

Технология конкатемеризации калиевых каналов ERG для получения искусственных гетеромеров

Научный руководитель – Юнусова Валентина Алексеевна

Монастырская Мария Олеговна

Студент (бакалавр)

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

E-mail: marinemonada@gmail.com

Введение.

ERG – подсемейство потенциал-зависимых калиевых каналов, играющих важную роль в формировании потенциала действия в кардиомиоцитах и нейронах, а нарушения в их работе могут приводить к аритмии, эпилепсии и шизофрении. Функциональный канал построен из четырех субъединиц; у человека известны три гена (ERG1, ERG2 и ERG3), кодирующие эти белки. Если в сердце ERG представлен гомомерами, то в нервной системе обнаружены и гетеромерные ансамбли. Для изучения гетеромеров этих ионных каналов может быть использована техника конкатемеризация генов отдельных изоформ. Данная работа сосредоточена на создании конкатемеров ERG1-ERG2 и оптимизации протокола их клонирования.

Методы.

Моделирование пространственной организации гетеротетрамерных каналов, а также анализ их нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью биоинформатических инструментов. Для получения интересующих конструкций были использованы классические методики генной инженерии: ПЦР, реакции рестрикции и лигирования, трансформация бактериальной культуры и др. Результаты молекулярного клонирования валидировали секвенированием по Сэнгеру, а корректность полной нуклеотидной последовательности конкатемеров подтверждали с помощью технологии Nanopore.

Результаты.

Модели пространственных структур гетеротетрамерных каналов, полученные с применением AlphaFold 3, продемонстрировали схожую организацию с гомотетрамерным каналом, разрешенным методом криоэлектронной микроскопии. Биоинформатический анализ генов ERG1 и ERG2 показал высокий ГЦ-состав, в отдельных участках приближающийся к 90%. По этой причине для ERG1 не был применим стандартный протокол амплификации, а разработан альтернативный подход с использованием повышенной температуры отжига праймеров, а также полимеразы Pfu в буфере с 5% DMSO. Разработанная схема клонирования в вектор pVax включала последовательную инсерцию четырех генов, разделенных линкерами. Модульная структура конкатемеров подразумевала возможность быстрого изменения той или иной субъединицы. Таким образом, была получена конструкция с чередующимся положением субъединиц ERG1 и ERG2, а корректность конкатемеризации подтверждена результатами секвенирования.

Выводы.

Молекулярное моделирование показало возможность использования конкатемеризации для создания гетеромерных каналов ERG1-ERG2. Для амплификации генов ERG был разработан альтернативный протокол, учитывающий их богатый ГЦ-состав. На базе плазмиды pVax были получены конкатемерные конструкции модульного строения с чередующимся расположением ERG1 и ERG2.

Работа поддержана Российским научным фондом (грант № 22-74-10028).