

**Оптимизированные для проточной цитометрии генетически кодируемые сенсоры внутриклеточного лактата и пирувата в клетках-продуцентах рекомбинантных антител**

**Научный руководитель – Розов Федор Николаевич**

***Ибнеева Лилия Ринатовна***

*Студент (магистр)*

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

*E-mail: lilya\_ibneyeva@mail.ru*

Производство рекомбинантных антител в настоящее время наиболее часто осуществляется с использованием клеток млекопитающих. Известно, что L-лактат является ранним маркером, предсказывающим финальный выход рекомбинантного продукта, в то время как пируват является предшественником L-лактата и центральной молекулой в метаболизме клетки, вовлеченной во множество других биохимических реакций. Стандартные подходы метабомики не позволяют немедленно оценивать внутриклеточные концентрации метаболитов в процессе культивирования. Для решения этой проблемы мы создали простой и быстрый метод динамической оценки L-лактата и пирувата внутри клеток с использованием новых спектрально оптимизированных вариантов генетически-кодируемых индикаторов Lasonic [1] и Pyronic [2]. Данные сенсоры основаны на явлении Ферстеровского переноса энергии (FRET) и подходят для использования со стандартными трехлазерными проточными цитометрами.

Для создания новых спектрально оптимизированных вариантов сенсоров Lasonic и Pyronic кДНК mTFP (мономерный салатовый флуоресцентный белок) в составе обоих сенсоров была заменена на кДНК ECFP (улучшенный циановый флуоресцентный белок). Новые сенсоры были экспрессированы в клетках Expi293F, очищены методом металл-аффинной хроматографии и охарактеризованы в присутствии 0-50 mM L-лактата натрия либо 0-10 mM пирувата натрия, для каждого сенсора, соответственно. Стабильные линии, экспрессирующие новые сенсоры, были получены на основе клона линии CHO DG44, продуцирующего модельное рекомбинантное антитело. Полученные клеточные пулы и клоны были использованы для последующих экспериментов по оценке соотношения FRET в различных условиях культивирования с использованием проточного цитометра.

Способность новых сенсоров реагировать на метаболиты принципиально не изменилась при смене флуоресцентного партнера. В противоположность mTFP, который в составе оригинального сенсора не мог быть детектирован на проточном цитометре, ECFP гораздо лучше возбуждается фиолетовым лазером 405 нм, и, как следствие, хорошо детектируется *in vivo*. Исследуя репортерные клетки с использованием проточной цитометрии, был проведен многопараметрический анализ процесса культивирования продуцентов. Были исследованы показатели роста, жизнеспособность, скорости удвоения, морфологии клеток, а также, собственно, динамика внутриклеточного лактата и пирувата. Таким образом, мы предложили новый метод для динамической оценки внутриклеточного лактата и пирувата в клетках-продуцентах рекомбинантных антител. Данный подход может быть использован как важный инструмент для мультипараметрического анализа на всех этапах создания клонов-продуцентов, а также как способ контроля биопроцессов.

**Источники и литература**

- 1) San Martín A, et al. A genetically encoded FRET lactate sensor and its use to detect the Warburg effect in single cancer cells// PLoS One. 2013;8(2):e57712.
- 2) San Martín A, et al. Imaging mitochondrial flux in single cells with a FRET sensor for pyruvate// PLoS One. 2014;9(1):e85780.