

Получение и изучение свойств генокодируемого флуоресцентного хонготоксина - лиганда калиевых Kv1-каналов

Научный руководитель – Некрасова Оксана Васильевна

Скутель Михаил Андреевич

Студент (бакалавр)

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоинженерии, Москва, Россия

E-mail: mskutel@yandex.ru

Нарушение в работе калиевых потенциал-зависимых каналов Kv1 приводит к ряду серьёзных неврологических, аутоиммунных и кардиологических заболеваний, поэтому изучение модуляторов активности этих каналов имеет большое фармакологическое значение [3]. Цель данной работы- получение химерного белка хонготоксина 1 слитого с флуоресцентным белком RFP (RFP-HgTx1), изучение его взаимодействия с рекомбинантными каналами KcsA-Kv1 и применимости в качестве инструмента для определения аффинности лигандов этих каналов.

Для экспрессии RFP-HgTx1 в клетках *E.coli* использовали плазмиду pET (*Novagen*). RFP-HgTx1 очищали с помощью Ni-аффинной хроматографии. Сферопласты клеток *E.coli*, на мембране которых экспонированы каналы KcsA-Kv1, получали по опубликованным протоколам [2]. Для определения констант взаимодействия RFP-HgTx1 с каналами методом конфокальной микроскопии измеряли интенсивность флуоресценции на поверхности сферопластов после инкубации их с RFP-HgTx1 разной концентрации [1]. Определение констант связывания лигандов осуществляли методом конкурентного ингибирования связывания RFP-HgTx1 немечеными лигандами [1].

С использованием флуоресцентной клеточной системы установлено, что RFP-HgTx1 связывается с каналами KcsA-Kv1.x (x=1, 3) на мембране сферопластов. Связывание происходит в наномолярном диапазоне концентраций RFP-HgTx1 и характеризуется насыщением. Анализ концентрационных зависимостей связывания позволил рассчитать константы диссоциации комплексов. Установлено, что аффинность RFP-HgTx1 к каналу KcsA-Kv1.3 выше, чем к KcsA-Kv1.1. На примере пептидных блокаторов Kv1-каналов ChTx, HgTx1 и AgTx2 показано, что RFP-HgTx1 применим для выявления способности пептидов взаимодействовать с Kv1-каналами и оценки аффинности этих взаимодействий.

Таким образом, в ходе работы был получен генокодируемый флуоресцентный высокоаффинный лиганд потенциал-зависимых калиевых Kv1.1- и Kv1.3- каналов RFP-HgTx1, измерены константы диссоциации комплексов RFP-HgTx1 с этими каналами, а также показано, что RFP-HgTx1 применим для поиска пептидных блокаторов каналов Kv1.1 и Kv1.3 и оценки их аффинности к этим каналам.

Источники и литература

- 1) Kudryashova K. S. et al. Fluorescent system based on bacterial expression of hybrid KcsA channels designed for Kv1. 3 ligand screening and study //Analytical and bioanalytical chemistry. – 2013. – Т. 405. – №. 7. – С. 2379-2389.
- 2) Nekrasova O. V. et al. Recombinant Kv channels at the membrane of Escherichia coli bind specifically agitoxin2 //Journal of Neuroimmune Pharmacology. – 2009. – Т. 4. – №. 1. – С. 83-91.
- 3) Wulff H., Castle N. A., Pardo L. A. Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets //Nature reviews Drug discovery. – 2009. – Т. 8. – №. 12. – С. 982-1001.