

Исследование эффективности работы оптогенетического инструмента lyso-Rhodopsin

Научный руководитель – Ильинский Николай Сергеевич

Алехин Вадим Александрович

Аспирант

Московский физико-технический институт, Москва, Россия

E-mail: vadim.aleh@rambler.ru

В данной работе проводится оценка эффективности воздействия lyso-Rhodopsin, оптогенетического инструмента для защелачивания лизосом, на лизосомный и цитозольный рН. Управление рН лизосом считается перспективным способом поддержания гомеостаза клетки [1].

lyso-Rhodopsin представляет собой химерный белок, подобный оптогенетическому инструменту lyso-pHoenix[2], в котором прямая протонная помпа Arch3 заменена на обратную - XenoRhodopsin, при воздействии света выкачивающую ионы водорода из лизосом. XenoRhodopsin считается перспективным белком для использования в оптогенетике [3].

В настоящей работе проводилось сравнение эффектов химерных белков lyso-Rhodopsin с белком дикого типа и с точечной мутацией по 220-ому положению (D220N), важному для функционирования родопсина (соответствующая аминокислота является промежуточным акцептором протонов).

Изменения рН люмена лизосом фиксировались за счёт рН-чувствительного флуоресцентного белка pHluorin, входящего в состав lyso-Rhodopsin в качестве домена. Наблюдения проводились на оборудовании для конфокальной микроскопии от компании ZEISS.

В результате работы было выяснено, что lyso-Rhodopsin как с протонной помпой дикого типа, так и с мутантной при воздействии света защелачивает люмен лизосом (как видно по выбранному флуоресцентному методу детекции рН). Однако, отличается процесс восстановления лизосомального рН после защелачивания: в случае белка дикого типа выделяется быстрая стадия обратного закисления, которая сменяется медленной; в случае мутанта быстрая стадия отсутствует, и закисление происходит постепенно.

В итоге, настоящая работа подтверждает эффективность lyso-Rhodopsin как оптогенетического инструмента, повышающего рН лизосом, а также демонстрирует разницу в характере работы белка дикого типа и мутантного. В дальнейшем будет проведено сравнение эффективности работы данных средств (по уровню изменения рН лизосом и цитозоля) в клетках в разном состоянии (при разных уровнях АТФ и т. п.).

Автор выражает благодарность поддержке государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-03-2023-106, проект FSMG-2020-0003) в части работ по флуоресцентной микроскопии. Работы по экспрессии родопсинов в клетках млекопитающих выполнены за счёт гранта РНФ № 21-64-00018.

Источники и литература

- 1) 1. López-Otín C. et al. Hallmarks of aging: An expanding universe //Cell. – 2023.
- 2) 2. Rost B. R. et al. Optogenetic acidification of synaptic vesicles and lysosomes //Nature neuroscience. – 2015. – Т. 18. – №. 12. – С. 1845-1852.

- 3) 3. Ugalde J. A. et al. Xenorhodopsins, an enigmatic new class of microbial rhodopsins horizontally transferred between archaea and bacteria //Biology direct. – 2011. – Т. 6. – №. 1. – С. 1-8.