

АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНО-МЕЧЕНОГО КАНАЛА Kv1.2 И HgTx-L3-GFP ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРОВ

А. А. Игнатова¹, О. В. Некрасова¹, А. В. Феофанов^{1,2}

¹ФГБУ науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия

²МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

Применение аффинных и высокоселективных пептидных блокаторов как ингибиторов активности калиевых потенциал-зависимых Kv1-каналов является перспективным подходом к изучению функционирования Kv1-каналов, а также разработке эффективных способов терапевтического воздействия на их активность. Использование высокочувствительных флуоресцентных методов для скрининга и изучения аффинности пептидных блокаторов Kv1-каналов является привлекательной альтернативой традиционным методам анализа (электрофизиологии, радиолигандному анализу).

В данной работе мы докладываем о создании аналитической системы с использованием клеток Neuro2a, экспрессирующих в мембране флуоресцентно-меченый канал Kv1.2 (Neuro2a/Kv1.2), и генетически кодируемого флуоресцентного пептидного блокатора хонготоксина 1 (HgTx-L3-GFP) и о результатах апробации этой системы для исследования аффинности пептидных блокаторов.

Исследование взаимодействий HgTx-L3-GFP с каналом Kv1.2 на мембране клеток Neuro2a показало, что он образует комплексы с каналами в наномолярном диапазоне концентраций, вытесняется из комплексов конкурирующими немечеными пептидными блокаторами канала Kv1.2 и не проявляет неспецифического связывания с иными компонентами мембраны клеток при исследованных концентрациях. По методике, разработанной нами ранее [1], была определена константа диссоциации комплекса $K_d = 0,11 \pm 0,05$ нМ.

Используя аналитическую систему на основе Neuro2a/Kv1.2, методом конкурентного ингибирования связывания были измерены константы диссоциации K_i комплексов канала Kv1.2 с немечеными пептидными блокаторами, представителями различных семейств токсинов из яда скорпионов: харибдотоксином (ChTx, $K_i = 1,03$ нМ) агитоксином 2 (AgTx2, $K_i = 21,5$ нМ), хонготоксином 1 (HgTx1, $K_i = 20$ пМ) и маргатоксином (MgTx, $K_i = 14$ пМ). Активность ChTx, AgTx2 и HgTx1 впервые измерена на каналах Kv1.2 человека, и она значительно отличается от опубликованных данных, измеренных на каналах Kv1.2 крысы. Активность MgTx, измеренная нами, подтверждает результат, опубликованный ранее для каналов человека.

Таким образом, разработанная нами аналитическая система на основе клеток Neuro2a, экспрессирующих канал mKate2-Kv1.2, и HgTx-L3-GFP, позволяет проводить скрининг пептидных блокаторов Kv1.2 по способности связываться с внеклеточной областью порового домена канала и анализировать аффинность этих пептидов к каналу методом конфокальной флуоресцентной микроскопии.

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда № 22-14-00406.

Библиографические ссылки

1. Combining mKate2-Kv1.3 channel and Atto488-hongotoxin for the studies of peptide pore blockers on living eukaryotic cells / N. A. Orlov [et al.] // Toxins. 2022. Vol. 14. P. 858.