

Разработка генетически кодируемого флуоресцентного наносенсора температуры на основе фотоактивного Оранжевого Каротиноидного Белка

Научный руководитель – Максимов Евгений Георгиевич

Слущкая Екатерина Александровна

Аспирант

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

E-mail: slutskay@yandex.ru

Внутри живой клетки происходит множество биохимических реакций, скорость каждой из которых определяет фундаментальная физическая величина - температура. Создание внутриклеточного наносенсора температуры является актуальной задачей из-за возможных перспектив использования такой системы для исследования различных метаболических процессов и нарушений, ведущих к развитию патологических состояний. Для этого необходима разработка методов визуализации, которые позволят легко интерпретировать данные, и не будут требовать введения синтетических красителей в клетку. Таким решением может стать генетически кодируемый флуоресцентный биосенсор, разработанный по принципу объединения функциональных (чувствительных к температуре) и индикаторных (флуоресцентных) модулей в одном белке. Ранее нами было показано, что небольшой водорастворимый оранжевый каротиноидный белок (Orange Carotenoid Protein, OCP) массой 35 кДа может быть использован для детектирования локальной температуры и ее изменений с высокой точностью. Для использования OCP в качестве наносенсора температуры, необходимо детектировать фотоциклические изменения спектра поглощения каротиноида в составе молекулы OCP, который меняется в ответ на поглощение кванта света. Мы конъюгировали зеленый и красный флуоресцентные белки (TagGFP и TagRFP) со структурой OCP, создав фотоактивные химеры, в которых квантовый выход флуоресцентных белков зависит от состояния OCP за счет безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения. Обе системы (OCP-TagGFP и TagRFP-OCP) показали себя потенциально пригодными для измерения температуры с высокой точностью по временной зависимости интенсивности флуоресценции после фотоактивации компонента OCP. Для оптимизации и апробации данного метода на клеточных моделях необходимо решить несколько задач, а именно: 1. оптимизировать структуру химерной конструкции для достижения наилучшего контраста между состояниями фотоцикла OCP, 2. наладить экспрессию генетически кодируемого сенсора в клетках, 3. отработать доставку кето-каротиноида в клетки. В ходе выполнения этих задач были получены эукариотические линии клеток НЕК293Т, экспрессирующие химерные белки RFP-OCP и OCP-GFP. Далее планируется получение холоформы OCP в клетках за счет разработанного нами метода доставки каротиноидов в клетки. В случае получения фотоактивных химерных конструкций на основе OCP в НЕК293Т, после введения белковых последовательностей для селективной доставки в конкретные компартменты клетки, мы сможем оценить локальную температуру и её изменения по флуоресценции химерной конструкции.