

## VIDÈRE EST CREDERE: LA STRUTTURA AD ALTA RISOLUZIONE DEL CANALE DEL PACEMAKER HCN4

ANNA MORONI (\*)

Nota presentata dal s.c. Dario Di Francesco  
(Adunanza del 7 ottobre 2021)

SUNTO. – I canali ionici HCN (HCN1-4) generano la corrente cationica  $I_f$  che controlla l'automaticità e il ritmo del battito cardiaco. Mediante criomicroscopia elettronica su singola particella (cryo-EM), abbiamo ottenuto la struttura del canale HCN4, legato e non legato al ligando cAMP e con il poro in configurazione aperta e chiusa. L'analisi delle strutture evidenzia un sito di coordinamento dello ione  $Mg^{2+}$  che, collegando due domini della proteina, facilita l'azione dei nucleotidi ciclici nell'apertura del poro. La configurazione aperta del poro utilizzata in simulazioni di dinamica molecolare ha fornito informazioni sui meccanismi di permeazione degli ioni  $K^+/Na^+$  e sul meccanismo d'azione dell'ivabradina, un principio attivo impiegato nel trattamento dell'angina.

\*\*\*

ABSTRACT. – HCN channels (HCN1-4) generate the  $I_f$  current that controls automaticity and rhythm of the heartbeat. Using single-particle electron cryo-microscopy (cryo-EM), we obtained the structure of HCN4, bound and unbound to the cAMP ligand and with the pore in open and closed configuration. Analysis of the structures reveals a coordination site for the  $Mg^{2+}$  ion which, by linking two domains of the protein, facilitates channel gating by cyclic nucleotides. The open pore configuration used in molecular dynamics simulations provided information on the mechanisms of permeation of  $K^+/Na^+$  ions and on the mechanism of action of ivabradine, a drug used in the treatment of angina.

---

(\*) Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano, Italy.  
E-mail: anna.moroni@unimi.it

## 1. INTRODUZIONE

L'automatismo del battito cardiaco è dovuto alla capacità delle fibre cardiache di effettuare un nuovo potenziale d'azione spontaneamente ed ha il suo punto d'inizio nel nodo senoatriale. Tale capacità è a sua volta dovuta ad una corrente ionica, definita la corrente "pacemaker" del cuore o corrente "funny" ( $I_f$ ), per le sue caratteristiche insolite [1]. La corrente  $I_f$  è costituita da un flusso misto di sodio e potassio la cui direzione netta è verso l'interno della cellula. La corrente si attiva al termine del potenziale d'azione e genera la depolarizzazione diastolica (DD) che innesca il successivo potenziale d'azione; attraverso questo meccanismo, l' $I_f$  controlla la frequenza dell'attività spontanea dei miociti senoatriali e quindi la frequenza cardiaca. Un'altra caratteristica singolare della corrente è che essa è aumentata dall'adenosina monofosfato ciclico (cAMP) che, velocizzando la DD, incrementa la frequenza cardiaca [2]. La dipendenza da cAMP è di particolare rilevanza fisiologica perché sta alla base della regolazione della frequenza cardiaca da parte del sistema nervoso autonomo, simpatico e parasimpatico. Una corrente simile, etichettata come  $I_h$ , è stata descritta anche in diversi tipi di neuroni, dove riveste una varietà di funzioni, incluso il controllo delle scariche ritmiche, la regolazione dell'eccitabilità neurale, la trasduzione dei segnali sensoriali, la plasticità sinaptica ed altro.

I determinanti molecolari della corrente  $I_f/I_h$  sono i canali HCN (Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide-gated). Nell'uomo i canali HCN sono codificati da 4 geni (HCN1-4), variamente espressi nel cuore e nel sistema nervoso. HCN4 è il sottotipo maggiormente espresso nel nodo del seno e ricapitola in modo abbastanza fedele le caratteristiche della corrente  $I_f$ , in termini di dipendenza dal voltaggio e sensibilità al cAMP. Mutazioni nel gene di HCN4 sono state identificate in pazienti con aritmie cardiache ereditarie, sia bradiche tachicardici [3-5] e, più raramente, con sindrome di Brugada [6].

La corrente  $I_f$  è tipicamente alterata nella sindrome del seno malato, legata all'invecchiamento, che viene spesso trattata con l'impianto del pacemaker associato alla terapia farmacologica.

L'ivabradina è un composto organico capace di bloccare selettivamente la corrente  $I_f$  [7] senza interferire sulle altre correnti ioniche che fluiscono durante il potenziale d'azione e viene utilizzata per ridurre la frequenza cardiaca nel trattamento dell'angina pectoris e dell'insufficienza cardiaca cronica. L'ivabradina agisce bloccando il poro dei canali HCN ed

è moderatamente selettiva per il sottotipo cardiaco HCN4 [8] ma non è esente da effetti collaterali dovuti all'espressione dei canali HCN anche in altri distretti. Conoscere la struttura molecolare dei canali HCN rappresenta pertanto il punto di partenza per lo sviluppo di farmaci isoforma-selettivi che possano alleviare diverse patologie sia genetiche che dovute a disfunzioni legate all'invecchiamento. La prima struttura ad alta risoluzione di un canale HCN è stata ottenuta nel 2019 per il sottotipo HCN1 [9]. Tale risultato ha permesso di definire le caratteristiche generali dei canali HCN, come la configurazione tetramerica e i domini che compongono la singola subunità ma non le diversità esistenti fra i sottotipi.

A tale scopo, abbiamo recentemente determinato la struttura atomica del canale HCN4 di coniglio (rbHCN4) utilizzando la tecnica innovativa della microscopia elettronica criogenica. I nostri risultati hanno consentito di identificare nella struttura di HCN4, importanti differenze con il sottotipo HCN1 che giustificano, almeno in parte, la diversa sensibilità al cAMP di questi due canali. La struttura di HCN4 è stata inoltre risolta da noi con il poro in configurazione sia aperta che chiusa. Tale risultato ci ha permesso di studiare con tecniche di chimica computazionale, la permeazione degli ioni sodio e potassio e di identificare le basi molecolari di selettività e conduttanza in questi canali. I nostri risultati aprono la possibilità di mettere a punto dei farmaci sottotipo-specifici per i canali HCN, allargando lo spettro degli interventi terapeutici anche al sistema nervoso centrale e periferico, dove i sottotipi HCN1 e HCN2 sono prevalentemente espressi.

## 2. RISULTATI

La struttura del canale HCN4 è stata ottenuta mediante la tecnica di microscopia elettronica criogenica (CryoEM) su singola particella. Le proteine HCN4 sono state purificate dalle cellule di mammifero HEK293T in due modi diversi, mediante detergenti (Lauryl Maltose Neopentyl Glycol (LMNG) e Cholesteryl Hemisuccinate (CHS)) e mediante polimeri anfifilici (Amphipols) con aggiunta o meno del ligando cAMP. Abbiamo risolto tre strutture, HCN4 in LMNG CHS in configurazione apo (senza cAMP legato), alla risoluzione di 3.2 Å (HCN4 APO/LC); HCN4 in Amphipols, in configurazione apo, 3.4 Å (HCN4 APO/AM) e HCN4 in LMNG CHS, in configurazione holo (con cAMP legato), 3.2 Å (HCN4 HOLO/LC). In *Fig. 1*, i pannelli A, B

e C mostrano rispettivamente le mappe di densità delle tre proteine che nella loro conformazione nativa, sono formate dall'interazione di quattro subunità identiche che si assemblano con simmetria tetramerica rispetto all'asse del poro. I pannelli D ed E mostrano invece il modello strutturale della proteina HCN4 (HOLO/LC) in forma dimerica (*Fig. 1D*) e monomerica (*Fig. 1E*) per facilitare la visualizzazione della disposizione in membrana delle subunità e dei domini che compongono il singolo monomero. La proteina si compone di sei domini transmembrana (S1-S6), che includono la sequenza del fitro di selettività (filter) e dei due domini citosolici, il dominio HCN (HCND) legato ad S1 e i domini C-linker + cyclic nucleotide binding domain (CNBD), legati all'S6. Il pannello F mostra invece un'interessante caratteristica della proteina, l'interazione del dominio in membrana S4-S5 e il C-linker citosolico, mediato dalla presenza di uno ione magnesio (sfera viola). Questa struttura, denominata "tetrate" è stata identificata nella proteina HCN4 ma non è presente nella struttura della proteina HCN1 (Lee and Mackinnon 2017). Sulla base di analisi biochimiche e funzionali, abbiamo verificato che la tetrate controlla la risposta del canale al cAMP e contribuisce ad aumentare la risposta di HCN4 al ligando.

Un altro risultato interessante è emerso dall'analisi della regione del poro. Il confronto delle strutture ha mostrato che due di esse, HCN4 APO/LC e APO/AM, presentano il poro in configurazione aperta, mentre la terza, HCN4 HOLO/LC, presenta il poro in configurazione chiusa. Come si vede dalla *Fig. 2A*, nel poro mostrato in blu, che corrisponde alla struttura di HCN4 HOLO/LC, le catene laterali degli amminoacidi del lato citosolico, Y507- Q519, restringono lo spazio interno, impedendo il passaggio delle molecole d'acqua e degli ioni. Nel poro mostrato in verde invece, che appartiene alla struttura di HCN4 APO/AM, le stesse catene sono distanziate e l'accesso alla cavità dal lato citosolico è libero. In entrambe, la parte in grigio definisce il diametro interno della cavità. Il pannello B mostra un esperimento di docking in cui la molecola di ivabradina è presente all'interno della cavità nel caso di HCN4 APO/AM, rafforzando l'ipotesi che il poro si trovi in conformazione aperta. A conferma di tale ipotesi, abbiamo svolto simulazioni di dinamica molecolare (MD) sul poro del canale e abbiamo constatato che, come atteso, sia le molecole d'acqua (molecole rosse e bianche) che gli ioni  $K^+$  (sfere blu) entrano nella cavità a livello del residuo Q519, indicato dalla freccia nera. Studi successivi di MD ci hanno permesso di identificare i siti di legame per gli ioni, sia  $K^+$  che  $Na^+$ , a livello del fitro di selettività che si trova

all'altra estremità del poro, e che è formato dalla sequenza di aminoacidi cisteina, isoleucina, glicina, tirosina e glicina (CIGYG), come indicato in Fig. 2E. Ci sono tre possibili siti di legame per gli ioni, che vengono denominati a,b e c. La conduzione avviene per alternanza fra due stati in cui il filtro contiene o un solo ione (sito b) oppure due ioni (siti a e c) (Fig. 2F). Nel sito "b" sia lo ione potassio (blu) che lo ione sodio (giallo) si trovano sul piano dei carbonili, una situazione anomala, dato che i raggi ionici sono abbastanza diversi (1.33 and 0.95Å, rispettivamente) e che determina un riarrangiamento del filtro, osservato nelle simulazioni di dinamica molecolare (dati non mostrati).

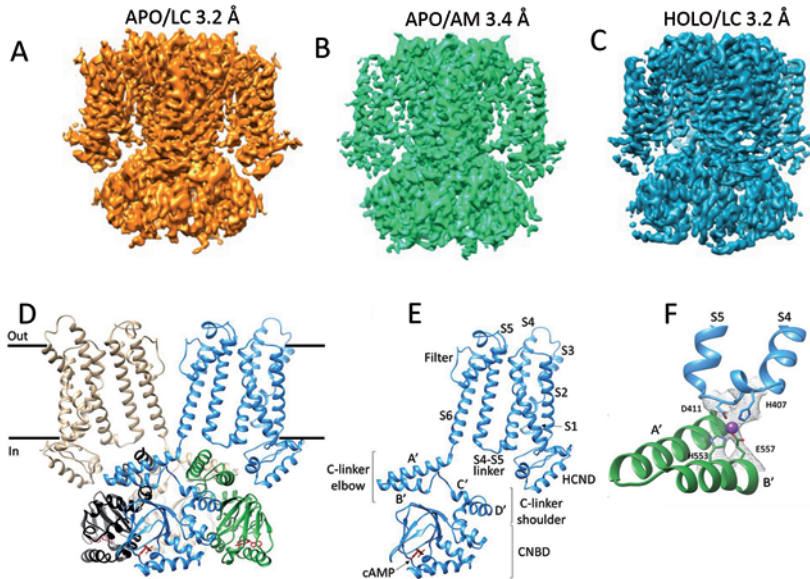


Fig. 1. Struttura di HCN4. A, B, C Struttura del tetramero del canale HCN4 nello stato non legato al cAMP (APO) (A,B) e legato (HOLO) (C), risolta in presenza di detergente (LC) e di amphipols (AM) alla risoluzione indicata (Å). D, Struttura del tetramero del canale HCN4 HOLO/LC di cui, per chiarezza, solo due subunità del tetramero sono mostrate per intero (magenta e blu), mentre per le altre due subunità (nero e verde) sono presentati solo i domini citosolici C-linker/CNBD. E, protomero di HCN4 HOLO/LC con elementi strutturali indicati (in inglese). F, Rappresentazione a nastro del linker S4-S5 di una subunità (blu) e del sottostante C-linker (eliche A'-B') della subunità adiacente (verde). Quattro residui che formano il sito di coordinazione degli ioni (tetrate) in HCN4 sono etichettati (H407, D411, H553, E557). Lo ione coordinato dalla tetrate è rappresentato come una sfera viola.

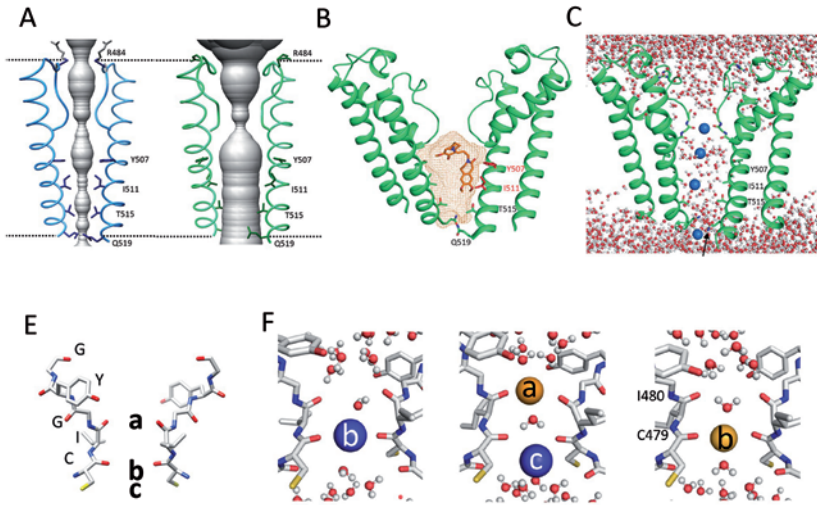


Fig. 2. Evidenze di apertura del poro e meccanismo di permeazione degli ioni nei canali HCN4. A, rappresentazione a nastro del dominio del poro di HCN4 HOLO/LC (blu) e G, HCN4 APO/AM (verde). Dal confronto si nota che nel poro APO/AM la rotazione nella parte inferiore di S6 riposiziona le catene laterali dei residui indicati lontano dalla cavità, allargando il percorso accessibile al solvente (grigio) dal lato citosolico (risultati identici sono stati ottenuti con APO/LC). Due subunità del tetramero sono mostrate per chiarezza. B, docking dell'ivabradina nel poro APO/AM. L'ivabradina entra nella cavità ed esplora diverse posizioni, compresa una in stretta vicinanza con Y507 e I511 (evidenziata in rosso). C, immagine rappresentativa dalla simulazione MD della struttura APO/AM. La conformazione del segmento S6 dal lato citosolico permette all'acqua e agli ioni  $K^+$  di entrare nella cavità interna del poro. D, il filtro di selettività di un poro aperto HCN4 (APO/LC). La sequenza  $^{479}CIGYG^{484}$  è indicata di fianco ai corrispettivi residui; a, b e c indicano i tre siti di legame degli ioni identificati dalla simulazione MD mostrata in (F). E, istantanee della simulazione MD che mostrano la posizione degli ioni  $K^+$  (blu) e  $Na^+$  (giallo). I residui C479 e I480 sono indicati.

### 3. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo lavoro presentiamo tre strutture cryo-EM del canale pacemaker HCN4 a risoluzione quasi atomica da cui ricaviamo nuove informazioni sulla funzione del canale HCN in generale e sulle caratteristiche sottotipo-specifiche in particolare.

Le strutture evidenziano un meccanismo molecolare, probabilmente unico per HCN4, che agisce come facilitatore dell'effetto cAMP



e che si trova tra la porzione solubile del canale (C-linker) e la porzione transmembrana (VSD). Così, in HCN4, ma non in HCN1, un sito di coordinazione degli ioni metallici, a cui ci riferiamo come “la tetrate”, collega il dominio transmembrana di una subunità al dominio citosolico della subunità vicina.

Una secondo importante risultato del presente studio è l’aver ottenuto strutture con pori aperti e chiusi. Simulazioni di dinamica molecolare e dati di docking supportano pienamente la nozione di un poro aperto nelle strutture HCN4 presentate qui.

In sintesi, i nostri dati strutturali e funzionali permettono di comprendere il meccanismo di gating dei canali HCN, della modulazione dipendente dal nucleotide ciclico e della permeazione ionica. L’identificazione dei correlati struttura-funzione del canale HCN e l’apprazzamento delle differenze sottotipo-specifiche, aprirà la strada alla progettazione di farmaci più selettivi per il trattamento farmacologico di disturbi cardiaci e neurologici determinati dal malfunzionamento dei canali HCN.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Brown HF, DiFrancesco D, Noble SJ. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 1979, 280(5719):235-6.
2. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature*, 1991 351(6322):145-7.
3. DiFrancesco D. Funny channel gene mutations associated with arrhythmias. *J Physiol.* 2013, 591(17):4117-24.
4. Nof E, Luria D, Brass D, Marek D, Lahat H, Reznik-Wolf H, Pras E, Dascal N, Eldar M, Glikson M. Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation*, 2007, 116(5):463-70.
5. Servatius H, Porro A, Pless SA, Schaller A, Asatryan B, Tanner H, de Marchi SF, Roten L, Seiler J, Haerberlin A, Baldinger SH, Noti F, Lam A, Fuhrer J, Moroni A, Medeiros-Domingo A. Phenotypic Spectrum of *HCN4* Mutations: A Clinical Case. *Circ Genom Precis Med.* 2018, 11(2):e002033.
6. Lippi G, Montagnana M, Meschi T, Comelli I, Cervellin G. Genetic and clinical aspects of Brugada syndrome: an update. *Adv Clin Chem.* 2012, 56:197-208.
7. Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D. Current-dependent block of rabbit sinoatrial node I(f) channels by ivabradine. *J Gen Physiol.* 2002, 120(1):1-13.
8. Bucchi A, Tognati A, Milanese R, Baruscotti M, DiFrancesco D. Properties of ivabradine-induced block of HCN1 and HCN4 pacemaker channels. *J Physiol.* 2006, 572(Pt 2):335-46.
9. Lee CH, MacKinnon R. Structures of the Human HCN1 Hyperpolarization-Activated Channel. *Cell* 2017, 168(1-2):111-120.

