

## Исследование активности семиспиральных рецепторов в клетках гранулы мышца с применением генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров

Научный руководитель – Никишин Денис Александрович

Почетная П.А.<sup>1</sup>, Алешина Н.М.<sup>2</sup>

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра эмбриологии, Москва, Россия, *E-mail: pochjotnaya@gmail.com*; 2 - Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Лаборатория нервных и нейроэндокринных регуляций, Москва, Россия, *E-mail: ninabugaychuk@mail.ru*

Семиспиральные рецепторы (GPCR) - это обширное семейство разнообразных рецепторов, вовлеченных в большое количество регуляторных путей в разных типах клеток. В связи с этим, определение функциональной активности GPCR является ключевой задачей в исследовании различных сигнальных путей регуляции клеточной физиологии, в том числе процессов развития. Целью работы было прижизненное исследование активности семиспиральных рецепторов в клетках гранулы мышца с применением генетически кодируемых флуоресцентных биосенсоров.

Бета-аррестин является основным регулятором функциональной активности GPCR. После связывания с лигандом и активации рецептор фосфорилируется киназой GRK. На следующем этапе бета-аррестин присоединяется к рецептору, что обеспечивает его десенситизацию. В дальнейшем, бета-аррестин также играет роль адаптера к клатрину, что приводит к интернализации GPCR. Нами был создан флуоресцентный биосенсор активности семиспиральных рецепторов путем клонирования гена  $\beta$ -аррестина-2 крысы в одну рамку считывания с дальним красным флуоресцентным белком mKate2. Полученный гибридный белок при активации GPCR в клетке меняет локализацию с цитоплазматической на примембранную.

Для исследования GPCR, сопряженных с Gq-белком, к которым относится экспрессирующийся в клетках гранулы рецептор серотонина HTR2A, использовали биосенсором RH-YFP. Данный белок заякорен на мембране, а при активации рецепторов, фосфолипаза PLC гидролизует место прикрепления биосенсора, поэтому молекула желтого флуоресцентного белка YFP уходит в толщу клетки. Таким образом, мы наблюдаем смещение сигнала из подмембранного пространства в центр клетки.

Первичную культуру клеток гранулы мышца трансфицировали созданными генетическими конструктами и провели анализ активности GPCR методом лазерной сканирующей конфокальной микроскопии с применением фармакологических лигандов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта РФФИ № 20-04-00303 и гранта Президента РФ МК-931.2020.4.

### Источники и литература

- 1) C. Walther, C. Ferguson, S.G. Stephen, "Arrestins: Role in the desensitization, sequestration, and vesicular trafficking of g protein-coupled receptors", *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2013
- 2) J. van der Wal, Ron Habets, P. Varnai, T. Balla, K. Jalink, "Monitoring Agonist-induced Phospholipase C Activation in Live Cells by Fluorescence Resonance Energy Transfer", *The Journal of Biological Chemistry*, 2000