

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.352.332+577.352.465

N- или С-концевое положение флуоресцентного белка mKate2 в составе химеры mKate2-KCa3.1 влияет на мембранную экспрессию канала

В.Н. Корабейникова^{1, 2, *}, А.В. Феофанов^{1, 2} , О.В. Некрасова¹ ¹Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Российская академия наук, Россия, 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10;²Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

*e-mail: var.kora.3@gmail.com

Активируемый кальцием калиевый канал промежуточной проводимости $K_{Ca}3.1$ способствует Ca^{2+} -зависимой гиперполяризации клеточной мембраны, а нарушения его работы наблюдаются при аутоиммунных и онкологических заболеваниях. Для изучения этого канала и его пептидных блокаторов с использованием флуоресцентного анализа были сконструированы плазмиды, кодирующие α -субъединицу $K_{Ca}3.1$, слитую с флуоресцентным белком mKate2 на N- или С-конце, а также получен флуоресцентный лиганд ChTx-GFP, объединяющий в себе пептидный блокатор харибдотоксин и зеленый флуоресцентный белок. Установлено, что mKate2 на N-конце α -субъединицы блокирует перенос канала в плазматическую мембрану клеток Neuro-2a, тогда как mKate2 на ее С-конце не препятствует эффективному накоплению канала в плазматической мембране и формированию его правильной тетрамерной структуры, способной связывать пептидные блокаторы. Лиганд ChTx-GFP связывается на мембране с каналом $K_{Ca}3.1$ при концентрации 20 нМ и может быть использован для флуоресцентного имиджинга этих каналов в клетках млекопитающих.

Ключевые слова: калиевые каналы, канал $K_{Ca}3.1$, пептидные блокаторы, флуоресценция, конфокальная микроскопия

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-7

Введение

Кальций-зависимые калиевые каналы — это белки клеточной мембраны, которые активируются в ответ на увеличение концентрации кальция внутри клетки и осуществляют перенос ионов калия и регулируют потенциал мембраны [1]. Канал промежуточной проводимости $K_{Ca}3.1$, экспрессирующийся в эритроцитах, Т- и В-лимфоцитах, а также сосудином эндотелии, участвует в кальциевой сигнализации и играет роль в регуляции разнообразных физиологических процессов, включая пролиферацию клеток [2, 3], синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов [4], изменение объема клеток [5], миграцию [6] и апоптоз [7]. Поскольку нарушения нормального функционирования $K_{Ca}3.1$ ассоциированы с рядом заболеваний, в первую очередь аутоиммунных и онкологических, канал рассматривается в качестве потенциальной мишени при их лечении [8]. Возможность подавления проли-

ферации с помощью блокаторов канала $K_{Ca}3.1$ продемонстрирована на лимфоцитах, активация которых сопровождается повышением уровня экспрессии канала $K_{Ca}3.1$ [2]. Таким образом, изучение механизмов функционирования $K_{Ca}3.1$ и его взаимодействия с блокаторами является важной медико-биологической задачей.

Большим терапевтическим потенциалом обладают пептидные блокаторы, источником которых являются животные яды, в частности, яды скорпионов [9]. В настоящее время известно лишь небольшое количество пептидных блокаторов канала $K_{Ca}3.1$, среди которых природные токсины харибдотоксин (ChTx) и мауротоксин [10], обладающие наномолярной аффинностью к каналу $K_{Ca}3.1$, а также несколько мутантных и искусственно сконструированных химерных пептидов [11–13]. При этом многие из известных пептидных блокаторов калиевых каналов до сих пор не исследованы в отношении канала $K_{Ca}3.1$.

Изучение канала $K_{Ca}3.1$, а также его пептидных блокаторов требует разработки новых подходов, в том числе с использованием флуоресцентного анализа. В данной работе представлены результаты применения флуоресцентных белков mKate2 и eGFP для создания методами биоинженерии соответственно флуоресцирующего канала mKate2- $K_{Ca}3.1$ (K - $K_{Ca}3.1$) с высокой экспрессией в плазматической мембране клеток млекопитающих и его флуоресцентного лиганда ChTx-GFP на основе ChTx из яда скорпиона *Leiurus quinquestriatus hebraeus*.

Материалы и методы

Конструирование флуоресцентно-меченых α -субъединиц канала $K_{Ca}3.1$. Ген *KCNN4*, кодирующий α -субъединицу $K_{Ca}3.1$, предоставлен д.б.н. Е.С. Никитиным (Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, г. Москва). Плазмида pKCNN4-mKate2, кодирующая α -субъединицу $K_{Ca}3.1$ слитую по С-концу через линкер GGGGSGGLRS с флуоресцентным белком mKate2 ($K_{Ca}3.1$ -K), была получена ранее [14].

Для получения плазмиды pmKate2-KCNN4, ген *KCNN4* был клонирован в плазмиду pmKate2-C (Evrogen, Россия) по сайтам узнавания рестриктаз *BglIII* и *HindIII*. Амплификацию гена *KCNN4* проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров *KCNN4-f1* 5'-TTCAAGTCTGGCGGGGATCTGGTGCTTG-3' и *KCNN4-r1* 5'-TTCAAGCTTCACTTGGACTGCTGGCTGG-3' (последовательности сайтов *BglIII* и *HindIII* подчеркнуты). Плазмида pmKate2-KCNN4 обеспечивает экспрессию α -субъединицы $K_{Ca}3.1$, к N-концу которой через линкер GGGGSGGLRS присоединен флуоресцентный белок mKate2 (K - $K_{Ca}3.1$).

Нуклеотидная последовательность гена *KCNN4* в плазмиде pmKate2-KCNN4 была подтверждена секвенированием по методу Сэнгера (Evrogen, Россия).

Получение флуоресцентно-меченого харибдотоксина (ChTx-GFP). Ген, кодирующий последовательность пептидного токсина ChTx (QFTNVSC TTSKECWSVCQRLHNTSRGKCMNKKCRCS, 37 а.о.), был синтезирован с помощью ПЦР с использованием олигонуклеотидных праймеров, содержащих сайты узнавания рестриктаз *KpnI* и *BamHI* (подчеркнуты) и последовательность, кодирующую сайт расщепления протеазы TEV (выделена жирным шрифтом): *Ch-f1* (5'-TTCTGGTACCGAAAACCTGTATTTCAGCAGTTCCACCAATGTGAGCTGCAC-3'), *Ch-f2* (5'-GGAGCGTGTCAGCGCCTGCATAACACCAGCCGTGGCAAA TGCATG-3'), *Ch-r1* (5'-CTGACACACGCTCCAGCATTTCTTTAGACGTGGTGCAGCTCACATT-3') и *Ch-r2* (5'-TTCTGGATCCGCTATAACAGCGACATTTTATTTCATGCAATTTGCCAC-3'). Полученный фрагмент ДНК длиной около 150 пар основа-

ний (п.о.) гидролизовали эндонуклеазами рестрикции *KpnI* и *BamHI*, а затем клонировали по сайтам *KpnI/BamHI* в экспрессионную плазмиду pET23-MalE-AgTx2-L3-GFP [15], заменяя ген пептидного токсина AgTx2 на ген ChTx. В результате была получена плазмида pET23-MalE-ChTx-L3-GFP, обеспечивающая экспрессию гибридного белка MBP-ChTx-GFP, в котором ChTx фланкирован по N-концу мальтозасвязывающим белком (MBP, Maltose-Binding Protein) и сайтом расщепления протеазы TEV, а по С-концу связан с флуоресцентным белком GFP через полипептидный линкер L3 (GSGGSGGSGGTGGAGGATST).

Выделение флуоресцентного харибдотоксина (ChTx-GFP) проводили в соответствии с разработанной ранее методикой [15]. Химерный белок MBP-ChTx-GFP экспрессировали в клетках *E. coli Rosetta-gamiB(DE3)pLysS* (Novagen). Очистку целевого белка из клеточного лизата осуществляли методом Ni-аффинной хроматографии с использованием Ni-Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, США), полученный белок MBP-ChTx-GFP расщепляли протеазой TEV, а образовавшийся в результате расщепления белок ChTx-GFP отделяли с помощью повторной Ni-аффинной хроматографии (рис. 1А). Очищенный ChTx-GFP хранили при температуре 4°C. Определение концентрации белка проводили спектрофотометрически (рис. 1Б) с использованием молярного коэффициента экстинкции для eGFP ($\epsilon(488 \text{ нм}) = 55\,000 \text{ M}^{-1}\text{см}^{-1}$). Выход ChTx-GFP составлял около 20 мг на 1 л культуры.

Эксперименты с клетками. Клетки нейробластомы мыши Neuro-2a были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, г. Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM (Ранесо, Россия), дополненной 10% фетальной бычьей сывороткой (PAA Laboratories, Австрия) при 37°C (5% CO_2) с пересевом два раза в неделю.

Для экспериментов клетки высевали на покрытые поли-L-лизинном стекла в 24-луночные планшеты (3×10^4 клеток на лунку). Через 24 ч клетки трансфицировали плазмидными конструкциями K - $K_{Ca}3.1$ или $K_{Ca}3.1$ -K, используя реагент GenJector-U (Молекта, Россия) в соответствии с протоколом производителя. Исследования проводили через 24 ч после трансфекции.

В исследованиях флуоресцентного лиганда в лунки планшета к трансфицированным клеткам добавляли ChTx-GFP в концентрации 10 нМ и инкубировали в среде с сывороткой 1 ч (37°C, 5% CO_2).

Конфокальная микроскопия. Использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Leica-SP2 (Leica Microsystems GmbH, Германия), оснащенный водо-иммерсионным объективом с увеличением 63 $\times$ (HCX PL APO, NA = 1,2). Латеральное и аксиальное разрешение в экспериментах было 0,2 и 0,6 мкм соответственно.

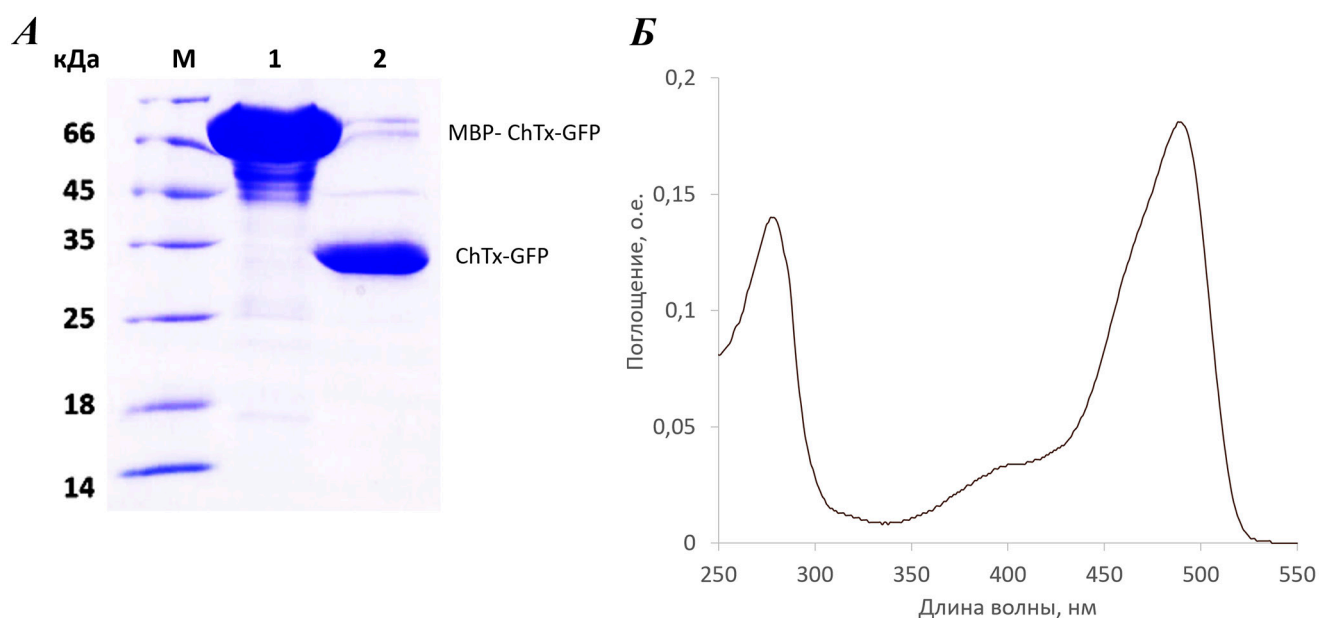


Рис. 1. Выделение ChTx-GFP. **А** – Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия белка MBP-ChTx-GFP после Ni-аффинной хроматографии и обессоливания (дорожка 1) и очищенного белка ChTx-GFP после расщепления белка MBP-ChTx-L3-GFP протеазой TEV (дорожка 2). М – маркеры молекулярных масс белков. **Б** – Спектр поглощения очищенного белка ChTx-GFP.

Флуоресценцию K-K_{Ca}3.1 или K_{Ca}3.1-K возбуждали светом с длиной волны 561 нм, а регистрировали в диапазоне длин волн 600–700 нм. Флуоресценцию лиганда ChTx-GFP возбуждали при 488 нм, а регистрировали в диапазоне 498–550 нм.

Результаты и обсуждение

Эффективную экспрессию α -субъединиц K_{Ca}3.1, слитых с флуоресцентным белком mKate2 по N- и C-концу, наблюдали в 40% трансфицированных клеток Neuro-2a. Обнаружено, что характер распределения K-K_{Ca}3.1 и K_{Ca}3.1-K в клетках различается. По данным конфокальной микроскопии для белка K_{Ca}3.1-K характерно интенсивное накопление в плазматической мембране, дополненное неоднородным распределением в цитоплазме (рис. 2А). В свою очередь, белок K-K_{Ca}3.1 распределен неоднородно в цитоплазме клеток, но без выраженной локализации в плазматической мембране (рис. 2Б). Картина распределения K-K_{Ca}3.1 похожа на типичное распределение α -субъединиц калиевых каналов в эндоплазматическом ретикулуме [16, 17].

Лиганд ChTx-GFP был получен в экспрессионной системе *E. coli* в составе гибридного белка MBP-ChTx-GFP. Использование мальтозасвязывающего белка в качестве белка-партнера способствует высокому уровню экспрессии и растворимости гибридного белка в клетках *E. coli*, а наличие сайта расщепления протеазы TEV, прилегающего к N-концу ChTx, обеспечивает сохранение нативного N-конца этого пептида после расщепления гибрида [15]. Полученный гибридный белок MBP-ChTx-GFP и флуоресцентно-ме-

ченный лиганд ChTx-GFP соответствовали по молекулярной массе расчетным значениям и не имели признаков деградации (рис. 1А, Б)

Инкубация клеток, экспрессирующих канал K_{Ca}3.1-K, с белком ChTx-GFP сопровождается окрашиванием плазматической мембраны клеток в спектральном диапазоне 498–550 нм, что свидетельствует о взаимодействии флуоресцентно-меченого лиганда ChTx-GFP с таргетными каналами K_{Ca}3.1-K, локализованными в клеточной мембране (рис. 2В, Г). В случае клеток, экспрессирующих K-K_{Ca}3.1, окрашивания мембраны не обнаружено (рис. 2Д, Е), что подтверждает отсутствие канала K-K_{Ca}3.1 в плазматической мембране, выявленное при изучении внутриклеточного распределения канала (рис. 2Б). При трансфекции клеток Neuro-2a плазмидами, экспрессирующими каналы K_{Ca}3.1-K или K-K_{Ca}3.1, в поле зрения микроскопа попадают нетрансфицированные клетки, которые не связывают ChTx-GFP на своей поверхности (рис. 2В, Г, положение клеток указано желтыми стрелками), что указывает на отсутствие неспецифического связывания используемого флуоресцентного лиганда с клеточной мембраной.

Зеленая флуоресценция в цитоплазме клеток, часто имеющая выраженный гранулярный характер, наблюдается в нетрансфицированных клетках и может усиливаться в клетках после трансфекции (рис. 2Г, Е, голубые стрелки). Эта флуоресценция связана с образованием в цитоплазме пигментов старения [18] и не является, в случае инкубации клеток с ChTx-GFP, признаком внутриклеточного накопления этого лиганда.

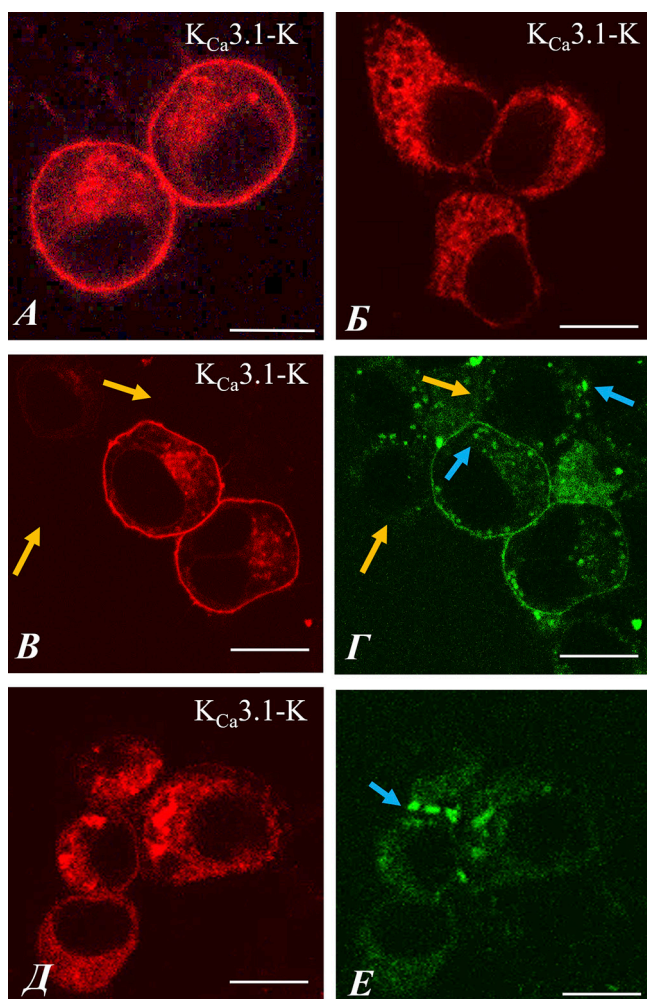


Рис. 2. Конфокальные изображения клеток Neuro-2a, экспрессирующих KCa3.1-K (А, В, Г) и K-KCa3.1 (Б, Д, Е) в отсутствие (А, Б) и в присутствии (В–Е) 20 нМ ChTx-GFP. Типичные распределения KCa3.1-K (А, В) и KCa3.1-K (Б, Е) в клетках Neuro-2a. Распределения флуоресценции в спектральном диапазоне 498–550 нм после инкубации клеток с 20 нМ ChTx-GFP (Г, Е). Желтыми стрелками указаны не-трансфицированные клетки, голубыми – пигменты старения. Метки масштаба – 20 мкм.

Известно, что ChTx блокирует токи ионов калия через канал $K_{Ca3.1}$, связываясь в области внешнего вестибуля поры с константой диссоциации 5 нМ [10]. Во взаимодействии пептидных блокаторов с порой участвуют аминокислотные остатки нескольких α -субъединиц при их правильной сборке в функционально активный канал [16, 18]. Очевидно, что мембранная флуоресценция ChTx-GFP отражает связывание данного белка с $K_{Ca3.1}$ -К на плазматической мембране, что свидетельствует о следующем: $K_{Ca3.1}$ -К в мембране находится в составе каналов; ChTx, входящий в химерный белок ChTx-GFP, сохраняет способность взаимодействовать с каналом $K_{Ca3.1}$.

Использование флуоресцентных белков для мечения пептидных блокаторов, как правило, не приводит к появлению неспецифического связывания с компонентами плазматической мембры-

ны, но снижает их аффинность (в ряде случаев очень значительно) и может менять профиль взаимодействия с каналами [15, 16, 19]. В случае ChTx-GFP интенсивное взаимодействие с каналом $K_{Ca3.1}$ наблюдалось при концентрации лиганда 20 нМ и больше, что отражает снижение аффинности пептидного токсина ChTx к каналу в составе химерного белка, содержащего флуоресцентный белок eGFP. Образование комплексов между ChTx-GFP и каналом $K_{Ca3.1}$ не сопровождалось заметным изменением распределения канала на мембране клеток Neuro-2a (рис. 2А, В).

Отсутствие накопления K-K $Ca3.1$ в плазматической мембране, подтвержденное отсутствием связывания с ChTx-GFP (рис. 2Б, Д, Е), свидетельствует о негативном влиянии mKate2, присоединенного к N-концу α -субъединицы, на транспорт K-K $Ca3.1$ из эндоплазматического ретикулума в плазматическую мембрану.

На N-конце α -субъединицы $K_{Ca3.1}$ находится так называемая «лейциновая молния» (застежка), которая определяет не только тетрамеризацию α -субъединиц, но и транспорт канала в плазматическую мембрану [20]. В составе канала N-концы α -субъединиц сближены с С-концами, которые в свою очередь участвуют в связывании кальмодулина [21]. Эффективное взаимодействие между кальмодулином и С-концевой областью α -субъединицы критически важно для сборки канала в эндоплазматическом ретикулуме и его дальнейшего переноса в плазматическую мембрану [21]. Возможно, что mKate2 на N-конце α -субъединицы стерически мешает связыванию кальмодулина С-концевой областью α -субъединицы. В свою очередь, mKate2, присоединенный к С-концу α -субъединицы $K_{Ca3.1}$, по-видимому, не влияет на взаимодействие канала с кальмодулином. Отметим, что для эффективной экспрессии на мембране клеток Neuro-2a канала $K_{Ca3.1}$ не потребовалось вводить в аминокислотную последовательность α -субъединицы дополнительных мутаций, способствующих транспорту канала в мембрану, в отличие, например, от ранее исследованных каналов Kv1.1 и Kv1.2 [16, 17]. Это свойство канала $K_{Ca3.1}$ может быть связано как с присутствием в составе α -субъединицы сильных сигнальных аминокислотных последовательностей, направляющих транспорт канала в мембрану [21], так и с эндогенной экспрессией в клетках Neuro-2a необходимых вспомогательных белков-переносчиков.

Заключение

Наличие флуоресценции у калиевых каналов при их экзогенной экспрессии в клетках млекопитающих существенно облегчает изучение этих каналов методами флуоресцентной микроскопии и электрофизиологии [14, 16, 17, 22–26]. При конструировании флуоресцирующего канала $K_{Ca3.1}$ обнаружено, что транспорт в плазматическую

мембрану канала $K_{Ca}3.1$, α -субъединицы которого слиты с флуоресцентным белком mKate2, критически зависит от положения mKate2 в составе химерной белковой конструкции. Белок mKate2 на N-конце α -субъединицы $K_{Ca}3.1$ не мешает экспрессии $K-K_{Ca}3.1$ в клетках Neuro-2a, но блокирует его транспорт в плазматическую мембрану. Белок mKate2 на C-конце α -субъединицы $K_{Ca}3.1$ сохраняет способность к интенсивному встраиванию флуоресцирующего канала в мембрану и его взаимодействию с пептидными блокаторами, в том числе с флуоресцентно-мечеными.

ChTx-GFP расширяет видовое разнообразие флуоресцентных лигандов калиевых каналов на основе пептидных блокаторов слитых с флуорес-

центными белками для имиджинга каналов на мембране клеток млекопитающих. ChTx-GFP и $K_{Ca}3.1$ -K могут быть использованы в качестве компонентов аналитической клеточной системы для изучения канала $K_{Ca}3.1$ и поиска эффективных пептидных блокаторов этого канала, как это показано ранее на примере потенциал-зависимых калиевых каналов Kv1 [16, 17].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект №22-1400406П). Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Orfali R., Albanyan N. Ca^{2+} -sensitive potassium channels. *Molecules*. 2023; 28(2):885.
2. Ghanshani S., Wulff H., Miller M.J., Rohm H., Neben A., Gutman G.A., Cahalan M.D., Chandy K.G. Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation: molecular mechanism and functional consequences. *J. Biol. Chem.* 2000;275(47):37137–37149.
3. Calderón Artavia C.G., Arvelo Álvarez F.A. Kca3.1-related cellular signalling involved in cancer proliferation. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2024;58(2):107–127.
4. Cahalan M.D., Chandy K.G. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 2009;231(1):59–87.
5. Deutsch C., Chen L.Q. Heterologous expression of specific K^+ channels in T lymphocytes: functional consequences for volume regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993;90(21):10036–10040.
6. Cruse G., Duffy S.M., Brightling C.E., Bradding P. Functional KCa3.1 K^+ channels are required for human lung mast cell migration. *Thorax*. 2006;61(10):880–885.
7. Szabó I., Zoratti M., Gulbins E. Contribution of voltage-gated potassium channels to the regulation of apoptosis. *FEBS Lett.* 2010;584(10):2049–2056.
8. Chou C.C., Lunn C.A., Murgolo N.J. KCa3.1: target and marker for cancer, autoimmune disorder and vascular inflammation? *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2008;8(2):179–187.
9. Brown B.M., Shim H., Christophersen P., Wulff H. Pharmacology of small-and intermediate-conductance calcium-activated potassium channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2020;60(1):219–240.
10. Visan V., Sabatier J.M., Grissmer S. Block of maurotoxin and charybdotoxin on human intermediate-conductance calcium-activated potassium channels (hIKCa1). *Toxicol.* 2004;43(8):973–980.
11. Pimentel C., M'Barek S., Visan V., Grissmer S., Sampieri F., Sabatier J.M., Darbon H., Fajloun Z. Chemical synthesis and 1H-NMR 3D structure determination of AgTx2-MTX chimera, a new potential blocker for Kv1.2 channel, derived from MTX and AgTx2 scorpion toxins. *Protein Sci.* 2008;17(1):107–118.
12. M'Barek S., Chagot B., Andreotti N., Visan V., Mansuelle P., Grissmer S., Marrakchi M., El Ayeb M., Sampieri F., Darbon H., Fajloun Z., De Waard M., Sabatier J.M. Increasing the molecular contacts between maurotoxin and Kv1.2 channel augments ligand affinity. *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.* 2005;60(3):401–411.
13. Rauer H., Lanigan M.D., Pennington M.W., Aiyar J., Ghanshani S., Cahalan M.D., Norton R.S., Chandy K.G. Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca^{2+} -activated over voltage-gated K^+ channels. *J. Biol. Chem.* 2000;275(2):1201–1208.
14. Bal N.V., Oblasov I., Ierusalimsky V.N., Shvadchenko A.M., Fortygina P., Idzhilova O.S., Borodinova A.A., Balaban P.M., Feofanov A.V., Nekrasova O.V., Nikitin E.S. Potassium KCa3.1 channel overexpression deteriorates functionality and availability of channels at the outer cellular membrane. *Sci. Rep.* 2025;15(1):4928.
15. Primak A.L., Orlov N.A., Peigneur S., Tytgat J., Ignatova A.A., Denisova K.R., Yakimov S.A., Kirpichnikov M.P., Nekrasova O.V., Feofanov A.V. AgTx2-GFP, fluorescent blocker targeting pharmacologically important Kv1.x (x = 1, 3, 6) channels. *Toxins*. 2023;15(3):229.
16. Ignatova A.A., Kryukova E.V., Novoseletsky V.N., Kazakov O.V., Orlov N.A., Korabeynikova V.N., Larina M.V., Fradkov A.F., Yakimov S.A., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Nekrasova O.V. New high-affinity peptide ligands for Kv1.2 channel: Selective blockers and fluorescent probes. *Cells*. 2024;13(24):2096.
17. Orlov N.A., Kryukova E.V., Efremenko A.V., Yakimov S.A., Toporova V.A., Kirpichnikov M.P., Nekrasova O.V., Feofanov A.V. Interactions of the Kv1.1 channel with peptide pore blockers: a fluorescent analysis on mammalian cells. *Membranes*. 2023;13(7):645.
18. Porta E.A. Pigments in aging: An overview. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2002;959(1):57–65.
19. Nekrasova O.V., Volyntseva A.D., Kudryashova K.S., Novoseletsky V.N., Lyapina E.A., Illarionova A.V., Yakimov S.A., Korolkova Yu.V., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V. Complexes of peptide blockers with Kv1.6 pore domain: Molecular modeling and studies with KcsA-Kv1.6 channel. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 2017;12(2):260–276.
20. Denisova K.R., Orlov N.A., Yakimov S.A., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Nekrasova O.V. Atto488-agitoxin 2—a fluorescent ligand with increased selectivity for Kv1.3 channel binding site. *Bioengineering*. 2022;9(7):295.
21. Jones H.M., Hamilton K.L., Papworth G.D., Syme C.A., Watkins S.C., Bradbury N.A., Devor D.C. Role

of the NH2 terminus in the assembly and trafficking of the intermediate conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channel hIK1. *J. Biol. Chem.* 2004;279(15):15531–15540.

22. Lee C.H., MacKinnon R. Activation mechanism of a human SK-calmodulin channel complex elucidated by cryo-EM structures. *Science*. 2018;360(6388):508–513.

23. Balut C.M., Hamilton K.L., Devor D.C. Trafficking of intermediate (KCa3.1) and small (KCa2.x) conductance, Ca^{2+} -activated K^{+} channels: a novel target for medicinal chemistry efforts? *ChemMedChem*. 2012;7(10):1741–1755.

24. Jiménez-Pérez L., Ciudad P., Álvarez-Miguel I., Santos-Hipólito A., Torres-Merino R., Alonso E., de la Fuente M.Á., López-López J.R., Pérez-García M.T. Molecular determinants of Kv1.3 potassium channels-induced proliferation. *J. Biol. Chem.* 2016;291(7):3569–3580.

25. Spear J.M., Koborssy D.A., Schwartz A.B., Johnson A.J., Audhya A., Fadool D.A., Stagg S.M. Kv1.3 contains an alternative C-terminal ER exit motif and is recruited into COPII vesicles by Sec24a. *BMC Biochem.* 2015;16(1):16.

26. Vicente R., Escalada A., Villalonga N., Texidó L., Roura-Ferrer M., Martín-Satué M., López-Iglesias C., Soler C., Solsona C., Tamkun M.M., Felipe A. Association of Kv1.5 and Kv1.3 contributes to the major voltage-dependent K^{+} channel in macrophages. *J. Biol. Chem.* 2006;281(49):37675–37685.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 18.09.2025

Принята в печать 19.09.2025

RESEARCH ARTICLE

N- or C-terminal position of the fluorescent protein mKate2 in the mKate2-KCa3.1 chimera influences membrane expression of the channel

V.N. Korabeynikova^{1, 2, *}, A.V. Feofanov^{1, 2} , O.V. Nekrasova¹ 

¹Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 16/10 Miklukho-Maklaya Str., Moscow, 117997, Russia;

²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia

*e-mail: var.kora.3@gmail.com

The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ promotes calcium-dependent hyperpolarization of the cell membrane. Its malfunction has been observed in autoimmune and oncological diseases. To study this channel and its peptide blockers using fluorescence analysis, plasmids encoding the α -subunit $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$ fused with the fluorescent protein mKate2 at the N- or C-terminus were constructed, and the fluorescent ligand ChTx-GFP was obtained, which is a combination of the peptide blocker charybdotoxin and the green fluorescent protein. It was found that mKate2 at the N-terminus of the α -subunit blocks the transport of the channel into the plasma membrane of Neuro-2a cells, while mKate2 at its C-terminus does not interfere with the efficient accumulation of the channel in the plasma membrane and the formation of a regular tetrameric structure capable of binding peptide blockers. The ligand ChTx-GFP binds to the KCa3.1 channel on the membrane at a concentration of 20 nM and can be used for fluorescent imaging of these channels in mammalian cells.

Keywords: potassium channels, channel $\text{K}_{\text{Ca}}3.1$, peptide blockers, fluorescence, confocal microscopy

Funding: The research was supported by the Russian Science Foundation, project no. 22-1400406P.

Сведения об авторах

Коробейникова Варвара Николаевна — инженер лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН. Тел.: 8-495-335-01-00; e-mail: var.kora.3@gmail.com

Феофанов Алексей Валерьевич — докт. биол. наук., гл. науч. сотр., зав. лабораторией оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН; проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-335-01-00; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>

Некрасова Оксана Васильевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории инженерии белка ИБХ РАН. Тел.: 8-495-335-01-00; e-mail: okatja@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7216-1618>