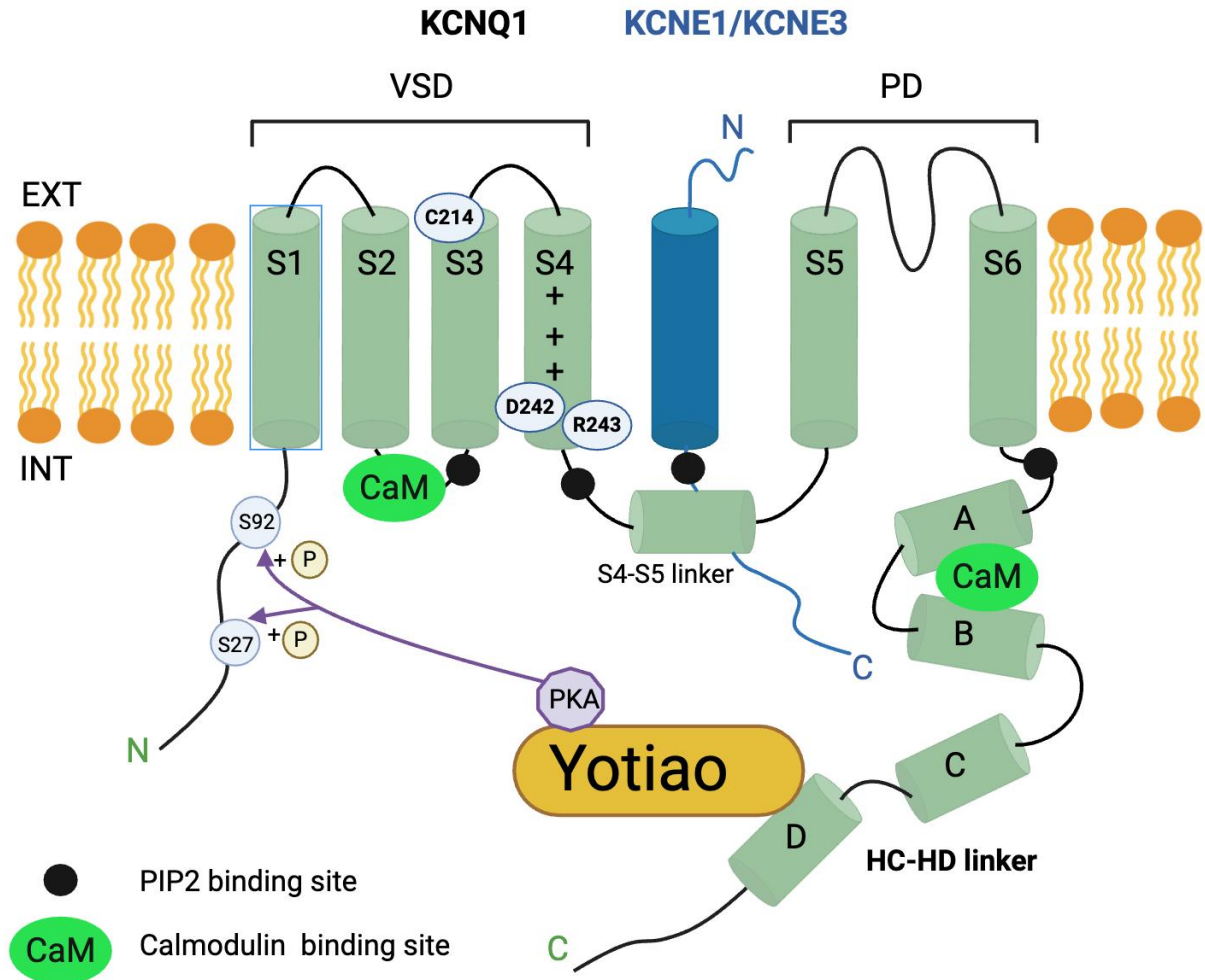


Рисунок 1. Схематическое изображение основной субъединицы **KCNQ1** в комплексе с дополнительными субъединицами **KCNE1(KCNE3)**, каркасным белком **Yotiao** и протеинкиназой **A (PKA)**. Субъединица **KCNQ1** содержит 10 α -спиралей (S1-S6, HA, HB, HC, HD), первые шесть из которых являются трансмембранными. Четыре первых спирали (S1-S4) формируют потенциал-чувствительный домен (ПЧД, англ. Voltage-sensing domain, VSD), причем локальным сенсором изменения потенциала является положительно заряженная спираль S4. Две оставшиеся спирали (S5-S6) образуют поровый домен (ПД, англ. pore domain, PD) субъединицы, который при тетрамеризации формирует поровый домен канала. Во внутриклеточном домене канала спирали HA и HB каждой субъединицы образуют друг с другом подобие суперспирали, которую плотно охватывает молекула кальмодулина (CaM), а спирали HC и HD четырех субъединиц образуют тетрамерные суперспирали. Отмечены места контакта с молекулами кальмодулина (CaM) и фосфолипидом PIP2. Показано расположение подверженных фосфорилированию остатков серина (S27, S92), а также рассматриваемых в данной работе остатков цистеина C214, аспартата D242 и аргинина R243.

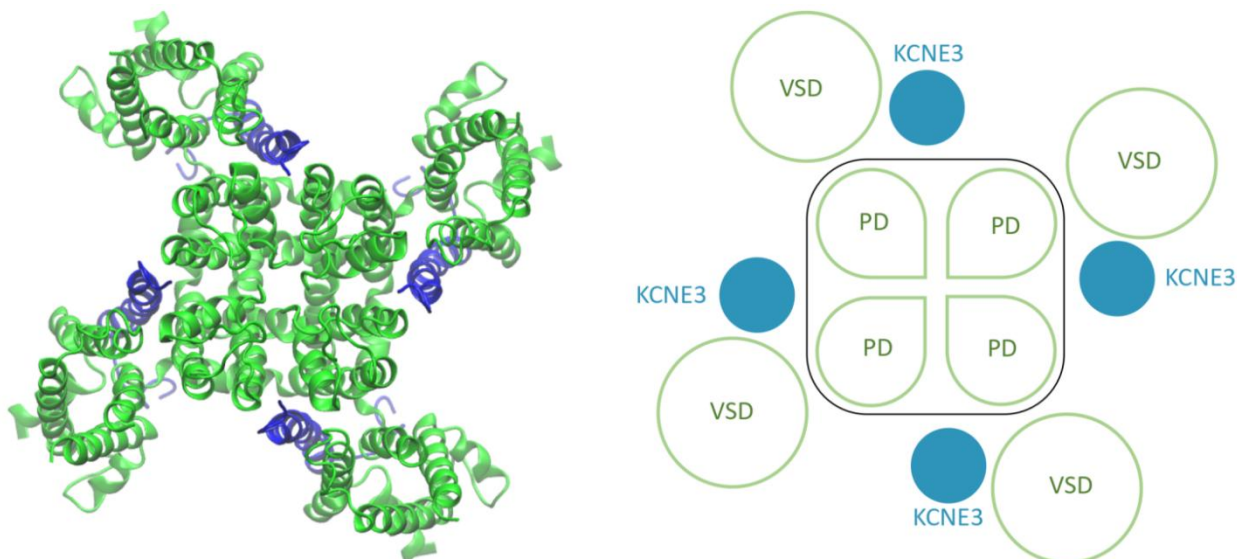


Рисунок 2. Трансмембранный домен гетеромерного канала KCNQ1/KCNE3, структура которого получена методом крио-ЭМ (pdb id 6v01) (вид с внеклеточной стороны): основные субъединицы KCNQ1 (показаны зелёным) в комплексе с дополнительными субъединицами (показаны синим) KCNE3 (слева молекулярная визуализация в ленточном представлении, справа схематическое изображение). VSD - потенциал-чувствительный домен, PD - поровый домен (селективный фильтр находится в центре тетрамера поровых доменов и не обозначен).

Среди биологически активных соединений растительного происхождения многие известны своей активностью в отношении канала KCNQ1, однако молекулярные механизмы этой активности остаются малоизученными. Особый интерес представляет выделяемое из кустарника *Mallotus oppositifolius* низкомолекулярное соединение маллотоксин (MTX) (Рисунок 4), который проявляет разнонаправленную модуляцию: оно усиливает токи комплекса KCNQ1/KCNE1, но при этом ингибирует токи комплекса KCNQ1/KCNE3 (De Silva *et al.*, 2018). Понимание такого рода разнонаправленной модуляции необходимо для разработки селективных модуляторов работы комплексов KCNQ1/KCNE в различных тканях.

Степень разработанности темы исследования

В последние годы с помощью методов крио-ЭМ было расшифровано несколько структур канала KCNQ1 в различных состояниях, однако структура некоторых его фрагментов по-прежнему почти не изучена. Одним из таких является фрагмент, состоящий из внутриклеточных спиралей C и D и линкера между ними (HC–HD linker) (остатки 535–625) (Рисунок 1). При этом структура отдельных спиралей C и D считается известной, в то время как для линкера известны лишь карты электронной плотности с низким разрешением. Известно однако, что этот линкер необходим для взаимодействия с каркасным белком Yotiao, который, в свою очередь, связывается с протеинкиназой A (PKA) для модуляции фосфорилирования

канала KCNQ1 (Рисунок 1). Неудивительно, что мутации в этом линкере нарушают сборку комплекса KCNQ1/Yotiao/РКА, вызывая синдром удлиненного интервала QT 1-го типа (LQT1) (Li *et al.*, 2019). Отсутствие данных высокого разрешения о структуре линкера, равно как и его молекулярной модели, представляет собой препятствие для понимания тех процессов регуляции канала, которые зависят от связывания с Yotiao.

Для субъединицы KCNQ1 описано более двух сотен мутаций, связанных с различными заболеваниями, а его дисфункция вызывает синдром LQT1, фибрилляцию предсердий и другие жизнеугрожающие аритмии. Патогенные мутации D242N и R243H в субъединице KCNQ1 расположены в области её взаимодействия с субъединицами KCNE1 (KCNE3) и фосфолипидом PIP2 (Рисунок 1). Однако молекулярные механизмы, посредством которых эти мутации нарушают взаимодействия основной субъединицы KCNQ1 с дополнительными субъединицами KCNE1 (KCNE3) и фосфолипидом PIP2, остаются малоизученными.

Ещё одной причиной нарушения функции канала KCNQ1 является окислительный стресс. В частности, это может быть связано с окислением остатка Cys214 на внеклеточной стороне спирали S3 (Рисунок 1), которое изменяет кинетику канала и дестабилизирует тетрамерную сборку (Kerst *et al.*, 2002; Bates *et al.*, 2023). В связи с этим примечательно, что канал KCNQ1 также модулируется и некоторыми антиоксидантами (Redford&Abbott, 2020), однако молекулярный механизм этого эффекта остаётся неизвестным. Можно предположить, что связывание антиоксидантов в непосредственной близости от остатка Cys214 могло бы препятствовать его окислению и, тем самым, способствовать сохранению функции канала.

Как уже было сказано, для многих природных биологически активных соединений молекулярные механизмы активности в отношении канала KCNQ1 остаются малоизученными. Согласно некоторым сообщениям, такие природные соединения активируют канал KCNQ1 (Yan *et al.*, 2023), при этом сайты их связывания остаются неизвестными. Вместе с тем, данные соединения являются активными компонентами многих растительных экстрактов (таких как экстракты *E. ulmoides*, *C. officinalis* и др.), известных своей антиоксидантной способностью.

В данной работе исследованы молекулярные основы разнонаправленной модуляции каналов KCNQ1/KCNE1 и KCNQ1/KCNE3 маллотоксином, молекулярное строение линкера HC-HD канала KCNQ1, рассмотрено влияние мутаций D242N и R243H на динамические свойства канала KCNQ1 и его взаимодействия с субъединицей KCNE3 и фосфолипидом PIP2, а также проведено систематическое количественное сравнение антиоксидантной способности ряда растительных экстрактов и предложен молекулярный механизм антиоксидантного действия некоторых компонентов этих экстрактов на каналы KCNQ1.

Цель и задачи исследования

Цель данного исследования — определить особенности молекулярной структуры канала KCNQ1 и его комплексов с субъединицами семейства KCNE, а также его структурные перестройки под влиянием ряда биологически активных соединений (включая антиоксиданты) и патогенных мутаций.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Выяснение молекулярной основы разнонаправленного эффекта МТХ на комплексы KCNQ1/KCNE1 и KCNQ1/KCNE3 с помощью методов молекулярного моделирования.
2. Построение структурной модели линкера HC-HD C-концевого домена канала KCNQ1 путем применения передовых методов молекулярного моделирования к ранее опубликованным картам электронной плотности, полученным методом крио-ЭМ.
3. Исследование влияния некоторых связанных с синдромом LQT1 мутаций канала KCNQ1 (D242N и R243H) на структурную стабильность и динамику комплекса KCNQ1/KCNE3 с помощью полноатомного моделирования молекулярной динамики.
4. Идентификация потенциальных сайтов связывания природных активаторов канала KCNQ1, включая таншинон ПА и ресвератрол.
5. Количественная оценка антиоксидантной способности девяти растительных экстрактов, выявление наиболее активного экстракта, а также моделирование возможных способов связывания содержащихся в них биоактивных соединений (в частности, рутина и кверцетина) с каналом KCNQ1 для выяснения их потенциального механизма защиты от окислительного стресса.

Научная новизна работы

Методами молекулярного моделирования прояснены некоторые особенности структуры канала KCNQ1 и его комплексов с субъединицами семейства KCNE, а также его структурные перестройки под влиянием ряда биологически активных соединений и патогенных мутаций. Выявлены молекулярные основы разнонаправленной модуляции каналов KCNQ1/KCNE1 и KCNQ1/KCNE3 маллотоксином. На основе данных низкого разрешения, опубликованных ранее, предложена структурная модель линкера HC-HD C-концевого домена канала KCNQ1. На примере патогенных мутаций D242N и R243H в субъединице KCNQ1 рассмотрено влияние аминокислотных замен на изменение компактности молекулы канала, а также на изменение поверхности свободной энергии. Кроме того, изучено изменение взаимодействий с молекулами PIP₂. Проведено систематическое экспериментальное сравнение антиоксидантной способности девяти растительных экстрактов, причем экстракт *E. ulmoides* был идентифицирован как наиболее активный. Выявлены предполагаемые сайты связывания природных активаторов канала KCNQ1 — кверцетина, таншинона ПА и ресвератрола. Для рутина и кверцетина, являющихся компонентами экстракта *E. ulmoides*, предложен молекулярный механизм антиоксидантного действия в отношении канала KCNQ1.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанная модель гибкого линкера HC-HD является основой для изучения структуры комплекса KCNQ1/Yotiao/РКА и фосфорилирования остатков N-концевого домена канала KCNQ1. Рассмотрение конформационно-динамических изменений, вызванных патогенными мутациями D242N и R243H, углубляет понимание механизмов функционирования канала KCNQ1 и позволяет наметить новые подходы к терапии синдрома LQT1. На примере природных биологически активных веществ показано, что сайты их связывания могут располагаться как на внеклеточной поверхности молекулы канала KCNQ1, так и на поверхности, обращённой в мембрану. Разнообразие сайтов связывания позволяет объяснить как активирующий, так и антиоксидантный эффекты кверцетина в отношении канала KCNQ1. Экспериментальное исследование растительных экстрактов показывает их высокий потенциал в качестве источника природных соединений, активных в отношении канала KCNQ1. Предложенные в работе подходы к выявлению сайтов связывания низкомолекулярных соединений с каналом KCNQ1 способствуют разработке новых селективных модуляторов этого канала для лечения синдрома удлиненного интервала QT 1-го типа (LQT1) и фибрилляции предсердий.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с применением междисциплинарного подхода, который сочетает методы молекулярного моделирования и биохимические методы. В частности, были использованы методы моделирования на основании гомологии, методы расчёта электростатического потенциала, методы молекулярного докинга, методы построения моделей по данным карт электронной плотности низкого разрешения, методы молекулярной динамики, а также анализ общего содержания фенолов (TPC), анализ общей антиоксидантной способности по восстановлению железа (FRAP), и анализ ингибирования перекисного окисления липидов (LPIС).

Положения, выносимые на защиту

1. Расчет распределения электростатического потенциала (ЭСП) вблизи поверхности белков проясняет сайты связывания заряженных лигандов и раскрывает их регуляторный эффект. Ингибирующее действие маллотоксина на комплекс KCNQ1/KCNE3 является результатом связывания его отрицательно заряженной молекулы в области высоких положительных значений ЭСП в поре канала, в то время как стабилизирующее действие на открытое состояние комплекса KCNQ1/KCNE1 является результатом связывания в аналогичных областях на периферии трансмембранного домена комплекса. При расчёте значений ЭСП существенным является учёт отрицательно заряженных молекул PIP2, связанных с субъединицами KCNQ1 в обоих комплексах.
2. Анализ карт электронной плотности невысокого разрешения в сочетании с методами молекулярного моделирования позволяет получать модели гибких фрагментов белковой структуры. В области сопряжения суперспиральных доменов HC и HD канала KCNQ1 присутствует круговое смещение доменов в тетрамере, при котором спирали от

соседних субъединиц формируют структуру типа «сверхспираль» (coiled-coil). Спирале-подобная структура самого линкера объясняет гибкость сопряжения доменов HC и HD и открывает новые возможности для изучения Yotiao-опосредованного макромолекулярного комплекса. Патогенные мутации D242N и R243H в субъединице KCNQ1 по-разному дестабилизируют комплекс KCNQ1/KCNE3 за счет увеличения конформационной гибкости потенциал-чувствительного домена, при этом мутация R243H вызывает более выраженное структурное возмущение.

3. Комбинация экспериментальных методов и методов молекулярного моделирования позволяет прояснить биологическую активность растительных экстрактов. Сайты связывания основных антиоксидантных компонентов *E.ulmoides*, рутина и кверцетина, расположены в непосредственной близости от редокс-чувствительного остатка C214 канала KCNQ1, что объясняет их антиоксидантный эффект в отношении этого канала. Кроме того, кверцетин, таншинон ПА и ресвератрол активируют канал KCNQ1, связываясь в консервативном сайте, образованном спиральным линкером S4-S5 и спиральями S5 и S6 порового домена.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Достоверность результатов и выводов, представленных в данной диссертации, подтверждается использованием современных методов вычислительной биофизики и биохимии, публикацией ключевых результатов в рецензируемых научных журналах, а также их представлением и обсуждением на международных научных конференциях.

Основные результаты диссертации опубликованы в 4 научных статьях, из них 3 в рецензируемых журналах, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index". Общий объем публикаций составляет 2,1 п.л.

Результаты диссертации были представлены для экспертного обсуждения и рецензирования на 9 международных научных конференциях и форумах. Наиболее значимые из этих результатов были представлены на научных мероприятиях в Москве: на форумах, проводимых при поддержке Отдела по делам образования Посольства КНР в России, включая Международный форум молодых студентов и ученых «Воробьевы горы» (2023, 2024) и Всероссийский научный форум китайских студентов (2023); на Международной конференции «БИОМЕМБРАНЫ 2024», организованной МФТИ. Дополнительные результаты были представлены и обсуждены на ряде конференций, проходивших в Университете МГУ-ППИ в Шэньчжэне (Китай): Международная научная конференция «Ломоносов» (2022, 2023); 3-я Международная конференция «Современные тенденции и достижения в науках о жизни» (2023); 2-я Международная конференция и школа по нанобиотехнологиям (2022); 1-я Международная студенческая конференция по биологии (2021).

Личный вклад автора

Личный вклад соискателя Май Лиши присутствует на всех этапах исследования. В работе [1] автор принимала участие в приготовлении водных экстрактов растений, определении общего содержания водорастворимых фенолов и общей антиоксидантной активности. В работах [2] и [3] автор выполнила моделирование структуры С-концевого HC-HD домена канала KCNQ1, оценила стабильность модели посредством методов молекулярной динамики и согласованность модели с доступными экспериментальными данными. В работе [4] автор выполнила моделирование структуры комплекса KCNQ1/KCNE1, изучила распределение электростатического потенциала вокруг комплексов KCNQ1/KCNE1 и KCNQ1/KCNE3 в присутствии молекул PIP2, выполнила молекулярный докинг для определения вероятных сайтов связывания маллотоксина в этих комплексах и предложила гипотезу, объясняющую разнонаправленное действие этого лиганда на указанные комплексы.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 129 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, раздела материалов и методов, раздела результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа содержит 37 рисунков, 3 таблицы и список литературы из 220 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Обоснована актуальность темы диссертации, формулируется цель и задачи исследования, приводятся положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы

Представлен систематический анализ современной научной литературы, посвященной структуре, функции и регуляции калиевого канала KCNQ1. Рассматривается физиологическое значение канала, его роль в патологиях (каналопатиях), а также молекулярные механизмы его модуляции вспомогательными субъединицами, сигнальными молекулами (PIP2) и фармакологическими соединениями. Глава обобщает текущий уровень знаний и определяет ключевые нерешенные вопросы, которые стали предметом настоящего исследования.

Материалы и методы исследования

В данной главе представлено описание объектов исследования, включая комплексы каналов дикого типа и мутантных форм, а также набор биологически активных соединений. Описаны экспериментальные методы *in vitro* для оценки антиоксидантной способности растительных экстрактов и вычислительные методы *in silico*, включая моделирование на основании гомологии, молекулярный докинг, полноатомное моделирование молекулярной динамики (МД) и последующий анализ траекторий.

Результаты и их обсуждение

Результат 1. Разнонаправленные регуляторные эффекты маллотоксина на комплексы канала KCNQ1 с дополнительными субъединицами KCNE1 и KCNE3.

Структурная модель комплекса KCNQ1/KCNE1 была построена в данной работе методом гомологического моделирования на основе структуры комплекса KCNQ1/KCNE3, известной по данным криоэлектронной микроскопии (Sun&MacKinnon, 2020) (pdb id 6v00). Для расчёта электростатического потенциала (ЭСП) как экспериментальная структура, так и наша модель были дополнительно подготовлены: в частности, были фосфорилированы необходимые остатки в молекулах субъединицы KCNQ1 и кальмодулина CaM. Кроме того, особое внимание было уделено расположению отрицательно заряженных молекул фосфолипидов PIP2. Визуальный анализ распределения ЭСП выявил существенные различия между комплексами KCNQ1/KCNE1 и KCNQ1/KCNE3: в первом случае области высоких значений положительного ЭСП расположены на периферии ТМ домена, а во втором случае к ним добавляются области, расположенные ближе к центру и в самом центре (Рисунки 4, 5).

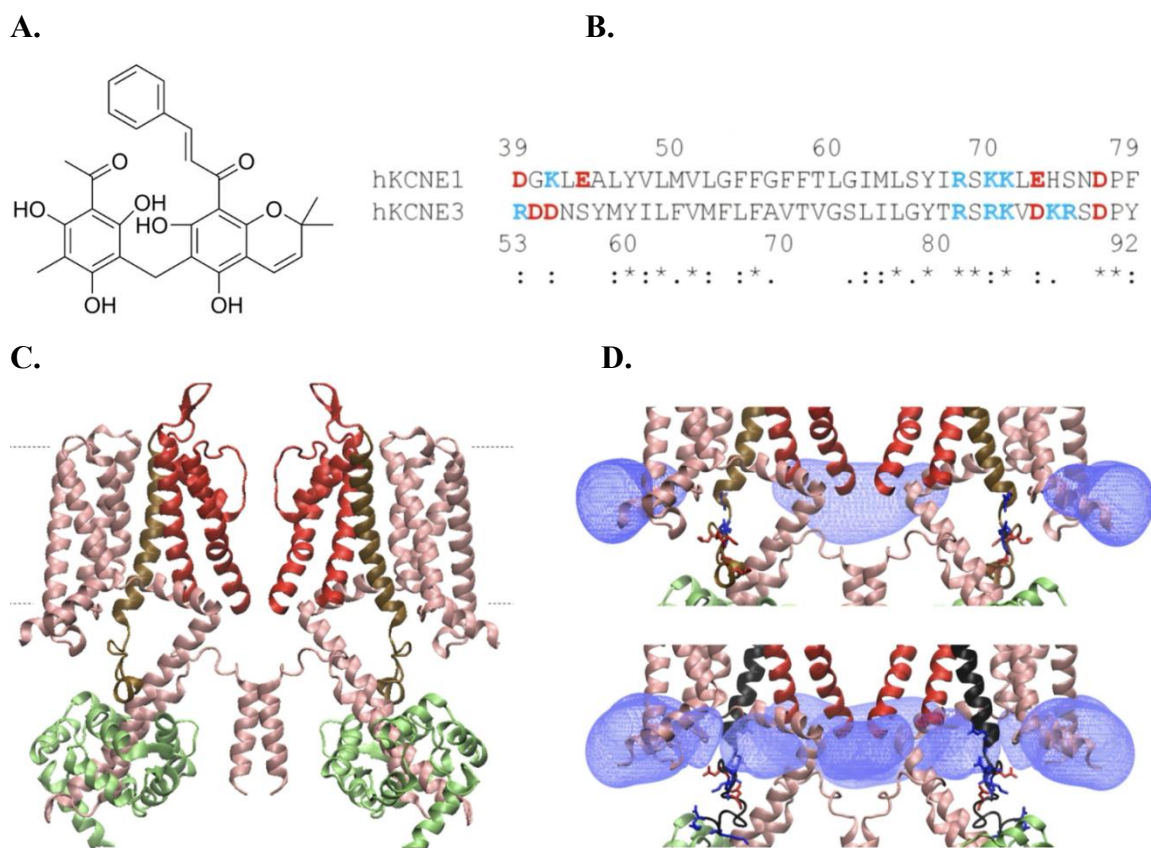


Рисунок 4. (A) Химическая структура маллотоксина (MTX); (B) Выравнивание последовательностей бета-субъединиц KCNE1 и KCNE3 человека (положительно заряженные остатки показаны синим, отрицательно заряженные — красным). (C) Структура комплекса KCNQ1/KCNE1; (D) Карты электростатического потенциала (ЭСП) комплексов KCNQ1/KCNE1 (сверху) и KCNQ1/KCNE3 (снизу). Цепи KCNE1(3) показаны коричневым (черным); цепи CaM — зеленым. Фиолетовые области указывают на высокие положительные значения ЭСП на внутриклеточной стороне трансмембранного домена. Заряженные остатки в линкере KCNE1(3) S2-S3 показаны в виде стержней (Arg, Lys синим; Asp, Glu красным).

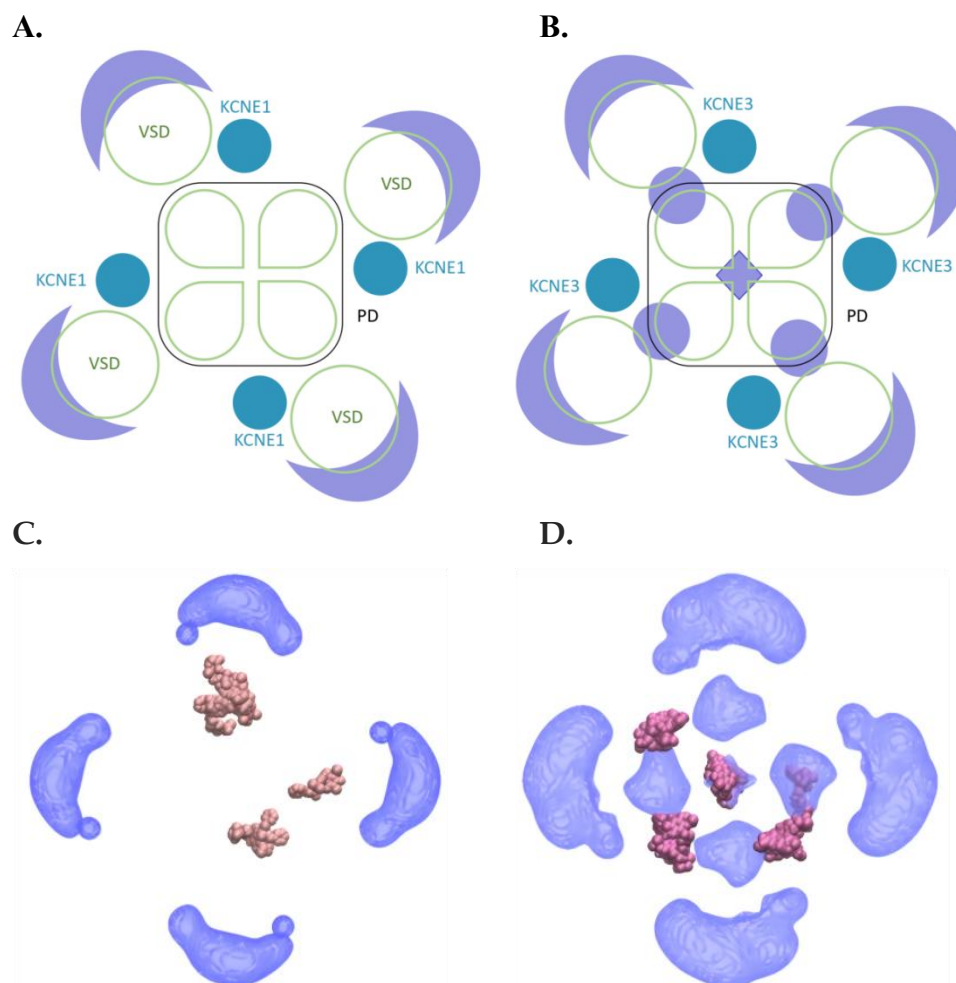


Рисунок 5. (А, В) Схематическое изображение комплексов (А) $KCNQ1/KCNE1$ и (В) $KCNQ1/KCNE3$. Субъединицы $KCNQ1$ показаны зелёным, субъединицы $KCNE1$ и $KCNE3$ показаны синим. Фиолетовые области соответствуют областям с высоким положительным значением электростатического потенциала (ЭСП), расположенным с внутриклеточной стороны трансмембранного домена комплексов. (С, D) Результаты докинга МТХ и области с высоким положительным значением ЭСП комплексов $KCNQ1/KCNE_x$ (вид с внеклеточной стороны). (С) Результаты для комплекса $KCNQ1/KCNE1$. Все решения располагаются на периферии порового домена, (D) Результаты для комплекса $KCNQ1/KCNE3$. Одно из решений докинга располагается в центре порового домена, блокируя ток ионов.

Учитывая, что молекула МТХ при физиологических значениях рН заряжена отрицательно, мы предположили, что это соединение связывается преимущественно в областях с высоким положительным значением ЭСП, что в случае комплекса $KCNQ1/KCNE3$ приводит к уменьшению ионного потока и фактическому ингибированию этого канала. Эта гипотеза была подтверждена путем проведения молекулярного докинга (Рисунок 5). Более того, рассмотрение решений докинга молекулы МТХ к комплексу $KCNQ1/KCNE1$ показывает, что они стабилизируют его структуру в открытом состоянии, объясняя активаторную роль МТХ. Полученные данные проясняют разнонаправленную модулирующую роль МТХ в комплексах $KCNQ1/KCNE$ и способствуют разработке терапевтических подходов для лечения связанных с ним ионных каналопатий.

Результат 2. Молекулярное моделирование суперспиральных доменов HC и HD канала KCNQ1, а также соединяющего их линкера HC-HD

Наша предварительная модель тетрамерного внутриклеточного домена, включающего спирали HC, HD и гибкий линкер между ними, была построена в данной работе на основе имеющихся экспериментальных структур фрагментов канала KCNQ1 (pdb id 6v00 для HC и pdb id 3bj4 для HD) методом моделирования на основании гомологии. В соответствии с аминокислотными последовательностями этих шаблонов линкер получил длину 21 остаток (567-587), а сопоставление его структурной модели с соответствующим участком карты электронной плотности, опубликованной ранее (EMD-20966), показало их плохое соответствие. Для улучшения соответствия мы удлиннили домен HD на два витка в сторону N-конца по сравнению с его ранее опубликованной структурой (pdb id 3bj4), что привело к укорочению линкера до 14 остатков (567-580) и, тем самым, позволило лучше вписать модель линкера в соответствующий ему участок карты электронной плотности (Рисунок 6С, стрелка). Кроме того, паттерн расположения областей с высоким значением электронной плотности вокруг линкера HC-HD говорит о том, что между четырьмя субъединицами канала KCNQ1 на этом участке должен происходить круговой обмен доменами (domain swap) (Рисунок 6В). В соответствии с этими наблюдениями, была построена окончательная модель спирали HC и удлиненной спирали HD, соединенных спиралевидным линкером HC-HD. Отметим, что в полученной модели остатки серина S571 и S577 оказались экспонированными, что согласуется с литературными данными об их возможном фосфорилировании.

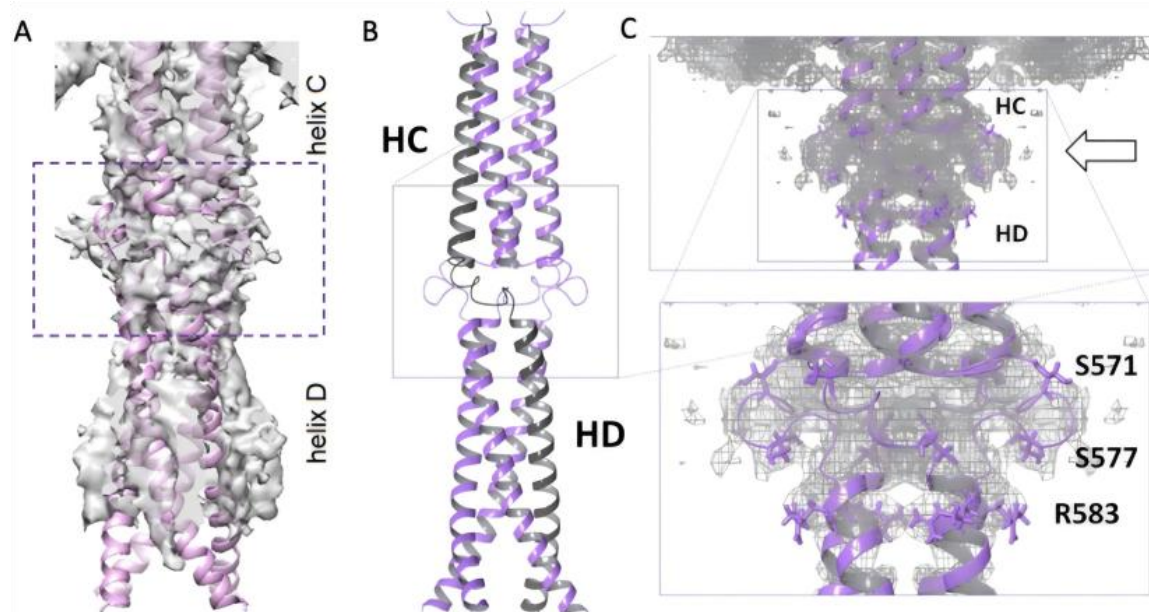


Рисунок 6. (А) Молекулярная модель спиралей C и D канала KCNQ1, основанная на модели из (В) и подогнанная к карте электронной плотности, полученной в данном исследовании; гибкий линкер выделен пунктирным прямоугольником. (В) Модель области HC-HD, построенная с помощью ColabFold. Четко виден обмен цепями (цепь выделена черным). (С) Подгонка модели к карте электронной плотности (серая сетка) показывает, что остатки S571 и S577 экспонированы на поверхность цитоплазматической части.

Результат 3. Влияние мутаций R243H и D242N на структуру и динамику комплекса KCNQ1/KCNE3

Для выявления доминирующих компонент в тепловом движении молекулы канала KCNQ1 был проведен анализ главных компонент (PCA) траекторий молекулярной динамики (МД) для молекул нативной формы канала (WT) и его мутантных форм (D242N, R243H) (Рисунок 7). Оказалось, что все три формы демонстрируют различные паттерны конформационного поведения. Конформации нативной формы канала находятся в более ограниченной области конформационного пространства по сравнению с мутантными формами (Рисунок 8), что указывает на её стабильные флуктуации вдоль некоторой траектории. В противоположность этому, мутантные формы D242N и R243H демонстрируют более широкое распределение вдоль обеих собственных векторов PC1 и PC2, что отражает их большую конформационную гибкость, вызванную мутацией (Рисунок 8).

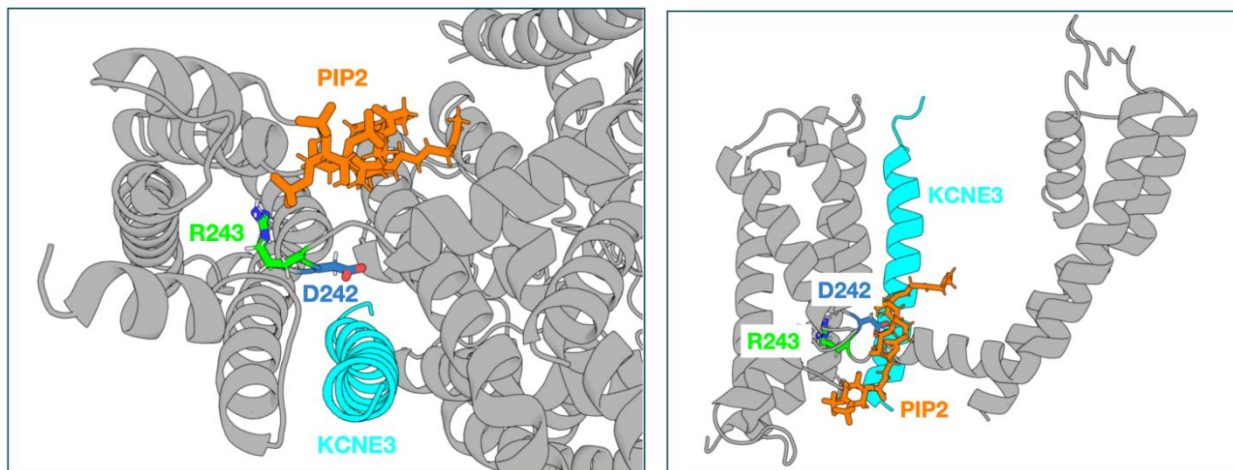


Рисунок 7. Интерфейс взаимодействия в комплексе KCNQ1/KCNE3/PIP₂. Слева: вид с цитоплазматической стороны на сопряжение одного из ПЧД с поровым доменом тетрамерного канала KCNQ1. Справа: вид в плоскости мембраны (для наглядности приведены лишь одна субъединица KCNQ1). Остатки D242 и R243 показаны синим и зелёным, молекула фосфолипида PIP₂ показана оранжевым, субъединицв KCNE3 показана голубым.

Ландшафты свободной энергии Гиббса (FELs) были построены на основе значений средне-квадратичного отклонения (RMSD) и радиуса инерции (Rg), полученных из 100-наносекундных траекторий МД молекулы канала KCNQ1. Нативная форма KCNQ1 (Рисунок 9А) демонстрирует конформационное распределение с низкими значениями Rg, что предполагает поддержание относительно компактной и стабильной структуры с множественными низкоэнергетическими состояниями. Мутантная форма D242N (Рисунок 9В) показывает более неровный ландшафт свободной энергии с заметными отличиями от такового для нативной формы, что отражает снижение стабильности и усиление конформационного движения без достижения множественных стабильных глобальных минимумов. Мутантная форма R243H (Рисунок 9С) показывает значительно

иное конформационное поведение, демонстрируя крайне неровный ландшафт свободной энергии с более высокими значениями энергии и более широкими диапазонами RMSD и Rg, что указывает на существенно сниженную стабильность и большую конформационную вариабельность. Данный анализ показывает, что обе мутации влияют на размер и положение исследуемого конформационного подпространства молекулы канала KCNQ1, причем мутация R243H вызывает наиболее выраженную нестабильность.

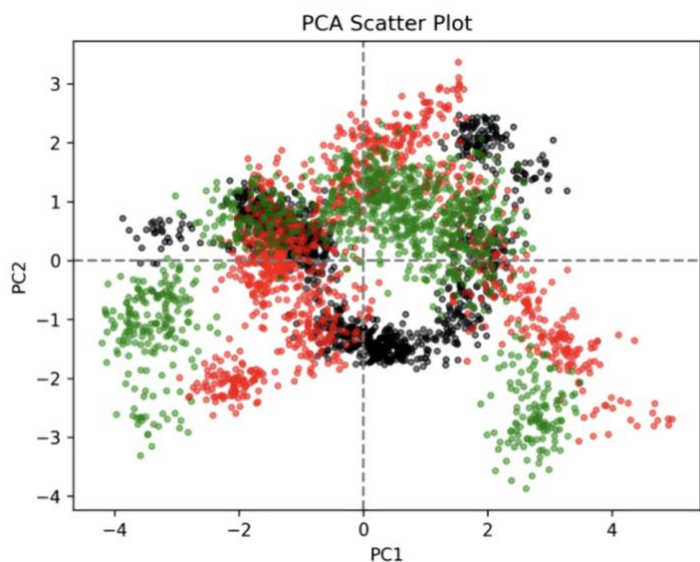
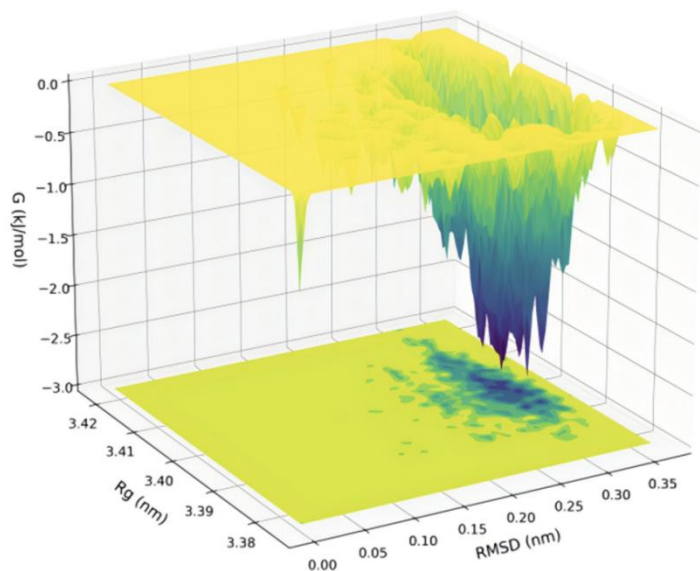
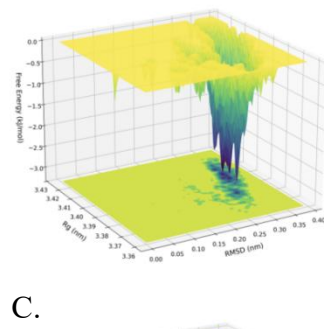


Рисунок 8. Анализ главных компонент (PCA) для нативной и мутантных форм KCNQ1. Проекция конформационных состояний основной цепи первой субъединицы канала KCNQ1 на два первых собственных вектора (PC1 и PC2). Конформации нативной формы канала показаны черным, мутантной формы D242N — красным, мутантной формы R243H — зеленым.

A.



B.



C.

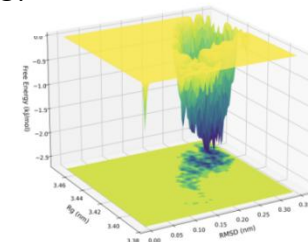


Рисунок 9. Ландшафт свободной энергии (FEL) KCNQ1 и его вариантов. Ландшафты свободной энергии Гиббса, полученные из 100-нс траекторий МД для (А) дикого типа KCNQ1, (Б) мутанта KCNQ1 D242N и (В) мутанта KCNQ1 R243H, построенные в координатах RMSD и Rg. Темносиний и желтый цвета обозначают соответственно стабильные (минимальная энергия) и нестабильные (максимальная энергия) состояния белка.

Результат 4. Рассмотрение активации канала KCNQ1 кверцетином и другими веществами растительного происхождения

Известна серия экспериментальных структур канала KCNQ1 в различных состояниях (pdb id 7xni, 7xnk, 7xnl, 7xnn) (Ma et al, 2022), причем стабилизация открытых состояний была достигнута путем использования активатора ML277 (Рисунок 10А), сайт связывания которого находится на боковой поверхности порового домена канала KCNQ1 (Рисунок 10В). Методом молекулярного докинга мы выполнили поиск потенциальных сайтов связывания таких соединений растительного происхождения как кверцетин (QUE), таншинон ПА (TANПА) и ресвератрол (RES) (Рисунок 10А, 12А). Результаты докинга показали, что все три лиганда связываются в том же сайте связывания, что и ML277, что предполагает и аналогичный механизм действия (Рисунок 10В). Дальнейшее моделирование МД в течение 100 нс прояснило механизмы взаимодействия, лежащие в основе связывания лигандов с каналом KCNQ1 на молекулярном уровне. По сравнению с известным активатором ML277, лиганды TANПА и QUE в разной степени снижали подвижность канала KCNQ1 (Рисунок 10D, E). Эти наблюдения позволяют предположить, что TANПА образует наиболее стабильный комплекс с каналом KCNQ1 по сравнению с двумя другими рассмотренными лигандами.

Результат 5. Антиоксидантная активность некоторых растительных экстрактов. Антиоксидантный потенциал кверцетина и рутина в защите канала KCNQ1 от активных форм кислорода

Метод определения общего содержания фенолов (Total Phenolic Content, TPC) количественно оценивает общее содержание фенольных соединений — основного класса соединений, часто связываемых с антиоксидантными свойствами. Экстракт *E. ulmoides* показал самое высокое содержание фенолов, составившее приблизительно 900 мкг/мл в эквиваленте хлорогеновой кислоты (Рисунок 11А), что предполагает высокий потенциал антиоксидантной активности. Однако само по себе значение TPC не строго коррелирует с антиоксидантной способностью, поскольку биологическая активность фенолов варьируется в зависимости от их химической структуры и биодоступности. В то же время, метод определения железо-восстанавливающей способности плазмы (Ferric Reducing Ability of Plasma, FRAP) измеряет общую восстанавливающую способность образца путем оценки его способности восстанавливать ионы трехвалентного железа (Fe^{3+}) до ионов двухвалентного железа (Fe^{2+}). В этом анализе *E. ulmoides* вновь продемонстрировал наивысшую антиоксидантную активность (Рисунок 11).

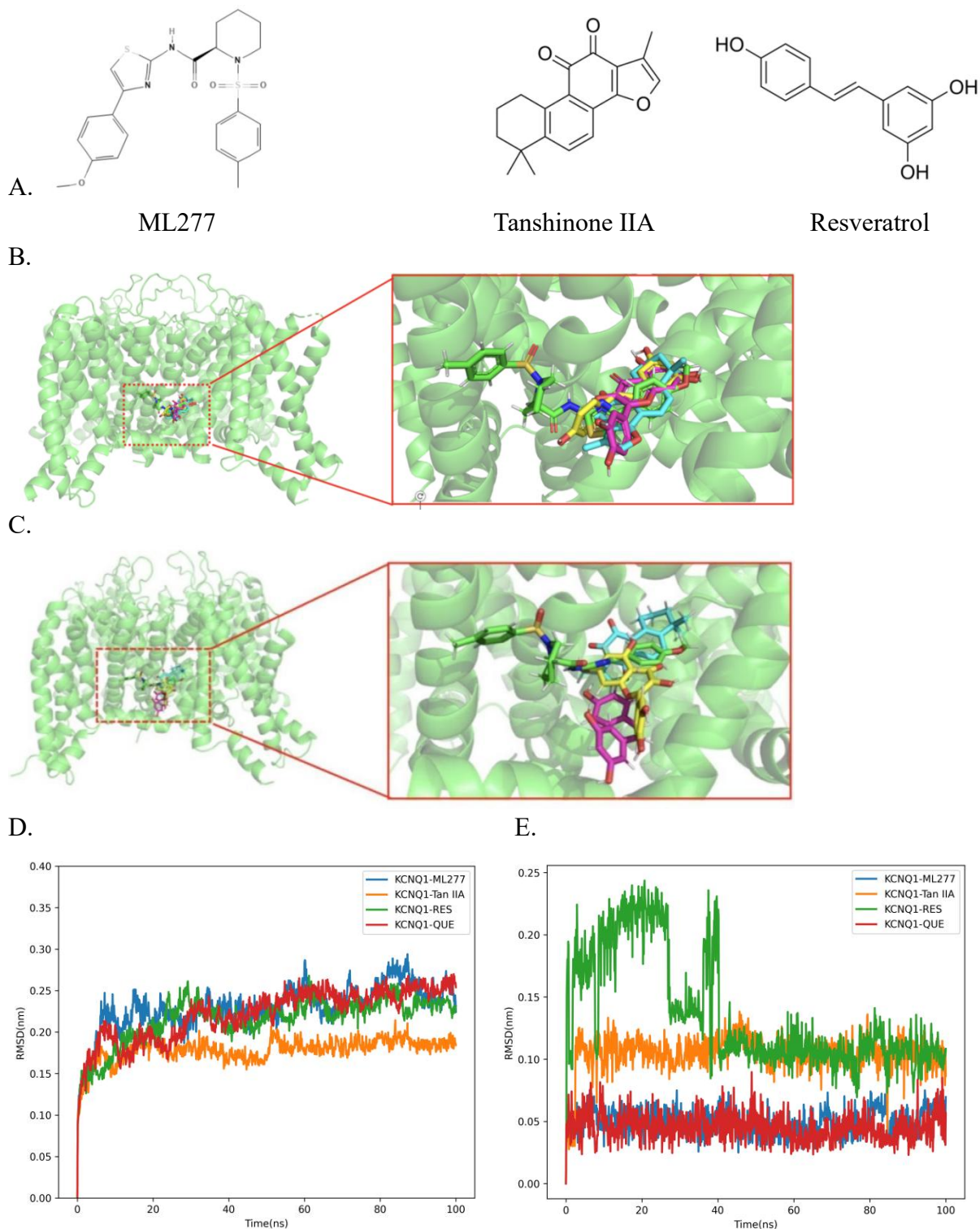


Рисунок 10. (A). Химическая структура ML277, таншинона IIA (TANIA) и ресвератрола (RES); (B). Связывание на боковой поверхности порового домена канала KCNQ1. Репрезентативные конформации кверцетина (QUE), TANIA и RES, полученные в результате молекулярного докинга, и экспериментально определённая конформация активатора ML277; (C) Наложение финальных конформаций лигандов ML277, QUE, TANIA и RES по окончании 100 нс МД. (D) $C\alpha$ -RMSD основной цепи канала KCNQ1, (E) RMSD четырех лигандов. ML277, QUE, TANIA и RES представлены в стержневом представлении зеленым, голубым, пурпурным и желтым соответственно.

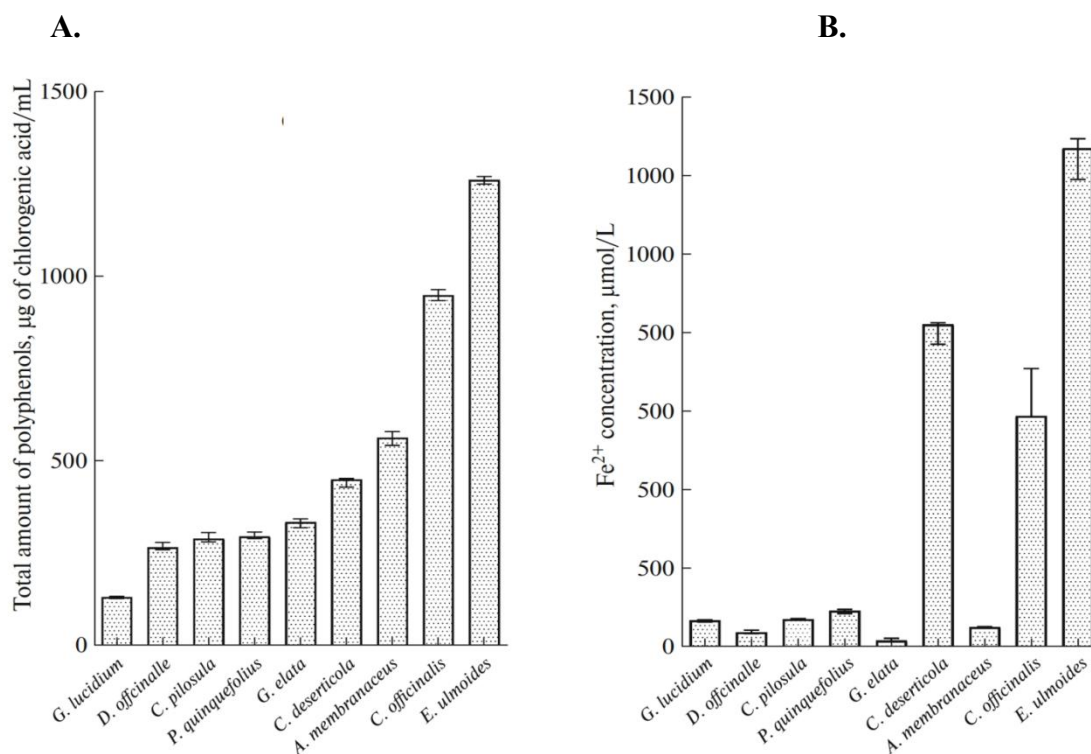
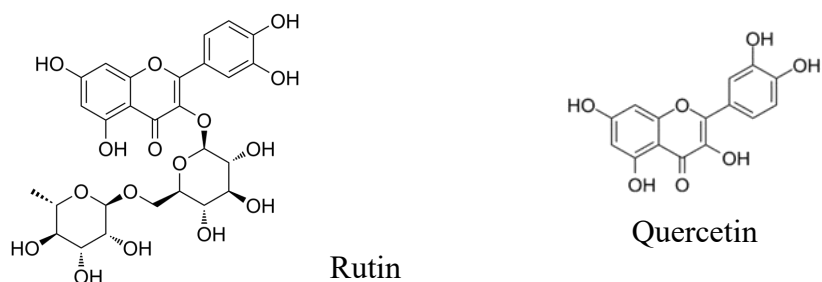


Рисунок 11. Оценка общего содержания полифенолов и общей антиоксидантной активности в водных экстрактах растений. (А) Общее содержание полифенолов в водных экстрактах растений, определенное методом ТРС; (Б) Общая антиоксидантная активность в водных экстрактах растений, определенная методом FRAP.

Основываясь на наших экспериментальных данных о том, что экстракт *E. ulmoides* обладает наивысшей антиоксидантной способностью, а также на сообщениях, согласно которым рутин и кверцетин (Рисунок 12А) являются его основными активными компонентами, мы выдвинули гипотезу о том, что эти флавоноиды напрямую взаимодействуют с каналом KCNQ1.

Результаты молекулярного докинга показывают, что как рутин, так и кверцетин могут связываться в непосредственной близости от остатка Cys214 (Рисунок 12В), который имеет важное значение для функционирования канала KCNQ1 (Bates *et al.*, 2023). Эти данные позволяют предположить, что указанные соединения могут ослаблять окислительные эффекты, вызванные АФК или другими окислителями, за счет локального антиоксидантного действия, тем самым предотвращая нарушение работы канала KCNQ1 и обеспечивая вероятную молекулярную основу для кардиопротекторных эффектов *E. ulmoides*.

A.



B.

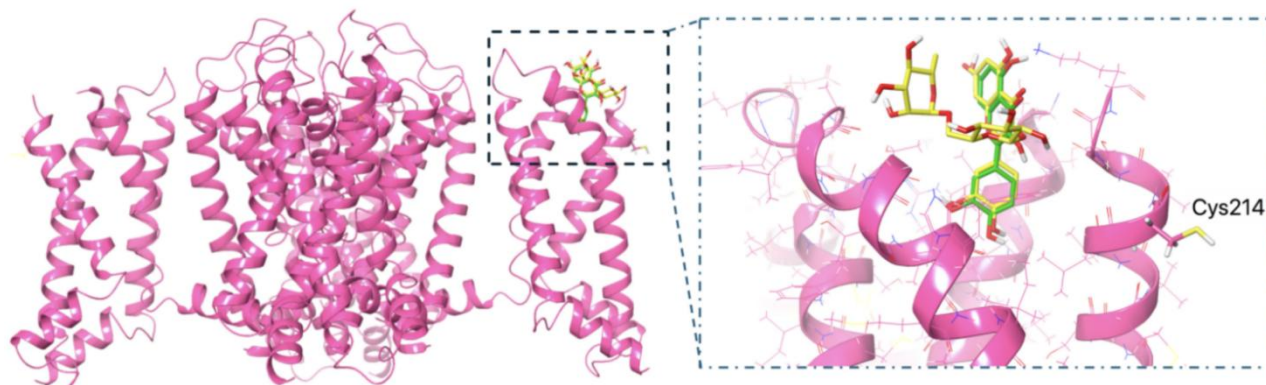


Рисунок 12. (А) Химические структуры рутина и кверцетина; (В) Положения молекул рутина (показан жёлтым) и кверцетина (показан зелёным) при докинге с внеклеточной стороны к ПЧД канала KCNQ1. Увеличенное изображение наглядно показывает близость решений докинга к остатку Cys214.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Моделирование связывания маллотоксина (MTX), выделяемого из кустарника *Mallotus oppositifolius*, с каналными комплексами KCNQ1/KCNE1 и KCNQ1/KCNE3, показало, что отрицательно заряженная при нормальном pH молекула MTX связывается на внутриклеточной стороне трансмембранного домена комплексов в сайтах, соответствующих областям с высокими положительными значениями электростатического потенциала (ЭСП). Так, ингибирующий эффект MTX на комплекс KCNQ1/KCNE3 объясняется связыванием MTX в центральной поре комплекса, где располагается одна из областей с высокими положительными значениями ЭСП. В случае комплекса KCNQ1/KCNE1 такая центральная область отсутствует из-за различия в аминокислотном составе субъединиц KCNE1 и KCNE3, поэтому связывание MTX происходит на периферии порового домена и стабилизирует открытое состояние канала, что объясняет активирующий эффект MTX в этом случае.

Рассмотрение ранее опубликованной карты электронной плотности, полученной методом крио-ЭМ, показало её низкое разрешение в области линкера внутриклеточных спиралей HC и HD, что не позволило авторам установить положение атомов этого линкера. В то же время, отчетливо видно, что ход основных цепей четырех линкеров в тетрамерной суперспирали HC-HD соответствует круговому смещению доменов (domain swap) между мономерами. Сделанное в нашей работе предположение об удлинении спирального домена HD на

два витка по сравнению с его известной экспериментальной структурой в сочетании с применением современных алгоритмов моделирования позволило построить молекулярную модель линкера, которая хорошо согласуется с картой электронной плотности.

Моделирование молекулярной динамики комплекса KCNQ1/KCNE3/PIP2 с нативной формой субъединицы KCNQ1, а также мутантных форм с патогенными заменами D242N и R243H, показало различия в конформационной подвижности нативной и мутантных форм, а также во взаимодействии с молекулой фосфолипида PIP2. Анализ главных компонент движения субъединицы KCNQ1 показывает, что движение нативной формы происходит в относительно узком диапазоне вдоль некоторой средней траектории. Вместе с тем мутантные формы демонстрируют как совершенно иные по форме средние траектории, так и более широкий диапазон отклонений от среднего. Эти наблюдения показывают, что точечные аминокислотные замены могут приводить не только к изменению локальных взаимодействий, но и к изменению глобальных структурных свойств и динамического поведения комплекса KCNQ1/KCNE3/PIP2.

Моделирование связывания с каналом KCNQ1 его природных активаторов (кверцетина, таншинона ПА и ресвератрола) показало возможность связывания в том же сайте на обращённой в мембрану поверхности порового домена канала, где по данным крио-ЭМ связывается и активатор ML277.

Экспериментальное изучение девяти растительных экстрактов показало, что экстракт *E. ulmoides* обладает среди них наиболее высокой антиоксидантной способностью и способностью ингибировать перекисное окисление липидов. Методом молекулярного докинга установлено, что основные антиоксидантные компоненты экстракта *E. ulmoides*, рутин и кверцетин, имеют сайт связывания в непосредственной близости от редокс-чувствительного остатка Cys214 на внеклеточной стороне канала KCNQ1. Такое расположение позволяет предположить стерическую конкуренцию этих молекул с вероятными окислителями в качестве механизма антиоксидантной активности рутина и кверцетина. С учётом преимущественной локализации канала KCNQ1 в тканях сердца указанная антиоксидантная активность может являться причиной кардиопротекторного действия рутина и кверцетина, однако это предположение требует экспериментальной проверки.

Перспективы выполненного исследования включают в себя использование выявленной роли ЭСП для поиска и создание низкомолекулярных соединений для селективного воздействия на комплексы KCNQ1 с дополнительными субъединицами семейства KCNE, использование полученной молекулярной модели линкера HC-HD для изучения связывания с каналом KCNQ1 его внутриклеточных белков-партнёров, создание полной молекулярно-механической картины активации канала KCNQ1 с учётом роли окружающих липидов, а также разработку новых БАДов или лекарственных средств для поддержки сердечно-сосудистой системы на основе выявленного кардиопротекторного эффекта экстракта *E. ulmoides*.

ВЫВОДЫ

1. Разнонаправленный эффект маллотоксина (МТХ) на комплексы KCNQ1/KCNE1 и KCNQ1/ KCNE3 объясняется различием в расположении областей с высокими положительными значениями электростатического потенциала (ЭСП) на внутриклеточной поверхности трансмембранного домена этих комплексов. Обнаружено связывание отрицательно заряженного при нормальном pH МТХ в поровой области канала KCNQ1/KCNE3, обладающей высокими положительными значениями ЭСП (Рисунок 5), что объясняет экспериментально наблюдаемое блокирование этого канала.

2. Структурная модель линкера HC-HD канала KCNQ1 построена с использованием современных алгоритмов молекулярного моделирования и карты электронной плотности, полученной методом крио-ЭМ (EMD-20966). Обнаружено неописанное ранее смещение доменов, выражающееся в повороте тетрамерной суперспирали HD на 90° относительно суперспирали HC (Рисунок 6).

3. Анализ главных компонент (PCA) 100-нс траекторий МД для молекул канала KCNQ1 в нативной форме и мутантных формах, содержащих патогенные аминокислотные замены D242N и R243H, показал что эти формы демонстрируют различные паттерны конформационного поведения. В противоположность компактным флуктуациям нативной формы, мутантные формы D242N и R243H продемонстрировали большую гибкость (Рисунок 8). Это же следует и из рассмотрения ландшафтов свободной энергии Гиббса, построенных на основе значений среднеквадратичного отклонения (RMSD) и радиуса инерции (R_g) (Рисунок 9).

4. Для природных активаторов канала KCNQ1, включая кверцетин, таншинон ПА и ресвератрол, методом молекулярного докинга выявлены потенциальные сайты связывания. Основной сайт располагается в «кармане», образованном спиральным линкером S4-S5 и спиралью S5 одной субъединицы, а также спиралью S6' соседней субъединицы (Рисунок 11). Данный сайт совпадает с сайтом связывания описанного в литературе активатора ML277, для комплекса которого с каналом KCNQ1 известна пространственная структура, что позволяет предположить такой же механизм активации.

5. Экстракт *E. ulmoides* обладает наивысшим общим содержанием фенолов, наибольшей железо-восстанавливающей способностью и максимальной ингибирующей активностью в отношении перекисного окисления липидов среди 9 изученных растительных экстрактов. Молекулярный механизм защитного действия экстракта *E. ulmoides* в отношении канала KCNQ1 состоит в том, что его основные антиоксидантные компоненты, рутин и кверцетин, связываются в непосредственной близости от редокс-чувствительного остатка Cys214, препятствуя его окислению.

Публикации по теме диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.2 Биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

1. **Mai L.**, Novoseletsky V. Investigating Dual Modulatory Role of Mallotoxin on KCNQ1-KCNE Complexes Using Molecular Modeling // Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. — 2025. — Vol. 19. — №2. — pp. 188–193. EDN: FWXEOB (Импакт-фактор 0.336 (SJR), 0.6 / 0.4 п.л.)
2. Li B., Karlova M.G., Zhang H., Pustovit O.B., **Mai L.**, Novoseletsky V.N., Podolyak D., Zaklyazminskaya E.V., Abramochkin D.V., Sokolova O.S. A mutation in the cardiac Kv7.1 channel possibly disrupts interactions with Yotiao protein // Biochemical and Biophysical Research Communications. — 2024. — Vol. 714. — P.149947. EDN: JRGAI (Импакт-фактор 0.748 (SJR), 0.8 / 0.1 п.л.)
3. Bayzhumanov A.A., **Mai L.**, Yusipovich A.I., Maksimov G.V. Antioxidant Activity of Certain Aquatic Extracts Used in Traditional Chinese Medicine // Moscow University Biological Sciences Bulletin. — 2022. — Vol. 77. — pp. 13–17 EDN: OPUDJT (Импакт-фактор 0.161 (SJR), 0,6 / 0.1 п.л.)

ИНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kravchuk E.V., **Mai L.**, Moiseenko A.V., Novoseletsky V.N., Sokolova O.S. Structural analysis of KCNQ1 channel distal C-terminus based on cryogenic electron microscopy and molecular modeling data // Microscopy and Microanalysis. — 2024. — P. ozae044-373. EDN: WJWQIA (Импакт-фактор 0.465 (SJR), 0,1 / 0.05 п.л.)