

**Генокодируемый селективный флуоресцентный лиганд калиевого канала Kv1.3 на основе агитоксина 2 и зеленого флуоресцентного белка**

**Научный руководитель – Феофанов Алексей Валерьевич**

**Примак Александра Леонидовна**

*Студент (бакалавр)*

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

*E-mail: primak.msu@mail.ru*

Полипептидные токсины из ядов животных являются высокоаффинными и специфичными лигандами ионных каналов. Они рассматриваются в качестве основы для создания перспективных средств лечения ряда заболеваний а также используются для изучения структуры, локализации и функционирования ионных каналов. Это обуславливает возрастающий интерес к разработке флуоресцентно меченых пептидных лигандов как новых молекулярных инструментов для фундаментальных и прикладных исследований. Перспективной альтернативой использованию органических флуоресцентных красителей является разработка генетически кодируемых флуоресцентных пептидных лигандов. Возможность их создания была недавно продемонстрирована в нашей лаборатории. На основе флуоресцентных GFP и RFP и пептидных блокаторов OSK1 и агитоксина 2 были получены GFP-OSK1 и RFP-AgTx2 и продемонстрирована их высокая аффинность к каналам Kv1.x (x=1,3,6). Для дальнейшего развития биоинженерных подходов к конструированию генокодируемых флуоресцентных пептидных лигандов калиевых каналов и увеличения их разнообразия необходимо создание новых химерных белков и детальное изучение их свойств.

Целью данной работы являлось конструирование нового флуоресцентного лиганда на основе GFP и AgTx2, а также изучение особенностей его взаимодействия с лиганд-связывающими сайтами каналов Kv1.x (x=1,3,6).

Мы сконструировали His6-GFP-L2-AgTx2, в котором к AgTx2 по N- концу через гибкий линкер L2 был присоединен GFP. На N-конце GFP находились гексагистидиновый таг (His6) и сайт расщепления TEV-протеазы. Чтобы уточнить влияние структурной организации химерного белка на его свойства, нами были созданы модифицированные конструкции с удаленным His6 и измененным линкером. Целевые белки были экспрессированы в клетках *E. coli* и очищены с использованием Ni-аффинной хроматографии, выход составил 80-160 мг целевых продуктов с 1 л культуры.

С использованием метода ЛСКМ и аналитических клеточных систем на основе клеток *E. coli*, экспрессирующих во внутренней мембране гибридные KcsA-Kv1.x (x=1,3,6), мы исследовали взаимодействие полученных конструкций с лиганд-связывающими сайтами Kv1.x. Было обнаружено, что His6-GFP-L2-AgTx2 взаимодействует только с лиганд-связывающим сайтом канала Kv1.3 и не взаимодействует с Kv1.1 и Kv1.6. Измеренная константа диссоциации (Kd) комплекса His6-GFP-L2-AgTx2 с лиганд-связывающим сайтом Kv1.3 составила  $10 \pm 2$  нМ. Охарактеризована зависимость Kd комплекса от pH.

Установлено, что изменение структуры His6-GFP-L2-AgTx2, а именно, удаление His6 или изменение структуры линкера, не влияет на селективность взаимодействия химерного белка с KcsA-Kv1.3.

Таким образом, впервые создан генокодируемый флуоресцентный высокоселективный и высокоаффинный лиганд калиевого канала Kv1.3. Продемонстрировано, что His6-GFP-L2-AgTx2 может быть использован для поиска блокаторов канала Kv1.3 в сложных по

составу ядах скорпионов, а также для изучения свойств различных видов пептидных блокаторов природного и искусственного происхождения.