Секция «Биохимия»

Генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры для регистрации ацил-KoA in vivo

Научный руководитель – Марквичева Ксения Николаевна

Рапота Диана Денисовна

Студент (бакалавр)

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

E-mail: dianarapota7@gmail.com

Изучение динамики концентрации основных клеточных метаболитов позволяет судить о состоянии живой системы. Поэтому разработка чувствительных инструментов для их детекции является важной задачей, решение которой расширит представления о процессах, протекающих в живых организмах при физиологических и патологических состояниях. Длинноцепочечный тиоэфиры жирных кислот (ацил-KoA) - ключевые интермедиаты метаболизма липидов. Кроме этого, ацил-KoA выполняют роль сигнальных молекул. Они участвуют в регуляции экспрессии генов, везикулярного транспорта, работы многих ферментов и ионных каналов [1]. Изучение сигнальных функций жирных кислот и их производных в настоящее время затруднено вследствие ограниченного набора методов их визуализации in vivo. Одной из успешных на сегодняшний день технологий прижизненного мониторинга клеточных процессов являются генетически кодируемые флуоресцентные биосенсоры [3]. Они основаны на флуоресцентных белках и могут экспрессироваться и работать внутри клеток. Поэтому у нас проявилась идея создания генетически кодируемого флуоресцентного биосенсора для детекции ацил-KoA. Данная технология позволит не только измерять динамику концентрации ацил-KoA in vivo, но также изучать локализацию процессов, в которые они вовлечены. Для дизайна сенсора мы использовали cpYFP (circularly permuted yellow fluorescent protein) в качестве флуоресцентного домена [2]; и транскрипционный фактор бактерии *V. cholera* FadR в качестве лиганд-связывающего домена. FadR - природный сенсор длинноцепочечных ацил-KoA, который регулирует метаболизм жирных кислот. В структуру FadR был интегрирован cpYFP таким образом, что при связывании своего лиганда конформационные перестройки FadR изменяют спектральные свойства флуоресцентного белка. Изменение флуоресценции cpYFP в ответ на разные концентрации ацил-KoA в системе можно регистрировать при помощи оптических приборов. При оценке работы сенсора мы применяли флуориметрию. Нами было получено и проанализировано несколько версий сенсора на длинноцепочечные ацил-CoA в виде изолированных белков. Эксперименты in vitro показали, что они специфично реагируют на добавление лиганда. Однако мы также установили, что ацил-KoA неспецифически связывается с флуоресцентным доменом сенсора. Поэтому в качестве одного из путей усовершенствования сенсора мы планируем заменить флуоресцентный белок cpYFP на нечувствительный к ацил-KoA. В дальнейшем мы также хотим применить наш сенсор в культурах клеток для визуализации метаболизма жирных кислот.

Источники и литература

1) Neess D. et al. Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling: Role of acyl-CoA binding proteins // Progress in Lipid Research. 2015. Vol. 59. P. 1–25.

2) Kostyuk A.I. et al. Circularly Permuted Fluorescent Protein-Based Indicators: History, Principles, and Classification // IJMS. 2019. Vol. 20, № 17. P. 4200.

3) Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging // Trends in Biotechnology. 2005. Vol. 23, № 12. P. 605–613.