



УДК 577.3+577.112+579.6

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ЗОНДЫ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА НА ОСНОВЕ ТРЕХПЕТЕЛЬНЫХ ТОКСИНОВ ЗМЕЙ И КРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА

© 2025 г. А. И. Кузьменков*, #, И. С. Чудецкий*, Д. С. Кудрявцев*, И. Е. Кашеверов*,
В. И. Цетлин*, А. А. Василевский*

* ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 26.04.2025 г.

После доработки 02.05.2025 г.

Принята к публикации 03.05.2025 г.

Визуализация макромолекулярных комплексов – важная задача современной биоорганической химии, которая может быть реализована с помощью различных методологических подходов. Наиболее широко используются методы с применением радиоактивно- и флуоресцентно-меченых лигандов. В рамках данного проекта разработаны молекулярные зонды, которые представляют собой гибридные конструкции, включающие один из трех змеиных токсинов (α -бунгартоксин, α -кобратоксин или нейротоксин NT-II) в сочетании с красным флуоресцентным белком mKate2. Эти химерные белки были получены в бактериальной системе экспрессии и очищены с использованием гель-фильтрации. С помощью конкурентного радиолигандного анализа с радиоактивно-меченым α -бунгартоксином установлено, что полученные зонды обладают высоким сродством к никотиновому ацетилхолиновому рецептору электрического органа ската *Torpedo californica*: значения концентраций полумаксимального ингибирования находятся в наномолярном диапазоне. Флуоресцентные зонды были успешно использованы для визуализации ацетилхолиновых рецепторов на поверхности клеток линии SH-SY5Y.

Ключевые слова: ионный канал, ацетилхолиновый рецептор, холинорецептор, лиганд, нейротоксин, радиолигандный анализ, флуоресцентная микроскопия

DOI: 10.31857/S0132342325050107

ВВЕДЕНИЕ

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (холинорецепторы, нАХР) представляют собой лиганд-зависимые пентамерные ионные каналы, которые открываются в ответ на связывание нейромедиатора ацетилхолина [1–3]. Традиционно согласно локализации в тканях организма и фармакологическим свойствам нАХР делятся на мышечные и нейрональные изоформы, которые опосредуют нервно-мышечную передачу и участ-

вуют в быстрой синаптической передаче соответственно; кроме того, нейрональные субъединицы нАХР экспрессируются и в других тканях, например, в клетках иммунной системы [4, 5]. Исторически изучение структуры и функций нАХР идет рука об руку с использованием полипептидных нейротоксинов, которые высокоаффинно и селективно связываются с этими трансмембранными белками, в качестве молекулярных исследовательских инструментов [6]. Первый

Сокращения: α -BTX – α -бунгартоксин; α -CbTx – α -кобратоксин; eGFP – улучшенный зеленый флуоресцентный белок; 6 \times His – гексагистидиновая метка; IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования; NT-II – нейротоксин II из среднеазиатской кобры *Naja oxiana*; нАХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор (холинорецептор).

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-65-40; эл. почта: aleksey.kuzmenkov@gmail.com).

подобный токсин, получивший название α -бунгаратоксин (α -BTX), был выделен из яда много-полосного краята *Bungarus multicinctus* [7]. Дальнейшие исследования показали, что яд других змей тоже содержит десятки подобных молекул, включая α -кобратоксин (α -CbTx) из моноклевой кобры *Naja kaouthia* [8], нейротоксин NT-II из среднеазиатской кобры *Naja oxiana* [9] и многие другие [10]. Все эти полипептиды имеют общую топологическую структуру: три петли (β -шпильки) выступают из небольшого гидрофобного ядра, содержащего четыре консервативные дисульфидные связи, – в результате чего данные токсины и получили название трехпетельных [11, 12].

Помимо непосредственного использования трехпетельных токсинов змей для изучения нАХР, их модифицированные производные позволили выполнить ряд впечатляющих работ [13]. Например, производные α -BTX с включением трития или радиоизотопа йода использовали для идентификации и очистки нАХР [14], а также выявления локализации и распределения рецепторов в мозге крысы. Кроме того, изотопно-меченные производные успешно применяются для радиолигандного анализа и часто используются для поиска и характеристики новых лигандов нАХР [15]. Другой способ модификации полипептидов с целью создания меченых производных состоит в их конъюгации с флуорофором [16]. Такие молекулярные зонды показали высокую эффективность для визуализации распределения нАХР в скелетных мышечных волокнах [17, 18]. Флуоресцентные производные NT-II были также успешно применены для исследования связывания и картирования мышечных холинорецепторов [19]. В дополнение к модификации полипептидных токсинов низкомолекулярными флуоресцентными метками, такими как флуоресцеин, тетраметилродамин и многими другими, молекулярные зонды могут быть получены в качестве гибридов флуоресцентных белков и токсинов [20]. Флуоресцентные белки нашли широкое применение в качестве молекулярно-биологических инструментов, хотя в большинстве случаев они выступают в роли меток для изучения экспрессии клеточных белков [21, 22]. Ранее было показано, что флуоресцентный зонд, который представляет собой продукт слияния α -CbTx и улучшенного зеленого флуоресцентного белка (eGFP), сохраняет способность связываться с нАХР. Используя eGFP- α -CbTx,

удалось визуализировать нАХР, экспрессированные на поверхности клеток Neuro2a, а также была показана возможность использования подобных конструктов в проточной цитометрии [23].

Целью данного исследования была разработка флуоресцентных молекулярных зондов на основе одного из трехпетельных токсинов змей (α -CbTx, α -BTX или NT-II), действующего на нАХР, и красного флуоресцентного белка mKate2 [24]. Для реализации этой цели были поставлены следующие задачи: конструкция гибридных генов, кодирующих данные зонды, получение и очистка химерных белков, физико-химическая и физиологическая характеристика полученных соединений, а также оценка возможности использования разработанных зондов в качестве инструментов для флуоресцентной микроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Молекулярный дизайн и получение флуоресцентных зондов. В основе структуры использованных нами молекулярных зондов лежит единственная полипептидная цепь, содержащая несколько функциональных модулей: *N*-концевую гексагистидиновую метку ($6\times$ His) для выделения и очистки конечных продуктов, флуоресцентный белок, линкерный участок, состоящий из чередующейся последовательности $3\times$ (GGGS), и трехпетельный токсин (лигандный модуль) в *C*-концевой области. Гибридные гены сконструированы таким образом, чтобы позволить осуществить замену любого функционального участка ДНК с использованием специально предусмотренных сайтов рестрикции. Ранее нами было показано, что подобные химерные зонды могут быть получены [23]. В качестве флуоресцентного модуля был опробован наиболее изученный флуоресцентный белок eGFP (FPbase ID: R9NL8) [25], а место лигандного модуля занял α -CbTx (UniProt ID: P01391) [8].

В данной работе, сохраняя описанную молекулярную топологию, были получены химерные зонды на основе красного флуоресцентного белка mKate2 (FPbase ID: DBBO8) и одного из трех токсинов, действующих на нАХР: α -CbTx, α -BTX (UniProt ID: P60615) или NT-II (UniProt ID: P01427). Данные токсины относятся к семейству трехпетельных токсинов змей и характеризуются высокой активностью по отношению к различным изоформам нАХР. Если нейротоксины длинного

типа α -CbTx и α -BTX действуют на мышечные и нейрональные рецепторы $\alpha 7$, $\alpha 9$ и $\alpha 9/\alpha 10$ [26], то нейротоксин короткого типа NT-II характеризуется селективностью в отношении мышечной изоформы [27, 28].

Все три флуоресцентные химеры были получены путем экспрессии гибридных генов в *Escherichia coli*, выделены из лизата бактериальной культуры с помощью аффинной хроматографии и дополнительно очищены с использованием эксклюзационной хроматографии, как показано на примере mKate2-NT-II (рис. 1a). Спектры возбуждения и испускания флуоресценции этих гибридных белков оказались идентичными спектрам нативного белка mKate2 (максимумы возбуждения и испускания были при 588 нм и 633 нм соответственно; рис. 1b). Выход рекомбинантных белков составил ≈ 10 мг на 1 л бактериальной культуры, а чистота конечных продуктов во всех трех случаях была не менее 90–95% (рис. 1b). На рис. 1 представлены данные для mKate2-NT-II, для двух других конструктов были получены аналогичные результаты.

С точки зрения получения и очистки подобные гибридные белки имеют ряд преимуществ по сравнению с другими типами молекулярных зондов на основе полипептидных токсинов, например изотопно-меченными производными или лигандами, модифицированными классическими низкомолекулярными флуоресцентными метками. Во-первых, такие химеры могут быть с

легкостью получены в большинстве доступных систем гетерологической экспрессии. При этом не требуются дополнительные стадии химической модификации и исключается работа с радиоактивностью. Во-вторых, выход продуктов в таких системах, как правило, сравнительно высокий, что значительно снижает стоимость получаемых зондов. И наконец, возможность выбора из большого множества лигандных и флуоресцентных модулей позволяет получать химерные молекулы, селективные к различным мишениям и имеющие разнообразные спектральные свойства [13, 20, 23].

Конкурентный радиолигандный анализ.

Было оценено сродство полученных флуоресцентных зондов к нAХР электрического органа ската *Torpedo californica*, относящегося к мышечной изоформе холинорецептора. Измерения проводили посредством конкурентного анализа с $[^{125}\text{I}]$ -меченным α -BTX, используемым в качестве радиолиганда. При тестировании всех трех флуоресцентных химер в параллельных экспериментах также использовали нативные трехпептильные токсины, входящие в их состав. Кривые вытеснения показаны на рис. 2, соответствующие значения концентрации полу-максимального ингибиования (IC_{50}) приведены как для флуоресцентных зондов, так и для немеченых токсинов. Было обнаружено, что модификация токсинов флуоресцентным белком mKate2 приводит к снижению их активности. Установленные значения IC_{50} для mKate2- α -CbTx, mKate2- α -

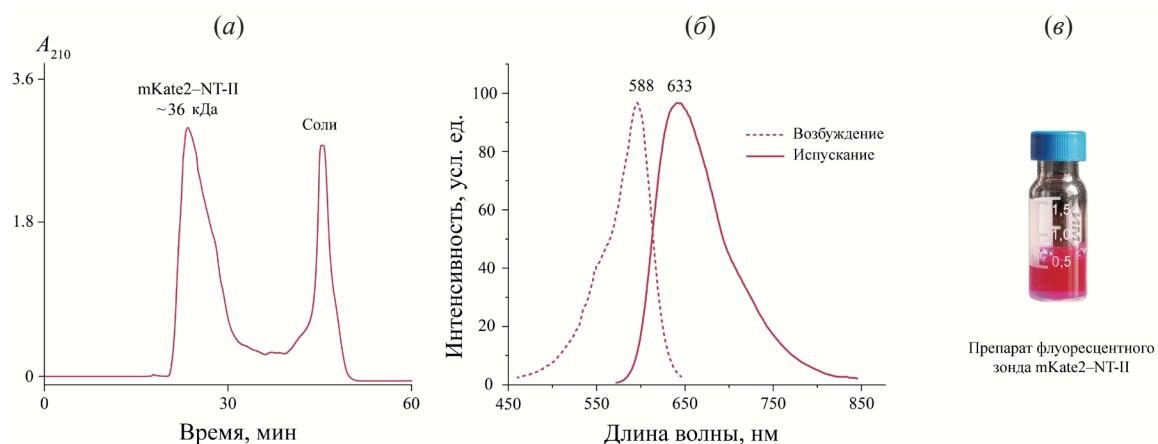


Рис. 1. Получение и характеристика флуоресцентного зонда mKate2-NT-II. (a) – Эксклюзационная хроматография mKate2-NT-II на колонке TSK 2000SW в 0.1-кратном натрий-фосфатном буфере (pH 7.4); (б) – спектры возбуждения (пунктирная линия) и испускания (сплошная линия) флуоресценции mKate2-NT-II; (в) – препарат очищенного флуоресцентного зонда mKate2-NT-II с концентрацией 50 мкМ в натрий-фосфатном буфере.

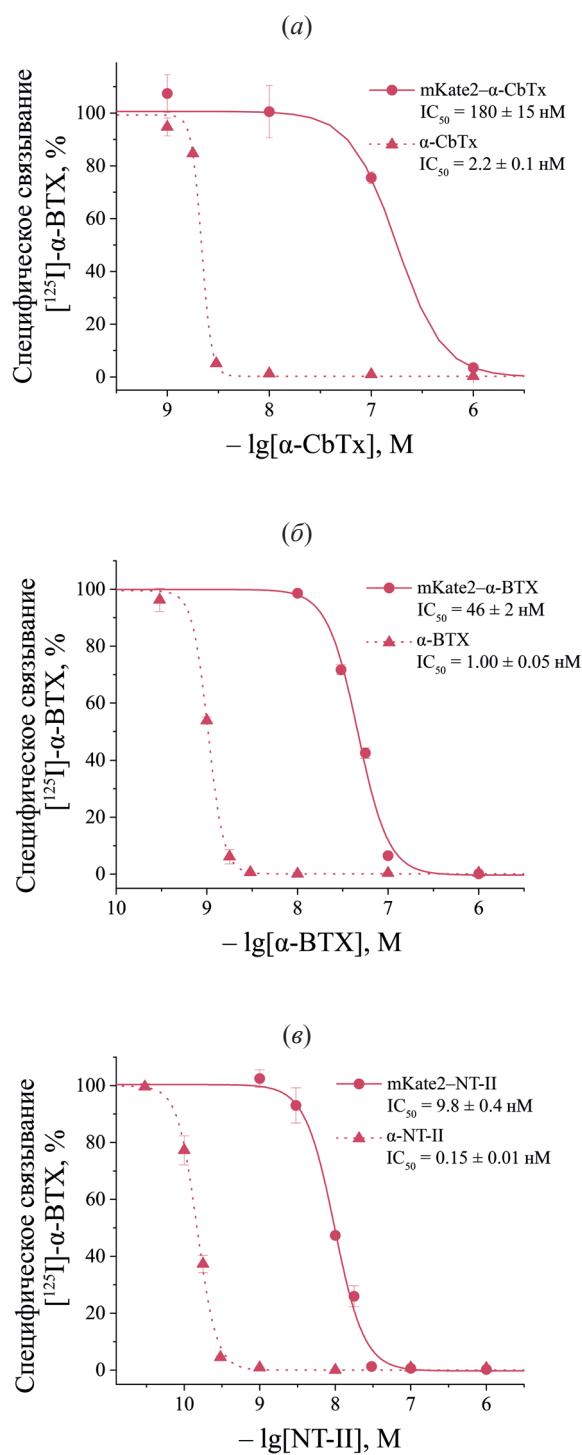


Рис. 2. Ингибирование связывания радиоактивного $\alpha\text{-BTX}$ с нАХР *T. californica* природными токсинами и их рекомбинантными химерами с флуоресцентным белком. (а) – $\alpha\text{-CbTx}$ и mKate2- $\alpha\text{-CbTx}$; (б) – $\alpha\text{-BTX}$ и mKate2- $\alpha\text{-BTX}$; (в) – NT-II и mKate2-NT-II. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm стандартную ошибку для трех измерений. Приведены расчетные значения IC_{50} для немеченых токсинов и их флуоресцентных аналогов.

BTX и mKate2-NT-II составили 180 ± 15 , 46 ± 2 и $9.8 \pm 0.4 \text{ nM}$ соответственно, в то время как нативные токсины, входящие в их состав, характеризуются более низкими значениями: 2.2 ± 0.1 , 1.00 ± 0.05 и $0.15 \pm 0.01 \text{ nM}$ для $\alpha\text{-CbTx}$, $\alpha\text{-BTX}$ и NT-II соответственно, которые находятся в диапазоне сродства нейротоксинов змей короткого и длинного типа к мышечным изоформам нАХР (10^{-11} – 10^{-9} M), описанном в литературе [29].

Падение аффинности было также отмечено для флуоресцентной химеры eGFP- $\alpha\text{-CbTx}$, описанной ранее [23]. Действительно, внедрение объемной флуоресцентной метки может привести к снижению активности лигандного модуля или/и изменению профиля селективности токсинов. Стоит отметить при этом, что структура ацетилхолинового рецептора *T. californica* в комплексе с $\alpha\text{-BTX}$, изученная методом криоэлектронной микроскопии [30], показывает, что ни *N*-, ни *C*-конец трехпетельного токсина не вовлечены в непосредственное взаимодействие с мишенью. Кроме того, снижение активности может быть связано с неправильной укладкой трехпетельного токсина в составе флуоресцентного зонда [23]. Несмотря на то, что сродство полученных флуоресцентных производных к нАХР снижено в 40–90 раз, их активность все же находится на достаточно высоком уровне для дальнейшего применения.

Визуализация нАХР на поверхности клеток. Для того чтобы проверить возможность использования флуоресцентных зондов для визуализации нАХР на клеточной мембране, два гибридных белка mKate2- $\alpha\text{-CbTx}$ и mKate2-NT-II были добавлены в среду к клеткам нейробластомы человека SH-SY5Y в концентрации 1 мкМ. В качестве отрицательного контроля служил флуоресцентный белок mKate2 без токсина. Известно, что $\alpha\text{-CbTx}$ – высокоаффинный конкурентный антагонист $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 9/\alpha 10$ и мышечных нАХР [28]. В то же время NT-II избирательно связывается с мышечными нАХР, игнорируя другие подтипы рецепторов [31].

Известно, что клетки SH-SY5Y экспрессируют нАХР изоформы $\alpha 7$ и полностью лишены мышечного подтипа [32]. Поэтому флуоресцентное окрашивание, представленное на рис. 3 a , наблюдалось только в случае mKate2- $\alpha\text{-CbTx}$. На рис. 3 b и 3 c показано оптическое изображение клеток, а также наложение на него флуоресцентного сиг-

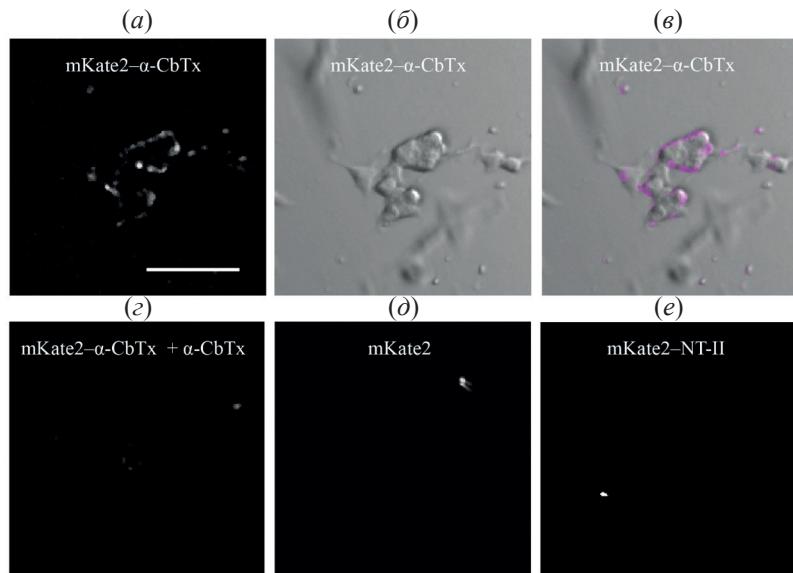


Рис. 3. Визуализация нAХР на поверхности клеток SH-SY5Y с использованием флуоресцентных зондов. (a) – Окрашивание клеток SH-SY5Y с помощью зонда mKate2- α -CbTx в концентрации 1 мкМ; (b) – оптический сигнал от окрашенных клеток SH-SY5Y; (c) – наложение оптического и флуоресцентного сигналов; (d) – вытеснение флуоресцентного зонда mKate2- α -CbTx немеченным α -CbTx в концентрации 10 мкМ; (d) – отрицательный контроль, полученный с применением флуоресцентного белка mKate2; (e) – mKate2-NT-II не окрашивает клетки SH-SY5Y, поскольку на их поверхности нет мышечной изоформы нAХР. Масштабный отрезок – 100 мкм.

нала. Для подтверждения специфичности мечения $\alpha 7$ нAХР с помощью mKate2- α -CbTx добавляли 10-кратный молярный избыток немеченого α -CbTx и наблюдали значительное снижение флуоресцентного сигнала (рис. 3c). Как и ожидалось, применение отдельного флуоресцентного белка mKate2 и химеры mKate2-NT-II не продемонстрировало специфического окрашивания поверхности клеток SH-SY5Y (рис. 3d, e).

Ранее для визуализации нAХР была разработана серия производных различных токсинов, модифицированных низкомолекулярными флуоресцентными метками. Так, например, α -бунгаротоксин, меченный тетраметилродамином, применяли для маркировки рецепторов $\alpha 7$ нAХР и визуализации нервно-мышечных соединений [33]. Аналогичным образом, флуоресцентно-меченные конотоксины [34] использовали для визуализации $\alpha 3\beta 2$ нAХР у крыс, а также для изучения распределения подтипа $\alpha 9\beta 10$ в клетках RAW264.7 [35]. Подобные флуоресцентные токсины, наряду с разработанными в данной работе молекулярными химерами, представляют собой мощные инструменты для исследования тканевой локализации и функциональных особенностей различных подтипов нAХР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение векторных конструкций, кодирующих флуоресцентные зонды. Подробно подход к созданию генетических конструкций, кодирующих химеры флуоресцентных белков и полипептидных токсинов, был описан в предыдущих работах [13, 20]. Общая схема получения и структурно-функциональные особенности гибридного гена представлены на рис. 4. Для получения экспрессионных векторов, кодирующих mKate2- α -CbTx, mKate2- α -BTX и mKate2-NT-II, за основу была взята плазмида pET-28a-eGFP- α -CbTx, полученная нами ранее [23]. На первом этапе производили замену участка ДНК, кодирующего eGFP, на ген, кодирующий mKate2. Этот ген, flankированный необходимыми сайтами рестрикций, получали путем ПЦР-амплификации соответствующего участка плазмиды pmKate2-N (Евроген, Россия) с использованием олигонуклеотидов mKate2-f1 и mKate2-r1. Рестрикцию данного фрагмента ДНК и его лигирование с плазмидной ДНК проводили по сайтам NdeI и BamHI. В результате был получен плазмидный вектор pET-28a-mKate2- α -CbTx. Последовательности ДНК, кодирующие α -BTX и NT-II, были получены также с помощью ПЦР и после-

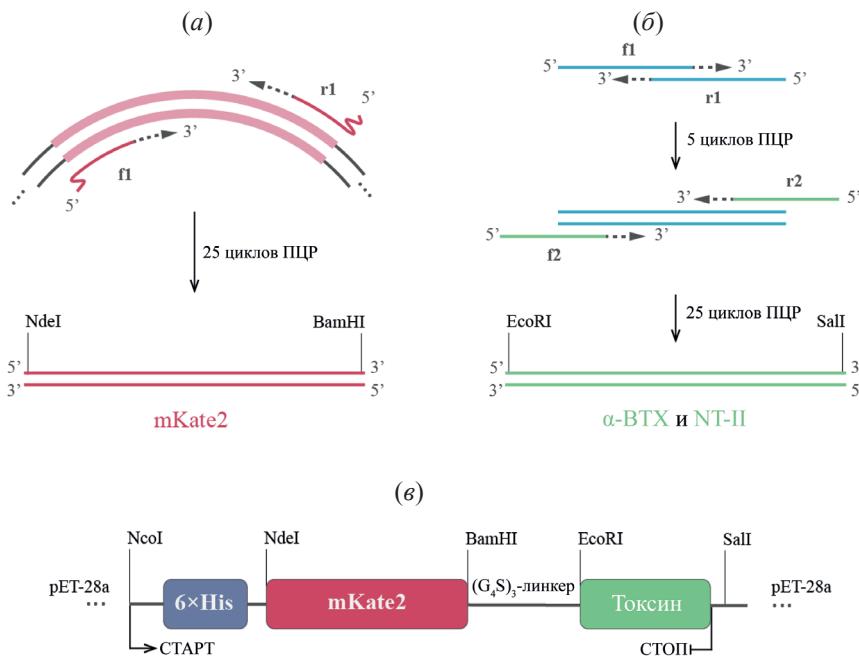


Рис. 4. Получение и строение гибридных генов, кодирующих флуоресцентные молекулярные зонды. (а) – Получение участка ДНК, кодирующего красный флуоресцентный белок mKate2. В качестве матрицы выступала плазмида pmKate2-N, содержащая этот ген, амплификацию проводили с использованием двух олигонуклеотидов; (б) – получение синтетических генов, кодирующих α -BTX и NT-II, из нескольких олигонуклеотидов с помощью ПЦР; (в) – структура химерного гена в составе вектора pET-28a. Указаны фрагменты, кодирующие гексагистидиновый участок, флуоресцентный белок mKate2, гибкий линкер и токсин. Отмечены стартовый и стоп-кодон, а также сайты рестрикции.

дующего клонирования по сайтам рестрикции EcoRI и SalI вместо α -CbTx. В результате получили векторы pET-28a-mKate2- α -BTX и pET-28a-mKate2-NT-II.

Олигонуклеотиды mKate2-f1 и mKate2-r2 использовали для амплификации гена mKate2 со стоп-кодоном. Этот ген подвергали рестрикции и лигированию непосредственно в плазмиду pET-28a(+) (Novagen, США) для получения отдельного белка mKate2 без токсина. Последовательности всех олигонуклеотидов, использованных в данной работе, приведены в табл. 1, а схема получения флуоресцентных зондов представлена на рис. 4. Корректность полученных последовательностей ДНК в составе вектора была подтверждена секвенированием по Сэнгеру.

Получение и очистка флуоресцентных химер. Все этапы получения и очистки гибридных белков были описаны ранее [20, 23]. Коротко, клетки *E. coli* BL21(DE3), трансформированные соответствующими векторами (pET-28a-mKate2- α -CbTx, pET-28a-mKate2- α -BTX или pET-28a-mKate2-NT-II), культивировали при 37°C в среде LB в присутствии канамицина в концентрации 50 мкг/мл до достижения культурой оптической

плотности 0.5 при длине волны 600 нм. Экспрессию целевых продуктов инициировали добавлением 0.5 мМ изопропил β -D-1-тиогалактоциранозида, после чего культуру дополнительном инкубировали при 25°C в течение 20 ч. Клетки осаждали центрифугированием, разрушали ультразвуком, химерные белки выделяли из растворимой фракции с помощью аффинной хроматографии на Co^{2+} -содержащем сорбенте (Thermo Fisher Scientific, США) согласно протоколу производителя. Дальнейшую очистку проводили методом эксклюзионной хроматографии на колонке TSK 2000SW (600 × 7.5 мм, размер пор 12.5 нм, размер частиц 10 мкм; Toyo Soda Manufacturing, Япония) в 0.1-кратном натрий-фосфатном буферном растворе, pH 7.4.

Определение концентрации белков. Концентрации химерных белков определяли с помощью УФ-спектрофотометрии на приборе UV-1800 (Shimadzu, Япония). Поскольку все белки содержали mKate2 в своем составе, поглощение измеряли при 588 нм, а концентрацию рассчитывали с использованием молярного коэффициента экстинкции $\epsilon_{588} = 62\,500\, \text{M}^{-1}\, \text{cm}^{-1}$.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, используемые для синтеза и амплификации генов флуоресцентного белка mKate2 и токсинов α -BTX и NT-II

Праймер		Последовательность (5'→3')	Флуоресцентный белок
mKate2-f1		CACACACATATGATGGTGAAGCGAGCTGAT	
mKate2-r1		AAAAAAAGGATCCTCTGTGCCCCAGTTGC	
mKate2-r2		AAAAAAAGGATCCCTATCTGTGCCCCAGTTGC	
BTX-f1		GACCTCTCGATTTCGGGGTGAACCTGCCCGCCGGAGAAATCTGTGCTATCGTAAGAGATGGTGGTGCATGCGGTCTGCTCCCGTGGCAAAGTGGTGG	Токсины
BTX-r1		GATGGGGATTGCAATTATCGGTGGAGCAGCAGGTCACTCTTCATACGGTTCTGGACGGGAGGTGCGCCAGGTCACCTTGGCCACGGATGATGAC	
BTX-f2		ATATGAATTCAATTGTTGCCATACCCACCGCGACCTCTCCGATTTC	
BTX-r2		ATATGTCGACTTAGCCCCGACGCTGTTGGATGGGATTGGCAT	
NT-f1		AGCAGTCCCTCCAGGCCGACCAAGAACCTGCTCCGGGAAACCAATTGCTATAAGAAAATGGGGTCCGATCATCGTGGCAC	
NT-r1		ATCGGTACGGCAGCAATTCAAGATTCAACGCCGGTTTCACITTCGGCAGCCACGTTCAAATAATGGTGCACGGATGATGAC	
NT-f2		ATATGAATTCTGGAAATGCCATAATCAGCAGTCCTCCAGC	
NT-r2		TATATGTCGACTTAATTATTGCAACGATCGTACGGCAGCA	

Конкурентный радиолигандный анализ. Для экспериментов по конкурентному связыванию супензии мембран электрического органа ската *T. californica* (в конечной концентрации 1.2 нМ α -BTX-связывающих участков) в буфере 20 мМ Tris-HCl, pH 8.0, содержащем бычий сывороточный альбумин в концентрации 1 мг/мл, инкубировали 3 ч с различными концентрациями флуоресцентных зондов и немеченых токсинов. Затем добавляли радиоактивный [¹²⁵I]-меченный α -BTX (500 Ки/ммоль) до получения конечной концентрации 0.5 нМ и инкубировали еще 5 мин. Определение неспецифического связывания, фильтрацию образцов и подсчет связавшейся радиоактивной фракции проводили, как описано ранее [36].

Флуоресцентная микроскопия. Клетки нейробластомы человека SH-SY5Y (ATCC CRL-2266) выращивали в 96-луночных планшетах в среде DMEM (ПанЭко, Россия), дополненной 5%-ной фетальной бычьей сывороткой, при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Ростовую среду заменяли внеклеточным буфером (140 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 2.8 мМ KCl, 4 мМ MgCl₂, 20 мМ HEPES и 10 мМ глюкозы, pH 7.4), затем в каждую лунку добавляли 1 мКМ отдельного флуоресцентного белка mKate2 или соответствующего флуоресцентного зонда и инкубировали в течение 1 ч. Несвязанный флуоресцентный белок удаляли, а клетки визуализировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа Olympus IX71 с соответствующей комбинацией фильтров и охлаждаемой CCD-камерой CAM-XM10 (Olympus, Япония). Для проведения экспериментов по вытеснению клетки сначала инкубировали с 10 мКМ α -CbTx до добавления mKate2- α -CbTx. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения CellA Imaging Software (Olympus Soft Imaging Solutions, Германия). Вычитание фона, корректировку и анализ данных проводили с помощью открытого программного обеспечения ImageJ (NIH, США). Для всех изображений, представленных в данной статье, выполняли один и тот же набор корректировок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе были получены три флуоресцентных зонда схожего строения, для которых в качестве флуоресцентной метки был выбран красный флуоресцентный белок mKate2. За

взаимодействие с нАХР в составе зондов отвечает один из трех классических трехпетельных токсинов, а именно: два нейротоксина длинного типа (α -CbTx, α -BTx), которые содержат дополнительный пятый дисульфидный мостик в центральной петле, а также удлиненную C-концевую область, и один нейротоксин короткого типа (NT-II). Полученные гибридные белки были очищены, охарактеризованы и успешно апробированы для визуализации ацетилхолиновых рецепторов на поверхности клеток линии SH-SY5Y.

Полученные флуоресцентные зонды могут использоваться в качестве молекулярных инструментов для флуоресцентной микроскопии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность проф. Ф. Хухо (Свободный университет Берлина, Германия) за предоставление мембран *T. californica*.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-74-10028).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – АИК, ААВ; экспериментальные работы – АИК, ИСЧ, ДСК, ИЕК; написание статьи – АИК, ААВ; анализ данных – АИК, ИСЧ, ДСК, ИЕК; администрирование проекта – АИК, ААВ, ВИЦ.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Corringer P.J., Novère N.L., Changeux J.P. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2000. V. 40. P. 431–458. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.431>
2. Karlin A. // Nat. Rev. Neurosci. 2002. V. 3. P. 102–114. <https://doi.org/10.1038/nrn731>
3. Cecchini M., Corringer P.-J., Changeux J.-P. // Annu. Rev. Biochem. 2024. V. 93. P. 339–366. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-030122-033116>
4. Lukas R.J., Changeux J.P., Le Novère N., Albuquerque E.X., Balfour D.J., Berg D.K., Bertrand D., Chiappinelli V.A., Clarke P.B., Collins A.C., Dani J.A., Grady S.R., Kellar K.J., Lindstrom J.M., Marks M.J., Quik M., Taylor P.W., Wonnacott S. // Pharmacol. Rev. 1999. V. 51. P. 397–401. [https://doi.org/10.1016/S0031-6997\(24\)01406-6](https://doi.org/10.1016/S0031-6997(24)01406-6)
5. Hone A.J., McIntosh J.M. // Pharmacol. Res. 2023. V. 190. P. 106715. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106715>
6. Dutertre S., Lewis R.J. // Biochem. Pharmacol. 2006. V. 72. P. 661–670. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2006.03.027>
7. Chang C., Lee C. // Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1963. V. 144. P. 241–257.
8. Karlsson E., Eaker D., Ponterius G. // Biochim. Biophys. Acta. 1972. V. 257. P. 235–248. [https://doi.org/10.1016/0005-2795\(72\)90275-9](https://doi.org/10.1016/0005-2795(72)90275-9)
9. Surin A.M., Pluzhnikov K.A., Utkin Y.N., Karlsson E., Tsetlin V.I. // Bioorg. Khim. 1983. V. 9. P. 756–767.
10. Utkin Y.N. // Toxicol. 2013. V. 62. P. 50–55. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v10.i1.17>
11. Kini R.M., Doley R. // Toxicol. 2010. V. 56. P. 855–867. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.07.010>
12. Kini R.M., Koh C.Y. // Biochem. Pharmacol. 2020. V. 181. P. 114105. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114105>
13. Kuzmenkov A.I., Vassilevski A.A. // Neurosci. Lett. 2018. V. 679. P. 15–23. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2017.10.050>
14. O'Brien R.D., Eldefrawi M.E., Eldefrawi A.T. // Annu. Rev. Pharmacol. 1972. V. 12. P. 19–34. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.12.040172.000315>
15. Крюкова Е.В., Иванов Д.А., Копылова Н.В., Старков В.Г., Андреева Т.В., Иванов И.А., Цеплин В.И., Уткин Ю.Н. // Биоорг. химия. 2023. Т. 49. С. 296–305. <https://doi.org/10.31857/S0132342323030156>
16. Sahoo H. // RSC Adv. 2012. V. 2. P. 7017. <https://doi.org/10.1039/C2RA20389H>
17. Axelrod D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. P. 4823–4827. <https://doi.org/10.1073/pnas.77.8.4823>
18. Anderson M.J., Cohen M.W. // J. Physiol. 1974. V. 237. P. 385–400. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1974.sp010487>

19. *Tsetlin V.I., Karlsson E., Arseniev A.S., Utkin Y.N., Surin A.M., Pashkov V.S., Pluzhnikov K.A., Ivanov V.T., Bystrov V.F., Ovchinnikov Y.A.* // *FEBS Lett.* 1979. V. 106. P. 47–52.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(79\)80692-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80692-4)
20. *Kuzmenkov A.I., Nekrasova O.V., Kudryashova K.S., Peigneur S., Tytgat J., Stepanov A.V., Kirpichnikov M.P., Grishin E.V., Feofanov A.V., Vassilevski A.A.* // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 33314.
<https://doi.org/10.1038/srep33314>
21. *Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A.* // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 1103–1163.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
22. *Mishin A.S., Belousov V.V., Solntsev K.M., Lukyanov K.A.* // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 27. P. 1–9.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.05.002>
23. *Kasheverov I.E., Kuzmenkov A.I., Kudryavtsev D.S., Chudetskiy I.S., Shelukhina I.V., Barykin E.P., Ivanov I.A., Siniavin A.E., Ziganshin R.H., Baranov M.S., Tsetlin V.I., Vassilevski A.A., Utkin Y.N.* // *Front. Mol. Biosci.* 2021. V. 8. P. 753283.
<https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.753283>
24. *Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Sоловьева Е.А., Чепурных Т.В., Шчеглов А.С., Верхуша В.В., Плетнев В.З., Hazelwood K.L., Roche P.M., Lukyanov S., Zaraisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M.* // *Biochem. J.* 2009. V. 418. P. 567.
<https://doi.org/10.1042/BJ20081949>
25. *Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S.* // *Gene.* 1996. V. 173. P. 33–38.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00685-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00685-0)
26. *Chandna R., Tae H., Seymour V.A., Chathrath S., Adams D.J., Kini R.M.* // *FASEB Bioadv.* 2019. V. 1. P. 115–131.
<https://doi.org/10.1096/fba.1027>
27. *Utkin Y.N., Kukhtina V.V., Kryukova E.V., Chiodini F., Bertrand D., Methfessel C., Tsetlin V.I.* // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 15810–15815.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M100788200>
28. *Tsetlin V.I., Kasheverov I.E., Utkin Y.N.* // *J. Neurochem.* 2021. V. 158. P. 1223–1235.
<https://doi.org/10.1111/jnc.15123>
29. *Nirthanan S., Gwee M.C.E.* // *J. Pharmacol. Sci.* 2004. V. 94. P. 1–17.
<https://doi.org/10.1254/jphs.94.1>
30. *Rahman M., Teng J., Worrell B.T., Noviello C.M., Lee M., Karlin A., Stowell M.H., Hibbs R.E.* // *Neuron.* 2020. V. 106. P. 952–962.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2020.03.012>
31. *Shelukhina I.V., Kryukova E.V., Lips K.S., Tsetlin V.I., Kummer W.* // *J. Neurochem.* 2009. V. 109. P. 1087–1095.
<https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06033.x>
32. *Lukas R.J., Norman S.A., Lucero L.* // *Mol. Cell. Neurosci.* 1993. V. 4. P. 1–12.
<https://doi.org/10.1006/mcne.1993.1001>
33. *Ravdin P., Axelrod D.* // *Anal. Biochem.* 1977. V. 80. P. 585–592.
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(77\)90682-0](https://doi.org/10.1016/0003-2697(77)90682-0)
34. *Yang Y., Tan Y., Zhangsun D., Zhu X., Luo S.* // *ACS Chem. Neurosci.* 2021. V. 12. P. 3662–3671.
<https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00392>
35. *Muttenthaler M., Nevin S.T., Inserra M., Lewis R.J., Adams D.J., Alewood P.* // *Aust. J. Chem.* 2020. V. 73. P. 327–333.
<https://doi.org/10.1071/ch19456>
36. *Lebedev D.S., Kryukova E.V., Ivanov I.A., Egorova N.S., Timofeev N.D., Spirova E.N., Tufanova E.Y., Siniavin A.E., Kudryavtsev D.S., Kasheverov I.E., Zouridakis M., Katsarava R., Zavradashvili N., Iagorshvili I., Tzartos S.J., Tsetlin V.I.* // *Mol. Pharmacol.* 2019. V. 96. P. 664–673.
<https://doi.org/10.1124/mol.119.117713>

Molecular Probes for Visualization of Nicotinic Acetylcholine Receptors Based on Snake Three-Finger Toxins and a Red Fluorescent Protein

**A. I. Kuzmenkov*, #, I. S. Chudetsky*, D. S. Kudryavtsev*, I. E. Kasheverov*,
V. I. Tsetlin*, and A. A. Vassilevski***

#Phone: +7 (495) 336-65-40; e-mail: aleksey.kuzmenkov@gmail.com

** Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

The visualization of macromolecular complexes is an important task in modern bioorganic chemistry, which can be addressed using various methodological approaches. The most widely used techniques involve radioactive- and fluorescent-labeled ligands. In this study, molecular probes were developed in the form of hybrid constructs combining one of three snake toxins (α -bungarotoxin, α -cobratoxin, or neurotoxin NT-II) with the red fluorescent protein mKate2. These chimeric proteins were produced in a bacterial expression system and purified via gel filtration. Using competitive radioligand binding assay with radiolabeled α -bungarotoxin, it was demonstrated that the obtained probes exhibit high affinity for the nicotinic acetylcholine receptor of the electric organ from *Torpedo californica*, with half-maximal inhibitory concentration values in the nanomolar range. The fluorescent probes were successfully employed for the visualization of acetylcholine receptors on the surface of SH-SY5Y cells.

Keywords: *ion channel, acetylcholine receptor, cholinoreceptor, ligand, neurotoxin, radioligand assay, fluorescence microscopy*