

Химеры флуоресцентных белков и полипептидных токсинов – новые инструменты для визуализации ионных каналов**Научный руководитель – Василевский Александр Александрович***Чудецкий И.С.¹, Кузьменков А.И.², Кудрявцев Д.С.³, Кашеверов И.Е.⁴, Reigneur S.⁵, Tytgat J.⁶*

1 - Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, *E-mail: ivan.chudetskiy@gmail.com*; 2 - Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, *E-mail: anteka@ya.ru*; 3 - Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, Россия, *E-mail: kudryavtsevdn@gmail.com*; 4 - Московский физико-технический институт, Москва, Россия, *E-mail: shak_ever@yahoo.com*; 5 - Левенский Университет, Левен, Бельгия, *E-mail: iw.vanezzz350@yandex.ru*; 6 - Левенский Университет, Левен, Бельгия, *E-mail: fb.vanezzz350@yandex.ru*

Ионные каналы являются одним из важнейших объектов фундаментальных и прикладных исследований в области современной нейробиологии и фармакологии. Интерес к этим трансмембранным белкам обусловлен множеством выполняемых ими физиологических функций. Лиганды ионных каналов способны регулировать их работу посредством образования комплекса с рецепторным участком или специфическим сайтом связывания. Они могут служить молекулярными инструментами в научных исследованиях или выступать в качестве прототипов высокоэффективных лекарственных препаратов. Значительное количество лигандов ионных каналов было найдено в ядах различных животных. Применение к ним всевозможных модификаций, например, использование флуоресцентных или радиоактивных меток, позволяет использовать их в качестве репортерных молекул.

В данной работе продемонстрирован новый подход в получении меченых лигандов. Разрабатываемые зонды представляют собой слитные белки, состоящие из нескольких функциональных частей: флуоресцентного белка, полипептидного нейротоксина, линкера и гексагистидинового тега. В нашей работе были использованы семь нейротоксинов из различных источников, оказывающих селективное действие на разные мишени: HsTx1 (калиевые каналы), VeM9 (натриевые каналы), MVIIC (кальциевые каналы), PT1 (пуриnergические рецепторы), а также α -CbTx, NT-II и α -BGT (никотиновые ацетилхолиновые рецепторы и рецепторы гамма-аминомасляной кислоты). Кроме того, были выбраны следующие флуоресцентные белки: TagBFP, eGFP, mKate2 с максимумами эмиссии в синем, зеленом и красном диапазоне спектра соответственно, а также фотоконвертируемый белок mEos3.2. Гены, кодирующие химерные белки, были сконструированы таким образом, что с легкостью было возможным заменить любой из модулей. Ряд гибридных молекул с различной комбинацией нейротоксинов и флуоресцентных белков был получен с использованием гетерологической системы экспрессии в *Escherichia coli* BL21(DE3). Физиологическая активность полученных гибридных белков в отношении их мишеней была оценена с использованием методов радиолигандного анализа и двухэлектродной фиксации потенциала. Гибридный белок eGFP- α -CbTx был использован для специфического окрашивания рецепторов гамма-аминомасляной кислоты на поверхности клеток нейробластомы мыши линии Neuro2a и никотиновых ацетилхолиновых рецепторов нейронального типа на поверхности клеток гипофиза крысы линии GH4C1.

Гибридные белки указанного строения имеют значительные преимущества перед другими мечеными токсинами, такие как: легкость получения и очистки, низкая себестоимость и безопасность применения. Представленный нами подход обладает большим потенциалом для дальнейших научных исследований, а также может быть использован для

создания молекулярных диагностических зондов для медицины.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 18-74-00125).