

Исследование взаимодействия Agitoxin-2 с химерным калиевым каналом KcsA/Kv1.3 методом ЯМР спектроскопии

Научный руководитель – Люкманова Екатерина Назымовна

Wu Jingjing

Студент (магистр)

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

E-mail: 407304592w@gmail.com

Данное исследование посвящено изучению взаимодействия Agitoxin-2 (AgTx2) с потенциал-чувствительным химерным калиевым каналом KcsA/Kv1.3. Каналы Kv1 широко распространены в организме и выполняют разнообразные функции, такие как поддержание потенциала покоя, контроль порога потенциала действия в возбудимых клетках, передача нервных сигналов, регулирование апоптоза и пролиферации клетки [1], поддержание сердечно-сосудистого сокращения, участие в кальциевой сигнализации и секреции в иммунной системе [2]. Следовательно, их дисфункция часто приводит к возникновению тяжелых заболеваний, включая различные виды рака, сердечную аритмию, аутоиммунные заболевания. В данной работе рассматриваются каналы Kv1.3, широко представленные в разных типах Т-клеток. Их степень экспрессии тесно связана с развитием Т-клеточно-опосредованных аутоиммунных заболеваний [3]. В настоящее время канал Kv1.3 рассматривается в качестве терапевтической мишени при лечении целого ряда аутоиммунных заболеваний, а тестирование его лигандсвязывающей активности составляет основу поиска новых лекарственных препаратов. Химерный канал KcsA-Kv1.3 дает возможность получения высокого выхода экспрессии и подходит для изучения лиганд-канальных взаимодействий различными методами.

При разработке или дизайне новых лекарственных препаратов, необходим поиск низкомолекулярных соединений, действующих на ионные каналы, например токсины. Токсины из яда скорпионов, благодаря их разнообразности, высокой аффинности и селективности к калиевым каналам, представляют собой часто используемые ингибиторы и модуляторы для Kv-каналов среди животных токсинов [4]. Так, Agitoxin-2 имеет высокое сродство к поровым доменам Kv1.3 и тем самым привлекателен для фармакологических целей. В настоящее время экспериментальные данные о структурах комплексов и их взаимодействиях существенно ограничены из-за известных сложностей в выделении, очистке и кристаллизации мембранных белков. В данной работе мы используем метод ЯМР-спектроскопии, который может предоставить важную информацию о молекулярной динамике для исследования.

Задачи для этой работы были поставлены следующие: разработка высокоэффективного протокола экспрессии, выделения и очистки AgTx2 дикого типа и характеристика методами ВЭЖХ и ¹H ЯМР-спектроскопии; подбор условий введения парамагнитной метки для AgTx2 и характеристика меченого токсина методами ВЭЖХ, ¹H ЯМР-спектроскопии и масс-спектроскопии; получение ¹⁹F-меченых мутантов химерного канала KcsA-Kv1.3; исследование комплекса KcsA-Kv1.3 с токсином AgTx2 методами ¹⁹F-ЯМР.

Для того, чтобы увеличить долю правильного свернутого токсина, мы планировали оптимизировать условия выращивания белка. Для этого гибридный белок МВР-AgTx2 культивировали при пониженных температурах (13°C, 20°C) и 30°C. Мы сделали выводы, что выращивание при температуре 13°C дает высший выход токсина и в итоге получили 14

мг свернутого AgTx2 (Рис.2). Также, было установлено, что условия мечения при соотношении по концентрациям AgTx2 к растворимой в ацетонитриле метке 1:4 на ночь при комнатной температуре оптимальны (Рис.4). Эффективность мечения составляет 8%-10% и были получены 0.3-0.4 мг активного и селективно меченого токсина (Рис.1 и 3). После разработки протокола получения 4 мутантов KcsA-Kv1.3, мы получили 1 мг KcsA-Kv1.3 мутанта 82, 2 мг мутанта 85 и 1.5 мг мутанта 57. Сравнение 1H ЯМР спектров мутанта 85 с AgTx2 дикого типа и с AgTx2 меченого типа прилагается в рисунке 5.

Данная работа выполнена в лаборатории биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов и в лаборатории структурной биологии ионных каналов института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Источники и литература

- 1) 1.Feria Pliego, JA., Pedroarena, CM. Kv1 potassium channels control action potential firing of putative GABAergic deep cerebellar nuclear neurons // Sci Rep. 2020. V.10, № 1. P. 6954.
- 2) 2.Wulff, H. et al. Voltage-gated potassium channels as therapeutic drug targets. // Nat Rev Drug Discov. 2008. V. 8, № 12. P. 9821001.
- 3) 3.Beeton, C. et al. Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2006. V. 103, № 46. P. 17414–17419.
- 4) 4.Kuzmenkov, AI. et al. Diversity of Potassium Channel Ligands: Focus on Scorpion Toxins // Biochemistry (Mosc). 2015. V. 80, № 13. P. 1764–1799.

Иллюстрации

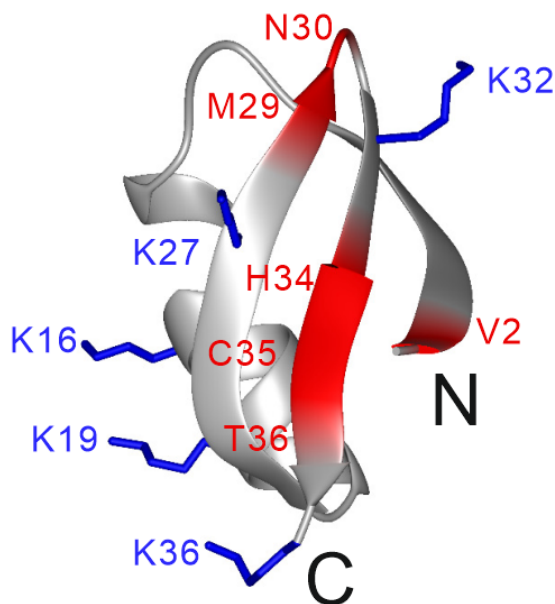


Рис. 1. Модель молекулы 1х меченого AgTx2 с выделением N- и C-концов, уширенных меткой остаток (красный) и 5 лизинов (синий).

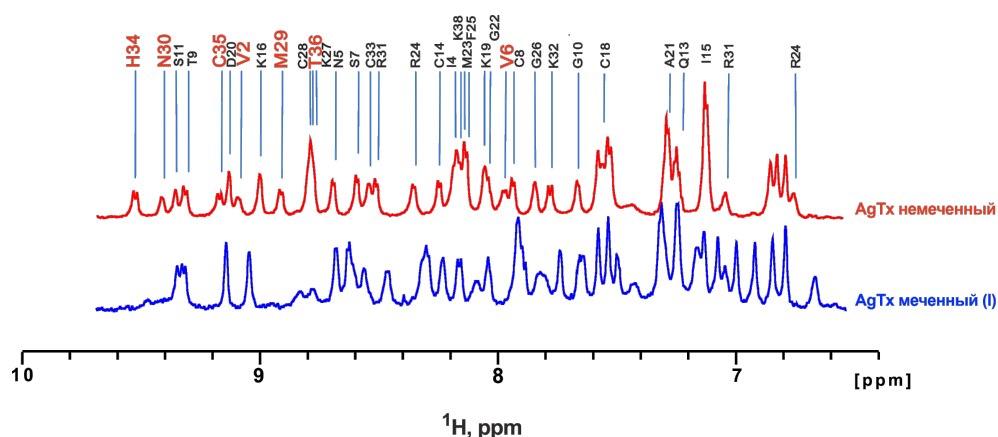


Рис. 2. ^1H ЯМР спектры немеченого и 1x меченого токсина.

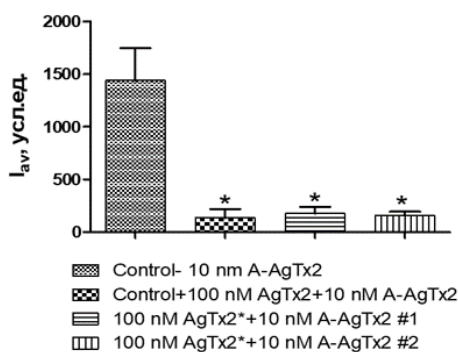


Рис. 3. Проверка активности меченого токсина AgTx2.

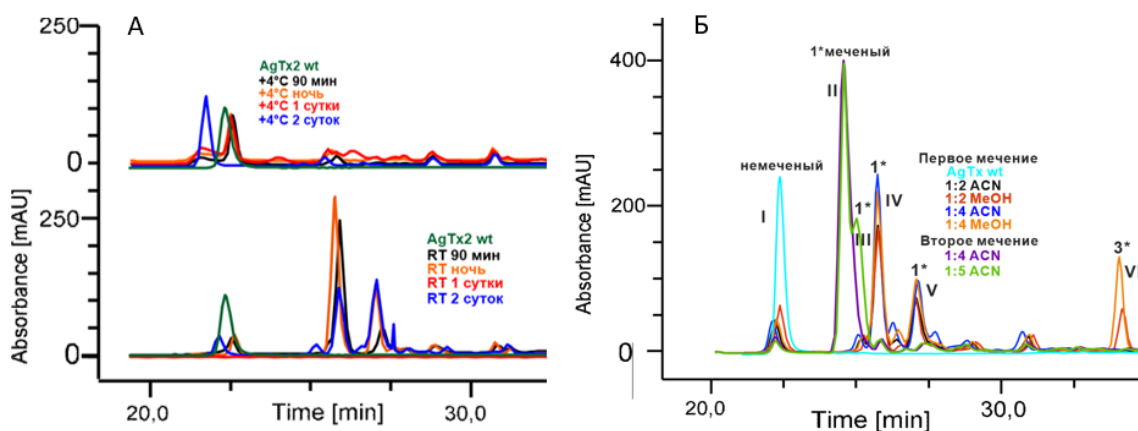


Рис. 4. А.Хроматографический анализ подбора длительности и температуры мечения AgTx2 (100мкл). Wt-дикий тип; RT-комнатная температура. В.1*меченый-меченый токсин с одной меткой. 3*- меченый токсин с тремя метками.

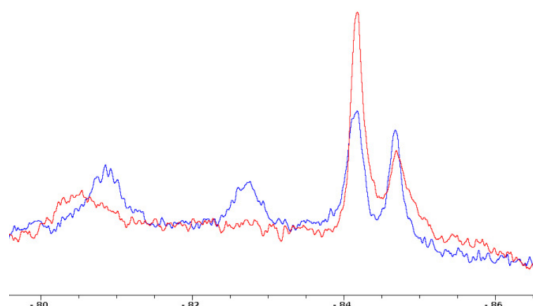


Рис. 5. Сравнение ^1H ЯМР спектров мутанта 85 + AgTx2 дикого типа (синий) и мутанта 85 + AgTx2 меченого типа (красный).