

Разработка оптогенетических систем на основе канального родопсина для контроля мембранного потенциала митохондрий и закисления лизосом

Научный руководитель – Ильинский Николай Сергеевич

Шестопёрова Елизавета Игоревна

Студент (магистр)

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: vish.max@yandex.ru

Доступные инструменты для контроля градиента концентраций протонов на внутренней мембране митохондрий ограничены ингибиторами и активаторами дыхательной цепи или АТФ-синтазы, а также разобщителями, проявляющими побочные эффекты, и в которых отсутствует клеточная и пространственная специфичность. За последние годы были опубликованы несколько работ, в которых удалось создать оптогенетический подход к контролю митохондриального потенциала, избирательно встроив светочувствительные белковые ионные каналы родопсина в мембраны митохондрий [1-2] и лизосом [3] и с их помощью воздействовать на трансмембранный потенциал или кислотность этих органелл соответственно.

В представленной работе были оптимизированы условия для лучшей экспрессии митохондриальных и лизосомально-направленных родопсинов в культурах клеток HeLa, HEK293T и MRC5. Были протестированы такие методы трансфекции, как липидная трансфекция, кальциевая трансфекция и электропорация. При оптимизации липидной трансфекции проверялись разные реактивы для трансфекции (X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent, Lipofectamin 2000, 3000, LTX), а также варьировались количества транс-ретинала, необходимого для экспрессии правильно свёрнутых родопсинов, и ДНК.

С помощью конструкции *lyso-pHoenix* был проведен эксперимент по оптогенетическому закислению лизосом в трансфицированных клетках, в которых естественное закисление лизосом было подавлено фармакологически. Клетки освещались лампой накаливания через оптический фильтр, пропускающий свет в диапазоне 576/24 нм, либо лазером длиной волны 561 нм. В ходе данного эксперимента с клетками HeLa и HEK293T удалось добиться лизосомальной экспрессии белка *lyso-pHoenix* и понизить значение pH лизосом при освещении, как было ранее показано в статье Rost et al. [3]. Такой же эксперимент впервые удалось провести на линии клеток фибробластов MRC5. Описанный подход может быть применен для замедления старения путем инициации аутофагии, что по результату действия схоже с работой молекулы рапамицина, блокирующего серин-треониновую киназу mTOR, которая подавляет аутофагию.

Источники и литература

- 1) Tkatch T., Greotti E., Baranauskas G., Pendin D., Roy S., Nita L.I., Wettmarshausen J., Prigge M., et al. Optogenetic control of mitochondrial metabolism and Ca²⁺ signaling by mitochondria-targeted opsins // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2017. – 167-176.
- 2) Ernst P., Xu N., Qu J., Chen H., Goldberg M.S., Darley-Usmar V., Zhang J.J., O'Rourke B., Liu X., Zhou L. Precisely Control Mitochondria with Light to Manipulate Cell Fate Decision // Biophys. J. – 2019. – Т. 117 – № 4 – 631–645.
- 3) Rost B.R., Schneider F., Grauel M.K., Wozny C., Bentz C.G., Blessing A., Rosenmund T., Jentsch T.J., Schmitz D., Hegemann P., Rosenmund C. Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes // Nat. Neurosci. – 2015. – Т. 18 – № 12 – 1845–1852.