

**Флуоресцентно-меченый блокатор AgTx2-GFP в качестве зонда для аналитической системы на основе клеток, экспрессирующих каналы mKate2-Kv1.3**

**Орлов Никита Александрович**

*Аспирант*

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

*E-mail: n.orlov858@yandex.ru*

Многие пептидные токсины из ядов скорпионов являются высоко-аффинными и селективными блокаторами калиевых каналов [1]. Интерес к потенциал-зависимым калиевым каналам как к фармакологическим мишеням стимулирует разработку генетически кодируемых пептидных токсинов, слитых с флуоресцентными белками, для применения в аналитических системах и визуализации связывания блокаторов с каналами [2][3]. Мы сообщаем о свойствах агитоксина 2, меченного по С-концу белком eGFP (AgTx2-GFP), как одного из наиболее активных генетически кодируемых флуоресцентных лигандов потенциал-зависимого калиевого канала Kv1.3.

Наши исследования показывают, что AgTx2-GFP проявляет аффинность к каналу mKate2-Kv1.3, экспрессированному на мембране клеток Neuro2A и HEK293 [4]. При этом не наблюдается связывания AgTx2-GFP с клетками в отсутствие каналов mKate2-Kv1.3. AgTx2-GFP связывается с Kv1.3 на мембране клеток млекопитающих с константой диссоциации  $3,4 \pm 0,8$  нМ, обеспечивает флуоресцентную визуализацию распределения каналов на мембране клетки, и это связывание слабо зависит от состояния канала (открытое или закрытое).

Немеченный AgTx2 вытесняет AgTx2-GFP с поверхности клеток, экспрессирующих канал mKate2-Kv1.3, что свидетельствует о конкуренции лигандов за сайт связывания поровых блокаторов канала Kv1.3. Расчётная константа диссоциации AgTx2 составила  $0,7 \pm 0,2$  нМ, что согласуется с данными электрофизиологии [5]. Аналитическая система, использующая комбинацию AgTx2-GFP и mKate2-Kv1.3 может быть применена для поиска и изучения немеченых пептидных блокаторов пор каналов, а также измерения их аффинности.

### **Источники и литература**

- 1) A. I. Kuzmenkov, E. v Grishin, and A. A. Vassilevski, "Diversity of Potassium Channel Ligands [U+202F]: Focus on Scorpion Toxins," vol. 80, no. 13, pp. 1764–1799, 2015.
- 2) G. Tajti, D. C. C. Wai, G. Panyi, and R. S. Norton, "The voltage-gated potassium channel KV1.3 as a therapeutic target for venom-derived peptides," *Biochemical Pharmacology*, vol. 181. Elsevier Inc., Nov. 01, 2020.
- 3) D. C. C. Wai et al., "A Fluorescent Peptide Toxin for Selective Visualization of the Voltage-Gated Potassium Channel KV1.3," *Bioconjug Chem*, vol. 33, no. 11, pp. 2197–2212, Nov. 2022
- 4) N. A. Orlov et al., "Combining mKate2-Kv1.3 Channel and Atto488-Hongotoxin for the Studies of Peptide Pore Blockers on Living Eukaryotic Cells," *Toxins (Basel)*, vol. 14, no. 12, Dec. 2022

- 5) M. L. Garcia, M. Garcia-Calvo, P. Hidalgo, A. Lee, and R. MacKinnon, "Purification and Characterization of Three Inhibitors of Voltage-Dependent K<sup>+</sup> Channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* Venom," *Biochemistry*, vol. 33, no. 22, pp. 6834–6839, Jun. 1994