

Кост Любовь Александровна

**Разработка индикатора мембранного потенциала  
на основе красного флуоресцентного белка FusionRed**

специальность 1.5.3 (молекулярная биология)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов  
Отдела биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук (ИБХ РАН)

**Научный руководитель:**

Богданов Алексей Михайлович, кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Сурин Александр Михайлович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией  
нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России,  
главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли  
«Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии»

**Субач Федор Васильевич**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник  
лаборатории нейронаук Национального исследовательского центра «Курчатовский  
институт»

**Ведущая организация:**

Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)

Защита диссертации состоится 6 апреля 2022 г. в 11 часов на заседании диссертационного  
совета 24.1.037.01 при Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и  
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-  
Маклая, д. 16/10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ([www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)) Института  
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской  
академии наук

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2022 года

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук  
В.А. Олейников



## **1. Общая характеристика работы**

### **1.1. Актуальность темы исследования**

Визуализация электрической активности живых клеток представляет собой важнейшую задачу в контексте фундаментальных нейрофизиологических исследований. В настоящее время применяется ряд подходов для одновременной регистрации электрической активности множества клеток, необходимой для изучения физиологии процессов, происходящих в головном мозге на уровне нейронных цепей. Флуоресцентные генетически кодируемые индикаторы мембранного потенциала (ГКИМП) являются одними из наиболее перспективных инструментов в этой области. Они представляют собой белковые молекулы, кодирующие последовательности которых можно ввести в геном изучаемого организма или временно экспрессировать в интересующих клетках. Такой подход позволяет наблюдать изменения потенциала мембраны с высоким пространственным разрешением и минимальной инвазивностью, в том числе во время длительных экспериментов. «Идеальный индикатор» должен сочетать широкий динамический диапазон флуоресцентного ответа с минимальным временем отклика на изменения мембранного потенциала, должен быть применим на широком диапазоне значений потенциала и иметь низкую токсичность при использовании *in vivo*. Помимо этого, исследования *in vivo* требуют повышенной проникающей способности излучаемого света, что в случае тканей животных характерно для диапазона длин волн от красного до инфракрасного. Лучшие из доступных в настоящее время индикаторов все еще не достигли оптимального сочетания всех параметров, поэтому разработка ГКИМП представляет собой важную практическую задачу.

### **1.2. Степень разработанности области исследования**

Существует три основных группы методов для детекции электрической активности живых клеток и тканей: классические микроэлектродные методы, флуоресцентные потенциал-чувствительные красители и генетически-кодируемые индикаторы мембранного потенциала. Самый молодой подход, находящийся в фарватере современных оптогенетических методов – ГКИМП. Индикаторы мембранного потенциала начали разрабатывать около 25 лет назад, за это время были получены варианты, позволяющие детектировать не только отдельные потенциалы действия в участках тонких структур нейронов, что недоступно для классических микроэлектродных методик, но также и подпороговую нейрональную активность отдельных клеток. Однако простого и универсального инструмента, подходящего для широкого применения *in vivo* создать все еще не удалось.

Химерная белковая молекула ГКИМП состоит из двух структурно-функциональных доменов («ядер»): трансмембранный потенциал-чувствительный домен (ПЧД) воспринимает

изменение мембранного потенциала, изменяет свою конформацию и передает конформационные подвижки связанному с ним репортерному домену, изменение спектральных характеристик репортера, в свою очередь, регистрируются как сигнал индикатора.

Существуют разнообразные варианты ГКИМП. Индикаторы на основе микробных опсинов реализуют обе функциональные активности (восприятие изменения потенциала мембраны и флуоресцентный ответ) в одном структурном модуле, т.е. относятся к монодоменным индикаторам. Мультидоменные индикаторы содержат структурно отдельные потенциал-чувствительный домен и репортерный домен. Репортерный домен может быть представлен GFP-подобным флуоресцентным белком (ФБ), модификацией ФБ (пермутированные варианты srFP) или парой ФБ. Также есть варианты ГКИМП, сочетающие опсины и ФБ. Рассматривая применение индикаторов в рутинной лабораторной практике, следует обратить внимание на вопрос простоты и удобства детекции сигнала оптического индикатора. Этому требованию в большей степени удовлетворяют интенсификационные индикаторы, сигнал которых регистрируется в одном спектральном канале.

ГКИМП построены на основе природных потенциал-чувствительных мотивов из различных организмов. В большинстве существующих индикаторов в качестве ПЧД используется домен потенциал-зависимой фосфатазы асцидий или микробные опсины. Расширение репертуара ПЧД, в том числе разработка ГКИМП на основе белков млекопитающих, также является одной из первостепенных задач на пути создания молекулярных инструментов, пригодных для экспериментов *in vivo*.

### **1.3. Цель и задачи**

**Цель** настоящей работы: разработать индикатор мембранного потенциала на основе красного флуоресцентного белка FusionRed.

Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучение репертуара генетически кодируемых индикаторов мембранного потенциала, применимых *in vivo*; рассмотрение разнообразия красных флуоресцентных белков, а также методов их модификации и использования при конструировании генетически кодируемых индикаторов;
2. Создание пермутированных и бимолекулярных вариантов мономерного красного флуоресцентного белка FusionRed;
3. Применение бимолекулярных вариантов FusionRed в качестве репортерной части потенциал-чувствительных индикаторов, сконструированных в соответствии с

топологической моделью «insertion into cpFP». Тестирование полученных конструкций в клетках линии НЕК293Т и РС12;

4. Оптимизация функциональных характеристик полученных вариантов индикатора путём варьирования их флуоресцентного и/или чувствительного ядер, а также аминокислотных линкеров между ядрами.

#### **1.4. Теоретическая и практическая значимость работы**

В литературе описано несколько десятков вариантов индикаторов мембранного потенциала. В этом наборе использовано всего несколько природных потенциал-чувствительных мотивов и типов архитектуры химерного белка. Даже с учетом значительного числа охарактеризованных модификаций флуоресцентного ядра и других структурных элементов ГКИМП возможности дизайна этих молекул не исчерпаны. Более того, не выработаны общие принципы конструирования индикаторов, функциональные свойства которых соответствуют высоким требованиям, предъявляемым к современным оптогенетическим инструментам. В этой связи тестирование новых потенциал-чувствительных мотивов природных белков и вариантов молекулярной организации ГКИМП остается актуальной экспериментальной задачей. С ее решением тесно связана теоретическая значимость этой работы, состоящая в углублении понимания механизмов, лежащих в основе функционирования химерных белковых молекул ГКИМП.

Практическая значимость инструментов для регистрации электрической активности нервных клеток не вызывает сомнений; методические прорывы в этой сфере были дважды отмечены Нобелевскими премиями по физиологии и медицине (1963 и 1991 годов). Новые молекулярные инструменты нейроимаджинга, сочетающие в себе низкую инвазивность и высокую специфичность нацеливания на выбранный тип клеток, рассматриваются как неотъемлемая часть оптогенетического инструментария и позволят проводить исследования важнейших процессов, происходящих в нервной системе, на самом современном уровне.

#### **1.5. Положения, выносимые на защиту**

1. Создано 23 пермутированных и 2 бимолекулярных варианта красного флуоресцентного белка FusionRed.
2. Идентифицированы структурные детерминанты частичного расщепления полипептидной цепи FusionRed в области хромофора. На основе этих данных созданы варианты FusionRed, в которых не происходит посттрансляционный протеолиз, в том числе обладающие увеличенной яркостью флуоресценции.
3. Разработан индикатор VSD-FR189-188, реализующий новую для ГКИМП молекулярную

архитектуру «insertion into cpFP». Тем самым продемонстрирована принципиальная применимость этой молекулярной архитектуры для разработки индикаторов мембранного потенциала.

4. Показано, что модификация длины междоменного линкера может приводить к существенному изменению кинетических характеристик индикатора VSD-FR189-188 и смене «полярности» ( $dF/dV$ ) его флуоресцентного ответа.
5. Электроподвижный белок млекопитающих престин был впервые применен в роли потенциал-чувствительного домена генетически кодируемого индикатора мембранного потенциала. Получен индикатор Prestin-5 на основе престина, обладающий высокими кинетическими характеристиками ( $\tau_{on} = 0.57$  мс,  $\tau_{off} = 1.50$  мс).

## 1.6. Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 100 страницах и состоит из введения, обзора литературы, цели и задач, материалов и методов, описания полученных результатов и их обсуждения, выводов, приложений и списка цитируемой литературы, включающего 122 ссылки. Диссертация содержит 33 рисунка и 8 таблиц.

## 1.7. Апробация работы и публикации

Основные материалы диссертации были изложены в форме докладов на ведущих тематических международных конференциях: XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Россия, Томск; 2021), XXXII Зимняя молодежная научная школа ИБХ РАН (Москва, Россия; 2020), European Microscopy Congress (EMC) 2020 (online; 2020), 11th Euro Biosensors & Bioelectronics Congress, (Italy, Rome; 2019), Международная конференция «Биомембраны 2018» МФТИ (Москва, Россия; 2018). По материалам диссертации опубликовано четыре статьи в международных рецензируемых журналах.

## 2. Основное содержание работы

### 2.1. Объект исследования, предмет исследования

**Предметом** исследования является молекулярный инструмент для регистрации потенциала мембраны электровозбудимых клеток – генетически кодируемый индикатор мембранного потенциала, **объектами исследования** выступают варианты конструкций ГКИМП на основе красного флуоресцентного белка FusionRed и двух потенциал-чувствительных доменов различной природы (потенциал-чувствительной фосфатазы асцидий *Ciona intestinalis* cVSP и электроподвижного белка престина монгольской песчанки *Meriones unguiculatus* gPres).

В данной работе мы предложили новый тип белковой архитектуры индикатора и осуществили модификации обоих его структурно-функциональных доменов, а также аминокислотных линкеров между ними.

## **2.2. Основные результаты работы**

Создание индикатора на основе флуоресцентных белков (ФБ) включает в себя подбор и оптимизацию его структурно-функциональных доменов (чувствительного и репортерного), а также поиск молекулярной архитектуры, обеспечивающей их кооперативное функционирование в составе единой химерной молекулы. В данной работе мы осуществили дизайн индикатора мембранного потенциала на основе красного ФБ FusionRed по топологической схеме «insertion into cpFP», ранее не применявшейся для индикаторов этого типа. Также нами был применен новый потенциал-чувствительный домен на основе электроподвижного белка млекопитающих престина и произведен широкий спектр работ по оптимизации полученных вариантов ГКИМП.

### **2.2.1. Циркулярно пермутированные варианты белка FusionRed**

В рамках первого этапа работы – конструирования флуоресцентного ядра индикатора – нами был выбран красный флуоресцентный белок FusionRed, поскольку (i) он имеет строго мономерную структуру, необходимую для создания химерных белков и (ii) токсичность его экспрессии существенно ниже, чем у других красных ФБ. Для использования в топологической схеме «insertion into cpFP», предполагающей разрыв и перестановку фрагментов полипептидной цепи ФБ (см. раздел 2.2.3), необходимо было сконструировать циркулярно пермутированные и бимолекулярные варианты этого белка. Исходя из имеющихся данных о трехмерной структуре родственного белка mKate, были выбраны 23 точки пермутации. Их можно разделить на две группы. Первая группа – 12 вариантов с разрывом в петлевых участках полипептидной цепи (указаны первый остаток С-концевого фрагмента и последний остаток N-концевого фрагмента, которые в пермутированном белке становятся N- и С-концевыми, соответственно): 75-74, 76-73, 87-85, 150-151, 152-151, 167-166, 168-167, 169-168, 189-188, 167-167, 167-168, 168-168; вторая группа из 11 вариантов несла разрыв  $\beta$ -тяжа, вплотную примыкающего к фенольному кольцу хромофора: 142-141, 143-142, 144-143, 145-144, 142-142, 142-143, 142-144, 143-143, 143-144, 144-144, 150-149. При экспрессии в *E. coli* 11 пермутированных вариантов не обладали флуоресценцией, 12 других вариантов демонстрировали детектируемый уровень флуоресцентного сигнала различной интенсивности (Таблица 1).

**Таблица 1.** Относительная яркость и скорость созревания пермутантов FusionRed.

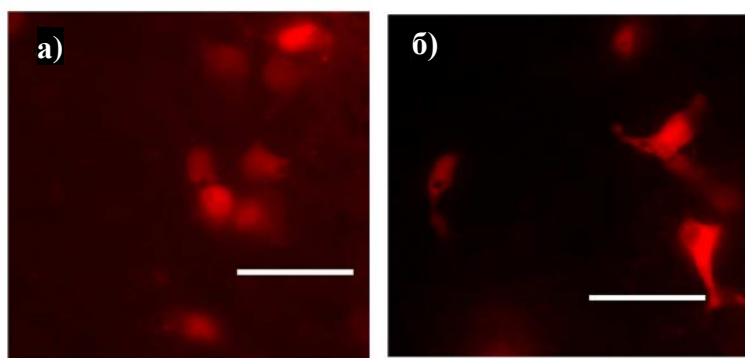
срFusionRed точка разрыва	Яркость колоний спустя 48 ч при 37°C (% от FusionRed)	Молярный коэффициент экстинкции (М-1см-1)	Квантовый выход	Яркость белка (% от FusionRed)	Скорость созревания
75–74	53,5	83000	0,04	18,3	-
76–73 R126I*	47,3	76000	0,10	41,9	+++
87–85	48,6	130000	0,11	78,8	+
150–151	74,7	124500	0,16	110	+
152–151	110,6	148000	0,14	114	+
167–166	94,5	106000	0,16	93,5	+
167–167	61,3	117000	0,17	109,6	-
167–168	59,1	125000	0,15	103	+
168–168	62,5	119000	0,17	111,5	+
168–167	105,0	97000	0,13	69,5	+
169–168	113,5	81000	0,14	62,5	+
189–188	133,1	109000	0,14	84,1	++
FusionRed	100,0	95500	0,19	100,0	++++

Относительную яркость хромофора (коэффициент экстинкции \* квантовый выход) сравнивали с FusionRed (100%). Скорость созревания измеряли путем сравнения яркости колоний *E. coli* за 24 часа инкубации при 37°C с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop CS5. «-» – отсутствие детектируемого флуоресцентного сигнала после 24 часов инкубации при 37°C, «+++» – высокий, «++» – средний и «+» – низкий уровень флуоресценции. Варианты, которые не показаны в этой таблице, не имели детектируемого флуоресцентного сигнала через 48 часов при 37°C.

Значительная часть пермутированных белков демонстрировала низкую скорость созревания хромофора, но были отобраны два варианта с минимальным временем созревания и релевантной яркостью при экспрессии в *E. coli* – срFR76-73 и срFR189-188. Полученные белки обладали спектральными характеристиками, схожими с исходным FusionRed.

### 2.2.2. Бимолекулярные варианты белка FusionRed

Мы сконструировали и протестировали бимолекулярные варианты FR189-188-zip и FR76-73-zip, соответствующие пермутированным вариантам срFR76-73 и срFR189-188. Для ассоциации фрагментов FusionRed были использованы химерные мотивы «лейциновых молний», классические димеризующие мотивы для реассоциации бимолекулярных вариантов ФБ и других молекулярных мишеней. При экспрессии в клетках линии НЕК293Т наблюдался хорошо детектируемый уровень флуоресценции (Рис. 1).



**Рисунок 1.** Клетки НЕК293Т, временно трансфицированные а) FR76-73-zip и б) FR189-188-zip.

Масштабная линейка 50 мкм.



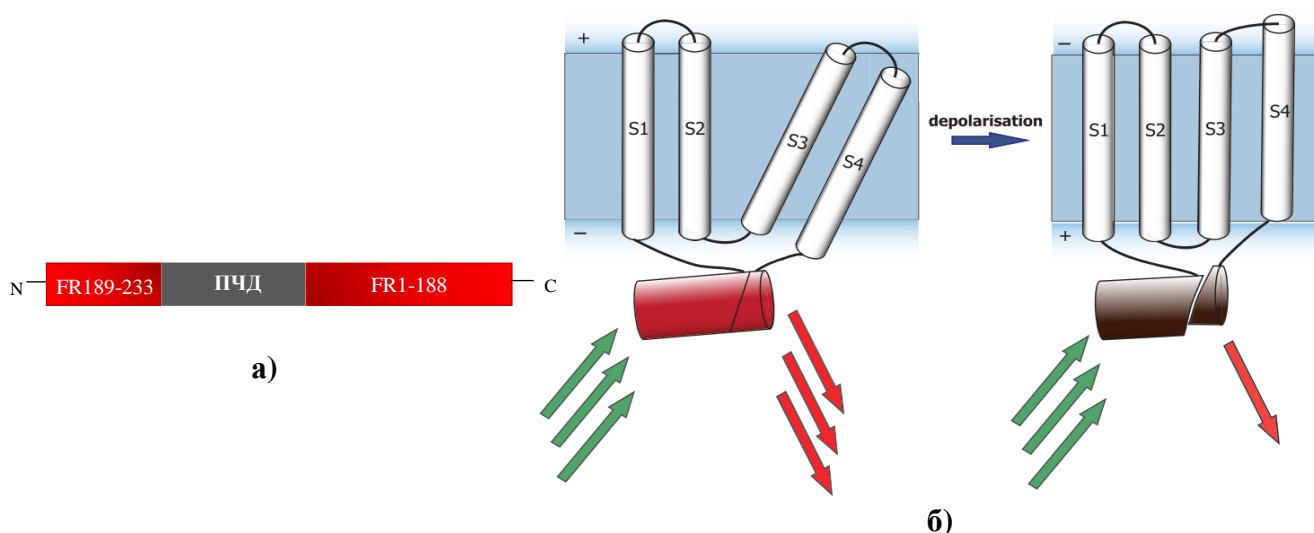
Интенсивность флуоресцентного сигнала клеток с бимолекулярным вариантом FR189-188-zip была схожа с таковой для клеток с исходным белком FusionRed, вместе с тем, FR76-73-zip демонстрировал сниженную более чем в 5 раз интенсивность флуоресценции относительно родительского белка. Таким образом, мы получили бимолекулярный вариант белка FusionRed с разрывом по 188-189 положениям (FR189-188-zip), который обладает рядом свойств, удобных для его практического использования. Так, в отличие от большинства описанных ранее бимолекулярных вариантов красных флуоресцентных белков, FR189-188 способен реассоциировать и формировать «зрелый» хромофор при 37°C, что делает возможным его применение в клетках млекопитающих.

### **2.2.3. Создание новой топологической комбинации ГКИМП на основе бимолекулярного варианта белка FusionRed**

При разработке индикатора мембранного потенциала мы использовали ранее не применявшуюся для ГКИМП топологическую схему со вставкой последовательности чувствительного домена (ciVSP) внутрь последовательности циркулярного пермутанта FusionRed («insertion into cpFP»; см. рис. 2а). Мы предположили, что такой дизайн будет способствовать более тонкому взаимодействию доменов индикатора, что положительно скажется на его функциональных свойствах (кинетика и динамический диапазон флуоресцентного ответа). В отличие от типичного индикатора на основе пермутированного ФБ, здесь полипептидная цепь ФБ разделяется на два фрагмента инсерцией ПЧД, новые концы ФБ не соединены с чувствительным доменом, а могут свободно взаимодействовать друг с другом с образованием зрелого флуоресцентного белка. Ассоциация фрагментов ФБ аналогична таковой наблюдающейся при бимолекулярной флуоресцентной комплементации, однако происходит в этом случае внутримолекулярно. Потенциал-чувствительный домен в цикле своей работы претерпевает конформационные подвижки, существенно изменяя относительные пространственные положения своих концов, поэтому мы предположили, что архитектура индикатора, активно задействующая оба конца чувствительного домена, может быть более эффективной, чем «классическое» последовательное соединение cpFP-ПЧД, где задействован только один конец полипептидной цепи чувствительного и репортерного доменов.

Для создания индикатора был выбран трансмембранный ПЧД из потенциал-чувствительной фосфатазы асцидий *Ciona intestinalis*, ранее использованный в индикаторе Butterfly1.2. Он зарекомендовал себя как перспективное чувствительное ядро индикатора мембранного потенциала благодаря быстрой кинетике и надежному нацеливанию на мембрану в различных типах клеток (doi:10.1152/jn.00452.2012). Ответ на изменения мембранного потенциала обеспечивается в нем значительным конформационным сдвигом четвертой

трансмембранной спирали (S4), который может эффективно передаваться репортерному домену. В нашем дизайне конформационные подвижки, происходящие в ПЧД при изменении мембранного потенциала, предположительно будут влиять на интенсивность флуоресценции реассоциирующего ФБ FusionRed за счет механического растяжения нековалентно связанного бета-бочонка (Рис. 2б). Регистрация флуоресцентного ответа индикатора в этом случае производится в единственном красном канале как изменение интенсивности сигнала.

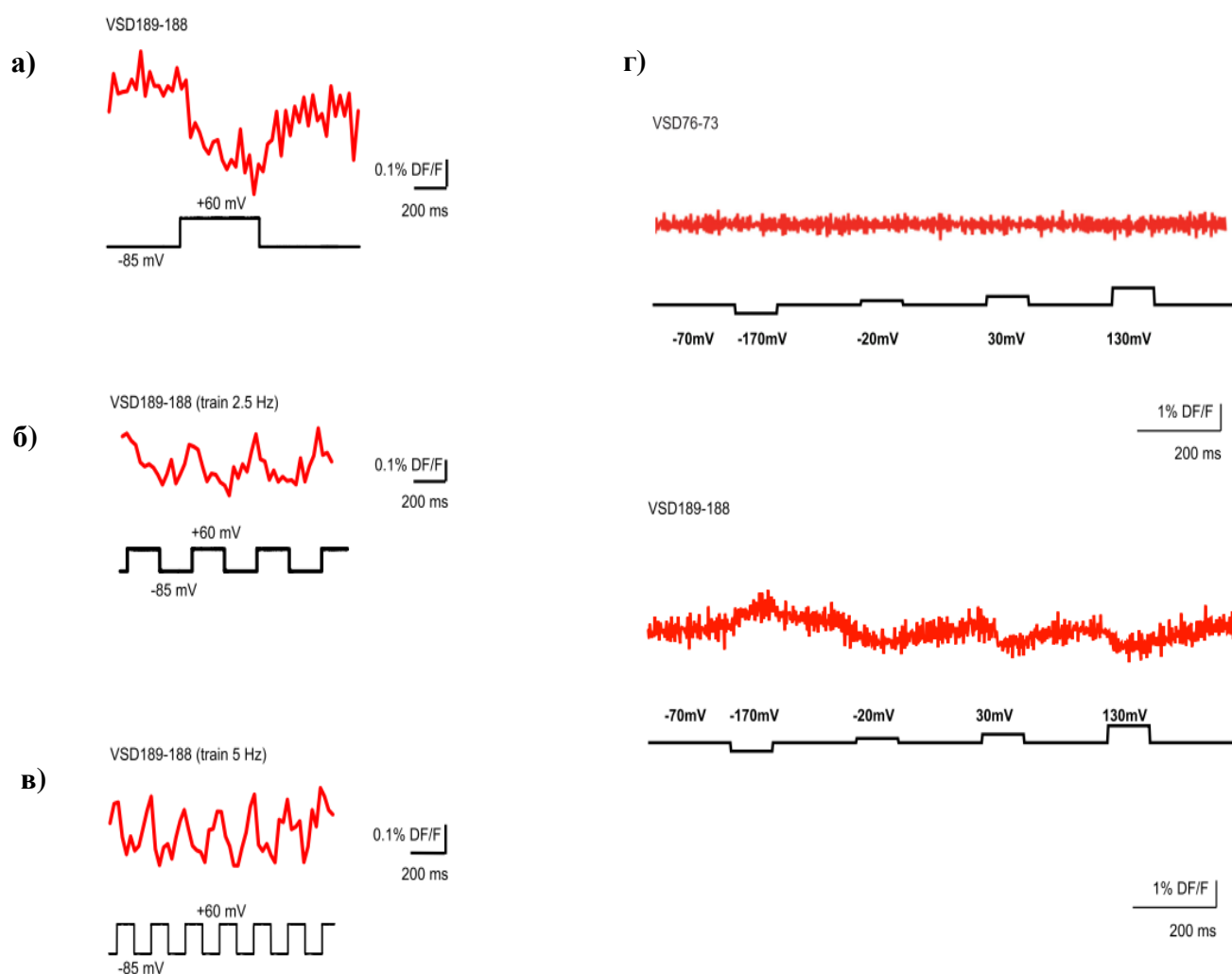


**Рисунок 2.** а) Схема генетической конструкции, реализующей топологию «insertion into cpFP». Красным цветом обозначены фрагменты кодирующей последовательности FusionRed, серым – кодирующая последовательность потенциал-чувствительного домена из *ciVSP*; б) Гипотетическая схема работы индикатора *ciVSP-into-cpFusionRed*. Деполяризация вызывает смещение трансмембранного домена, чувствительного к изменению потенциала мембраны, что в свою очередь ведет к изменению конформации ФБ и снижению интенсивности флуоресцентного сигнала. S1-S4 – трансмембранный ПЧД из *Butterfly1.2*, красный цилиндр, соединенный с N- и C-концами ПЧД, изображает ФБ FusionRed с разрывом.

Мы сконструировали два варианта экспрессионных векторов pVSD-FR76-73 и pVSD-FR189-188 и экспрессировали обе конструкции в клетках HEK293T и PC12.

Для конструкции pVSD-FR76-73 мы наблюдали агрегацию белка в перинуклеарном пространстве и относительно слабый сигнал на плазматической мембране при экспрессии в обеих модельных системах (HEK293T и PC12). Низкий уровень флуоресцентного сигнала и слабая экспрессия в сочетании с проблемами мембранной локализации приводят к невозможности достоверно регистрировать сдвиг флуоресцентного сигнала в ответ на изменения потенциала мембраны. Напротив, VSD-FR189-188 имел преимущественно мембранную локализацию и демонстрировал снижение интенсивности флуоресценции в красном канале в ответ на изменения мембранного потенциала.

Чтобы оценить чувствительность к изменению потенциала VSD-FR189-188, в коллаборации с Лабораторией клеточной нейробиологии обучения Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН мы провели функциональное тестирование индикатора: фиксировали потенциал в режиме voltage clamp и подавали ступенчатые изменения потенциала к клеткам, трансфецированным VSD-FR189-188, одновременно регистрируя оптический ответ с помощью флуоресцентного микроскопа. Изменения потенциала от значений удерживающего потенциала -85 mV до +60 mV вызвали снижение флуоресценции VSD-FR189-188 при тестировании на клетках линии PC12 (нормированная амплитуда сигнала:  $0.4 \pm 0.04\%$ ,  $n = 5$  клеток; Рис. 3а).



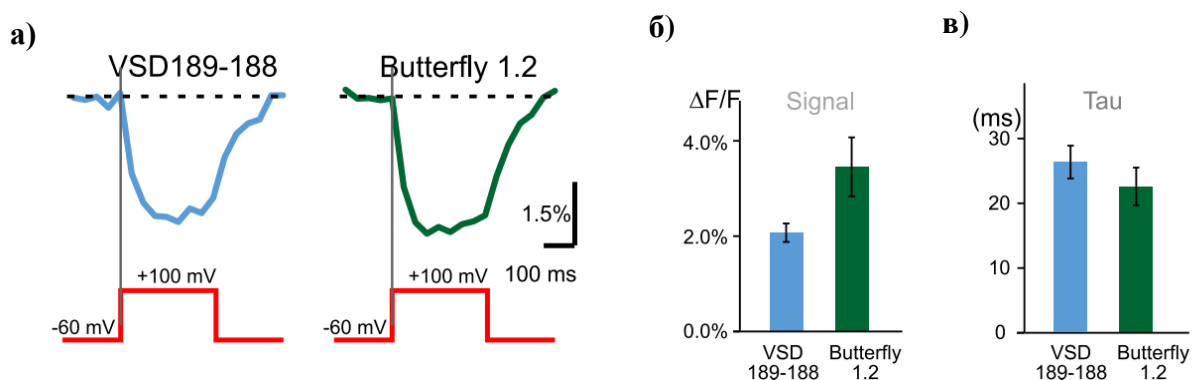
**Рисунок 3.** а)-в) Функциональное тестирование вариантов ГКИМП на основе srFR в клетках PC12 и г) HEK293T. а)-в) Изменения флуоресценции (верхние кривые) для отдельных ступенек напряжения, а) и серий частотой 2,5 Гц б) и 5 Гц в). Под каждой кривой показаны ступеньки подаваемого потенциала. г) Сравнение сигнала VSD-FR189-188 (нижняя кривая), индуцированного командным протоколом одного шага гиперполяризации и трех последующих шагов инкрементной деполяризации, с записью VSD-FR76-73. Изображения записаны с частотой 500 кадров в секунду, усреднения по 16 экспериментам.

Мы также провели тестирование VSD-FR189-188 в клетках линии HEK293T (в коллаборации с Center for Functional Connectomics, Korea Institute of Science & Technology, Seoul, Korea). Эксперимент представлял собой пошаговое изменение подаваемых ступенек потенциала от удерживающего потенциала -110 мВ до -170 мВ, -20 мВ, 30 мВ и 130 мВ с длительностью шага 100 мс (Рис. 3г). Изменения флуоресценции соответствовали шагам программы изменения генерируемого потенциала.

Мы сравнили в одинаковых условиях сигнал VSD-FR189-188 с сигналом ранее описанного ГКИМП Butterfly1.2. Наши эксперименты показали, что как кинетические характеристики, так и амплитуда ответов в этих индикаторах сопоставимы.

Амплитуда сигнала VSD-FR189-188:  $2.1 \pm 0.3\%$ , Butterfly1.2:  $3.5 \pm 0.7\%$ ;

Константа времени  $\tau$  VSD-FR189-188:  $26.3 \pm 2.6$  мс, Butterfly1.2:  $22.7 \pm 3.0$  мс;  $n = 6$  клеток, (Рис. 4).

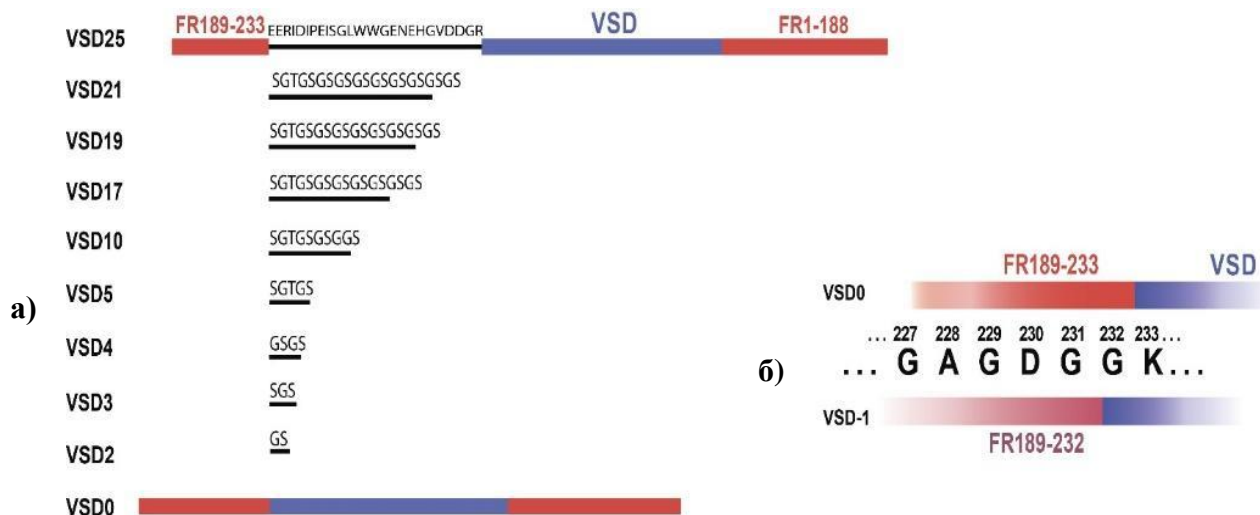


**Рисунок 4.** Сравнение амплитуды и динамики сигнала VSD-FR189-188 и Butterfly1.2, протестированных в аналогичных условиях в клетках HEK293T. а) Флуоресцентные ответы, б) средняя амплитуда сигнала  $\pm$  SEM, в)  $\tau \pm$  SEM, постоянная времени, полученная из экспоненциальной аппроксимации стадии нарастания ( $\tau$ -оп) сигнала индикаторов, показанных на а).

Таким образом, наши эксперименты продемонстрировали, что конструкция индикатора, основанная на вставке ПЧД в пермутированный флуоресцентный белок, может использоваться для регистрации изменения потенциала мембраны.

#### 2.2.4. Оптимизация междоменного линкера индикатора VSD-FR189-188

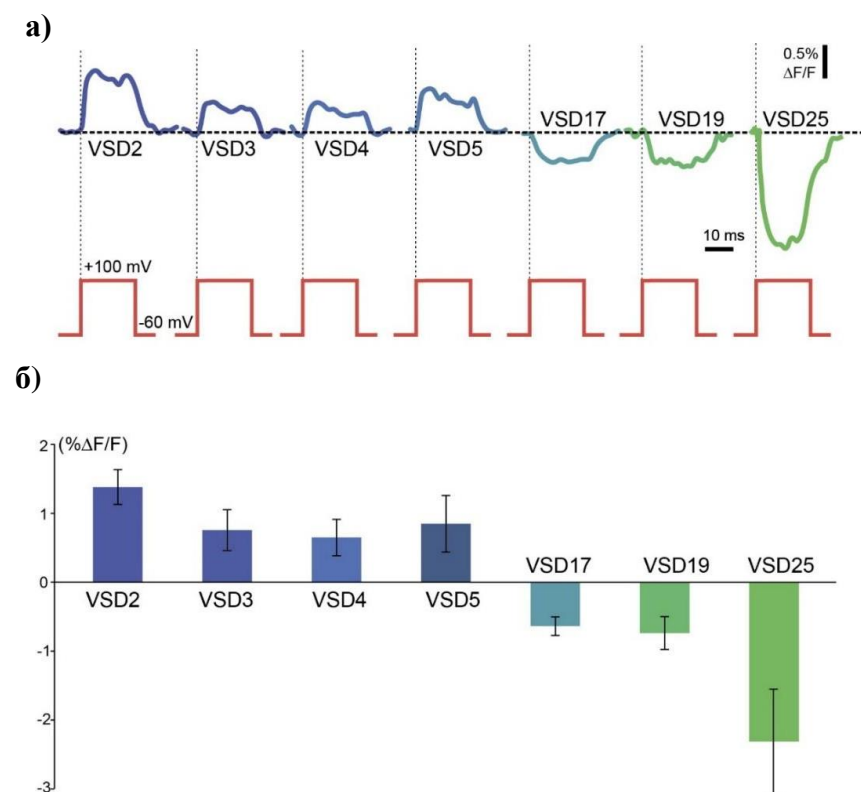
В молекуле VSD-FR189-188 С-концевой фрагмент FusionRed (189-233) соединен с чувствительным доменом siVSP через аминокислотный линкер, тогда как N-концевой фрагмент (1-188) присоединен «вплотную» (Рис. 5а).



**Рисунок 5.** а) Схематическое изображение конструкции вариантов индикатора с 10 различными длинами линкеров, от исходного VSD-FR-189-188 (для унификации номенклатуры назван VSD25) до VSD0. Фрагменты FusionRed показаны красным, потенциал-чувствительный домен (VSD) – синим, а линкеры черным. б) Вариант VSD-1 с укороченной частью FR189-232 показан розовым.

Исходный линкер из 25 аминокислот (EERIDIPEISGLWWGENEHGVDDGR) представлен нативной последовательностью из N-концевой области ПЧД потенциал-чувствительной фосфатазы *ciVSP*. В рабочем цикле индикатора VSD-FR189-188 линкер передает механическую силу, вызванную сдвигом конформации ПЧД под действием смены потенциала, молекуле ФБ, оказывая влияние на ее структуру и приводя к изменению интенсивности флуоресценции. Мы предположили, что сравнительно узкий динамический диапазон и невысокая скорость ответа VSD-FR189-188 могут быть следствием неэффективной передачи энергии внутри молекулы ГКИМП, а укорочение междоменного линкера, вероятно, может усилить междоменное взаимодействие. Чтобы проверить это предположение, мы заменили 25-аминокислотный «нативный» линкер набором укороченных гибких линкеров из глицин-сериновых повторов ((GS)*n*). Всего было сконструировано 9 вариантов индикатора (Рис. 5а) с длиной линкера в диапазоне от 0 (без линкера) до 21 аминокислоты (0, 2, 3, 4, 5, 10, 17, 19, 21; VSD0-21 в тексте), где VSD0 – вариант с фрагментом FusionRed 189-233, соединенным вплотную с ПЧД. Мы также сконструировали вариант VSD-1 (Рис. 5б), который представляет собой VSD0 с фрагментом FusionRed, уменьшенным на одну C-концевую аминокислоту (до 189-232). Варианты VSD0 и VSD-1 не обладали флуоресценцией при экспрессии в клетках HEK293Т. Для оценки амплитуды и полярности сигнала в остальных 8 вариантах конструкций индикаторов, мы провели регистрацию оптических сигналов, вызванных одиночными ступеньками потенциала вариантов VSD25-VSD1 при экспрессии их в HEK293Т.

В 6 из 8 исследуемых вариантов конструкций генерирование «ступенчатого» потенциала приводило к ступенчатым изменениям уровня флуоресценции (Рис. 6).



**Рисунок 6.** Сравнение амплитуд оптических сигналов вариантов ГКИМП с разными длинами междоменных линкеров при экспрессии их в HEK293T.

а) Примеры кривых изменения флуоресцентного сигнала (сверху), вызванного ступенчатым изменением удерживающего потенциала от -60 мВ до +100 мВ (показано снизу красным цветом).

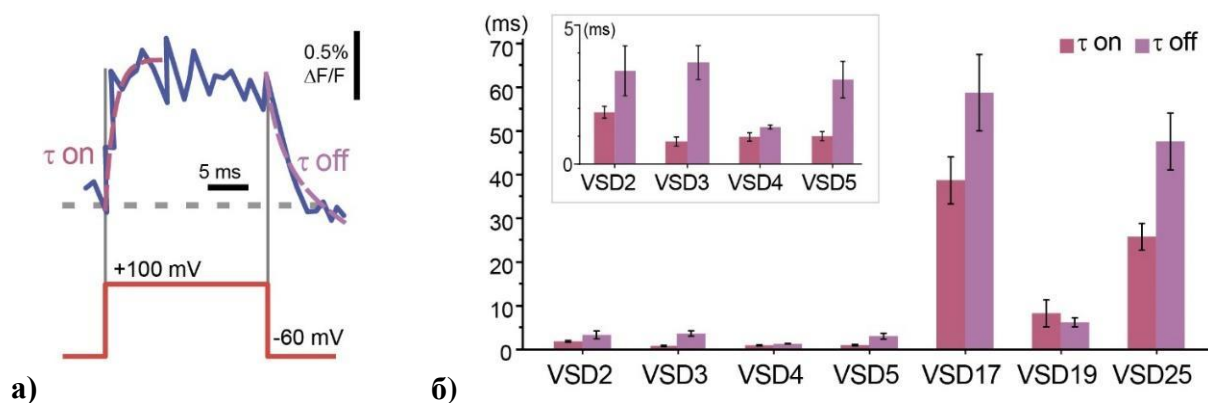
б) Усредненные амплитуды ответов индикаторных конструкций ( $dF/F$ ). Каждый столбец представляет среднее значение для 3–5 экспериментов  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

Можно наблюдать тенденцию в зависимости «полярности» флуоресцентного ответа индикатора от длины междоменного аминокислотного линкера, выражающуюся в «знаке» соотношения  $dF/dV$ . Снижение интенсивности флуоресценции в ответ на увеличение потенциала – характерный для исходного VSD25 «отрицательный» ответ, меняется на «положительный»  $dF/dV$  между вариантами с линкерами длиной 17 и 5 а.о. Вместе эти изменения формируют «синусоидную» зависимость с локальным отрицательным максимумом при длине линкера в 25 а.о. и локальным положительным максимумом при 2 а.о.

Уменьшение флуоресцентного сигнала в ответ на увеличение потенциала мембраны рассматривается как широко распространенный среди существующих ГКИМП недостаток. Ранее «переключение» полярности ответа было получено в индикаторе Marina путем направленного мутагенеза репортерного домена (doi:10.1021/acchemneuro.6b00234). В нашей работе мы обнаружили альтернативный способ изменения полярности индикатора, потенциально применимый к широкому кругу индикаторов на основе флуоресцентных белков.

Далее мы проанализировали кинетические характеристики полученных вариантов индикатора, рассчитанные как временные константы при моноэкспоненциальной

аппроксимации нарастания и спада флуоресцентного сигнала в начале и в конце ступеньки потенциала (Рис. 7а).



**Рисунок 7.** Кинетические характеристики ответа индикаторов VSD2-25. а) Пример моноэкспоненциальной аппроксимации (пунктирные пурпурные линии) нарастания и спада сигнала в начале и в конце ступеньки потенциала 160 мВ (красная линия). Оптический отклик (синяя кривая) имел задержку относительно подаваемого потенциала (красная кривая ниже). Задержка характеризовалась константой времени  $\tau$  (пунктирная пурпурная линия). б) Гистограммы показывают  $\tau \pm SEM$  для индикаторов с разной длиной линкера, полученные из моноэкспоненциальных аппроксимаций нарастания ( $\tau_{on}$ ) и затухания ( $\tau_{off}$ ) сигнала. На врезке показаны данные  $\tau$  для VSD2-VSD5.

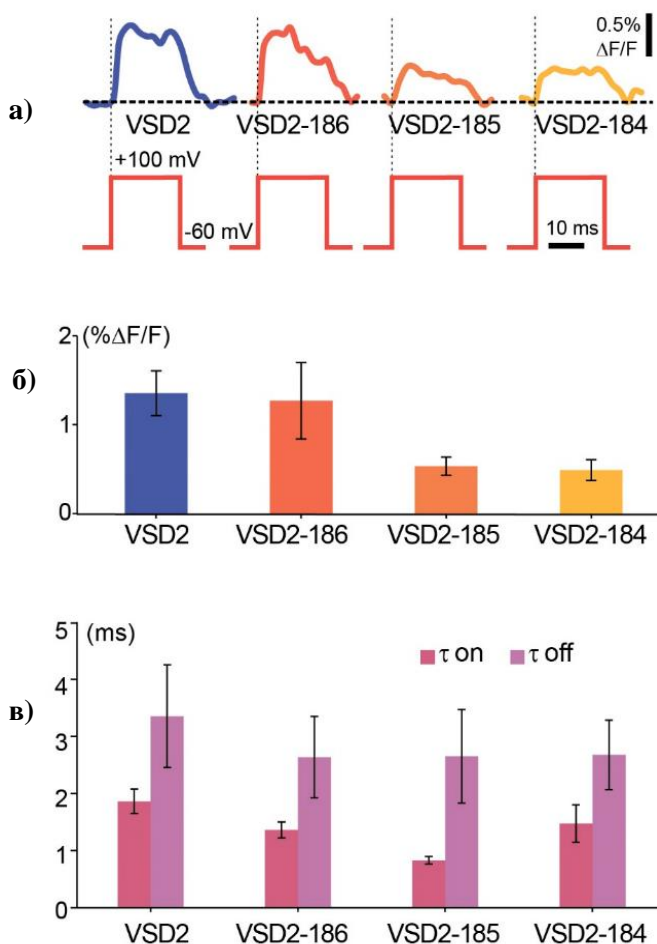
Этот анализ показал, что конструкции с длиной линкера 5 а.о. и меньше могут достигать субмиллисекундной кинетики ответа, что значительно (в 25-30 раз) быстрее, чем у вариантов с длинным линкером (VSD17, 19) и исходного индикатора VSD25 (~25 мс). Быстрая кинетика ответа индикатора является важным преимуществом, необходимым для применения *in vivo*. Индикаторы VSD2-VSD5 показали кинетические характеристики, сравнимые с таковыми для лучших основанных на ФБ ГКМП. Узкий динамический диапазон флуоресцентного ответа этих конструкций, недостаточный для использования *in vivo*, является показателем, подлежащим дальнейшей оптимизации.

VSD2 – вариант с самым большим значением  $\Delta F/F$  (~1,5%) среди «быстрых» конструкций с короткими линкерами – был выбран в качестве отправной точки для дальнейшей модификации. Поскольку возможности для укорочения линкера между потенциал-чувствительным доменом и С-концевым фрагментом FusionRed были исчерпаны, было решено урезать аминокислоты на С-конце N-концевого фрагмента FusionRed (1-188). Были сконструированы 3 варианта векторов на основе VSD2 с фрагментом FusionRed укороченным на 2, 3 и 4 аминокислоты (названные VSD2-186, VSD2-185, VSD2-184) (Рис. 8).



**Рисунок 8.** Модификации VSD2 – VSD2-186, VSD2-185, VSD2-184 – получены путем укорочения C-конца *cpFusionRed* 1-188. Красным цветом показаны два фрагмента *cpFusionRed*, зеленым – междуомный линкер, синим – ПЧД.

Функциональное тестирование VSD2 и его производных показало, что их амплитуды сигналов либо не были значительно изменены, либо уменьшились по сравнению с исходным VSD2 (Рис. 9а). Константа времени VSD2-185 была меньше, чем у VSD2 (0,83 мс против 1,86 мс, Рис. 9с). Таким образом, укорочение N-концевого фрагмента *FusionRed* приводило к относительно небольшим колебаниям характеристик индикатора, то есть данные модификации не позволяют достичь увеличения чувствительности конструкции и добиться расширения динамического диапазона индикатора VSD2.



**Рисунок 9.** Функциональное тестирование модифицированных вариантов VSD-2 в клетках HEK293T. а) Изменение флуоресценции (верхние кривые) при изменении мембранного потенциала от -60 мВ до +100 мВ (нижние кривые, красный цвет), зарегистрированные с использованием четырех различных вариантов индикатора VSD2, линкеры были изменены с C-концов (Рис. 8).

(б) Амплитуды сигналов индикаторов  $\pm$  SEM, измеренные относительно базовой линии в конце каждого шага потенциала. Цвета столбцов соответствуют цветам графиков, показанных на (а).

(в) Постоянные времени ( $\tau$ )  $\pm$  SEM, полученные из экспоненциальной аппроксимации ответов индикаторов.



### 2.2.5. Оптимизация репортерного домена

Помимо оптимизации линкерной последовательности, мы предприняли попытку улучшения характеристик репортерного домена. При экспрессии FusionRed наблюдается образование как зрелой флуоресцентной формы, так и варианта с расщеплением основной цепи белка в области, участвующей в образовании хромофора.

Сотрудниками лаборатории рентгеноструктурных исследований биополимеров ИБХ РАН была определена кристаллическая структура мономерного красного флуоресцентного белка FusionRed (PDB ID: 6U1A) ( $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$  580/608 нм). Обнаружилось два альтернативных пути посттрансляционной модификации, приводящих к образованию различающихся продуктов, а именно, зрелого хромофора состава Met63-Tyr64-Gly65 и нециклизованного хромофоробразующего трипептида с расщеплением основной цепи белка между Met63 и предшествующим Phe62 и окисленной связью C $\alpha$ -C $\beta$  Tyr64 (в соотношении примерно 60:40). Мы проанализировали структуры FusionRed и нескольких родственных красных ФБ, идентифицировали структурные элементы, вызывающие гидролиз полипептидной цепи, и подтвердили их влияние с помощью точечного мутагенеза. Эти внесло вклад в понимание посттрансляционной модификации GFP-подобных флуоресцентных белков за пределами канонического механизма циклизации-дегидратации-окисления. Направленным мутагенезом удалось создать варианты с ингибированием расщепления пептидного остова, и вариант FusionRed с ~30% улучшенной яркостью (Табл. 2).

*Таблица 2. Характеристики вариантов FusionRed.*

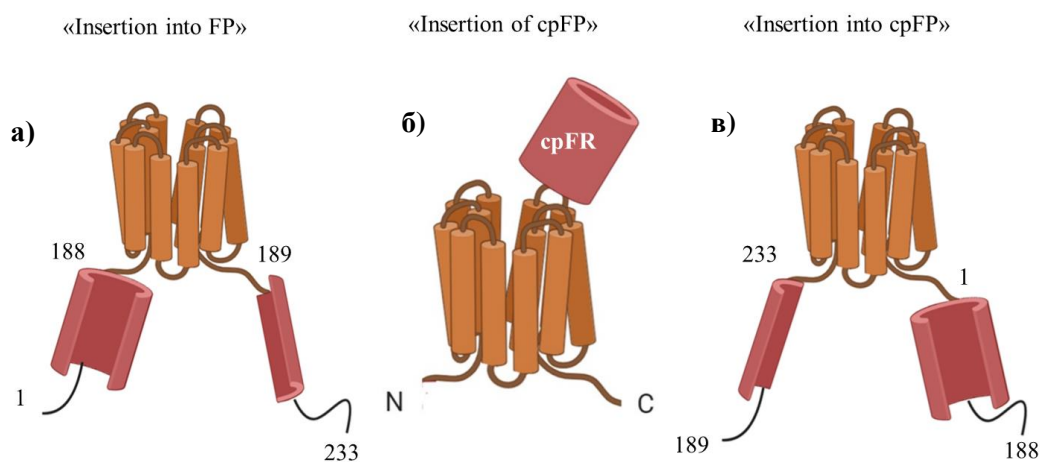
Флуоресцентный белок	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (нм)	Молярный коэффициент экстинкции ( $M^{-1}cm^{-1}$ )	Квантовый выход	Яркость (%)	Разрыв полипептидной цепи
FusionRed	580/608	94,5	0,19	100	Да
FusionRed C158A	571/598	91	0,24	126	Да
FusionRed C158L	580/606	75	0,12	50	Нет
FusionRed C158L/A157T	578/608	96	0,16	86	Нет

FusionRed/C158L был применен в форме бимолекулярного варианта в конструкции аналогичной VSD-FR189-188. Однако при экспрессии в HEK293T он демонстрировал значительно сниженный уровень флуоресцентного сигнала, что препятствовало проведению дальнейшего электрофизиологического тестирования. Работы по поиску оптимального репортерного домена продолжаются, в т.ч. с применением подходов предсказания пространственной структуры белков на основе данных рентгеноструктурного анализа FusionRed и инструмента AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

## 2.2.6. Применение электроподвижного белка млекопитающих престина для разработки ГКИМП на его основе.

Престин - мембранный белок млекопитающих, впервые был обнаружен в наружных волосковых клетках внутреннего уха монгольской песчанки *Meriones unguiculatus*. Престин обладает уникальным свойством электроподвижности. Он располагается в боковой мембране и придает клетке электромеханическую активность, циклы растяжения-сжатия престина соответствуют сигналам деполяризации-реполяризации мембраны волосковых клеток (и могут происходить с частотой до нескольких кГц). Таким образом, престин осуществляет преобразование электрического сигнала в механический. Одновременные конформационные подвижки множества молекул престина приводят к макроскопическим изменениям длины клеток, что лежит в основе усиления звуковых колебаний. Описанные свойства позволяют рассматривать престин в качестве перспективной основы для разработки новых молекулярных инструментов регистрации электрической активности в популяциях электровозбудимых клеток.

В рамках решения задачи расширения репертуара ПЧД мы разработали варианты конструкций индикаторов мембранного потенциала на основе престина в трех различных топологиях соединения полипептидных цепей престина с флуоресцентным белком (Рис. 10).

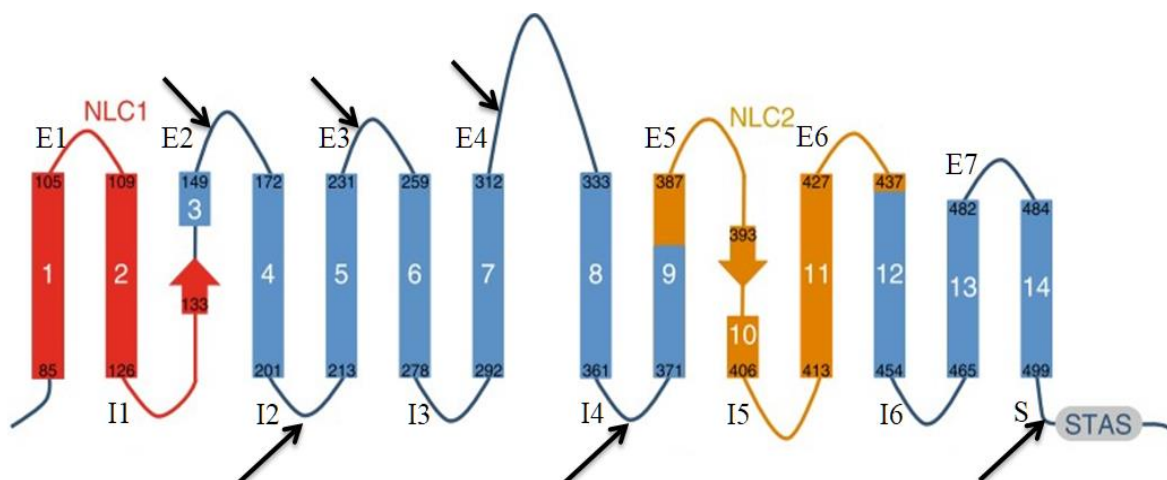


**Рисунок 10.** Варианты топологического сочетания ГКИМП из престина и флуоресцентного белка, реализованные в настоящей работе. Оранжевые цилиндры обозначают престин, красный цилиндр – фрагменты флуоресцентного белка (на примере FusionRed) и его циркулярно пермутированного варианта (cpFR). а)-в) три различные топологические схемы, примененные в составе химерной молекулы престин-ФБ.

**а) Топология «insertion into FP» (Prestin-FR)** представляет собой вставку гена престина (чувствительного ядра индикаторной конструкции) внутрь гена флуоресцентного белка (репортер индикатора) с сохранением исходной последовательности аминокислот ФБ, но с разделением его на два фрагмента. Вставка кодирующей последовательности престина в последовательность ФБ FusionRed осуществлялась между аминокислотными остатками 188

и 189 последнего, нумерация по FusionRed (Рис. 10а). Мы провели **первичное тестирование** полученных конструкций в эукариотических клетках, а именно определение интенсивности флуоресцентного сигнала и локализации полученных химерных белков в клетках линии НЕК293Т. Первичное тестирование показало низкую интенсивность флуоресцентного сигнала и отсутствие выраженной мембранной локализации экспрессируемого белка. Также для Prestin-FR наблюдалась тенденция к накоплению и агрегации в цитоплазме. Вероятно, при формировании третичной структуры этого варианта химерного белка не происходит ассоциации полипептидной цепи FusionRed, в результате чего нарушается полноценное формирования «зрелого» флуорофора. Эти обстоятельства показывают нецелесообразность перехода к функциональному тестированию варианта Prestin-FR.

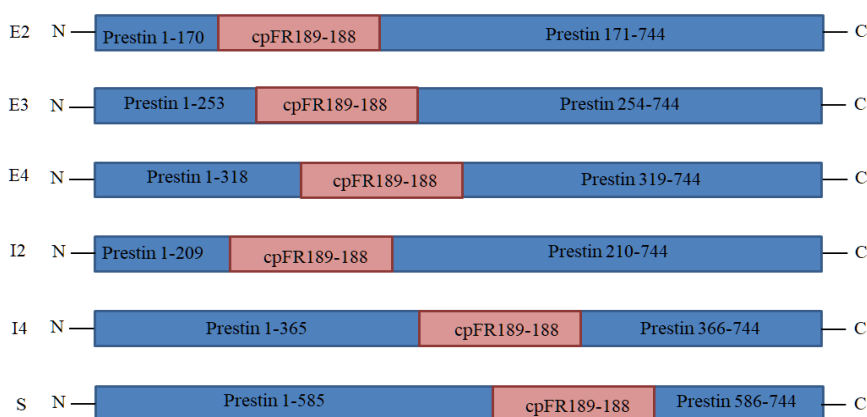
б) **Топология «insertion of cpFP»** основана на инсерции кодирующей последовательности пермутированного ФБ (cpFR189-188) внутрь последовательности престины (Рис. 10б). Трансмембранный домен престины претерпевает конформационные перестройки в ответ на изменение мембранного потенциала. По данным моделирования пространственной структуры престины, его трансмембранный домен включает в себя 14 трансмембранных сегментов, соединенных 13 петельными областями. Гидрофобные трансмембранные сегменты располагаются в мембране, поэтому для инсерции репортерного домена были предложены внеклеточные петельные области, а также участок, соединяющий трансмембранный домен и внутриклеточный STAS-домен (Рис. 11).



**Рисунок 11.** Принципиальная схема вторичной структуры молекулы престины (doi: 10.1038/ncomms4622). Прямоугольники – ТМ  $\alpha$ -спиральные участки, прямоугольники со стрелкой –  $\beta$ -листы, толстые линии обозначают петельные участки. Черные стрелки показывают положения инсерции ФБ cpFR189-188. E – петельные участки престины, располагающиеся во внеклеточном пространстве, I – внутриклеточные петельные участки, S – область соединения ТМ домена и внутриклеточного STAS-домена.

Топология «insertion of cpFP» была реализована в 6 вариантах конструкций: 2 конструкции с инсерцией пермутированного ФБ во внутриклеточные внеклеточные петельные фрагменты (I2, I4), 3 варианта с инсерцией во внеклеточные петельные участки (E2, E3, E4) и 1

конструкция с инсерцией в область между последним ТМ сегментом и STAS-доменом (S) (Рис. 12).

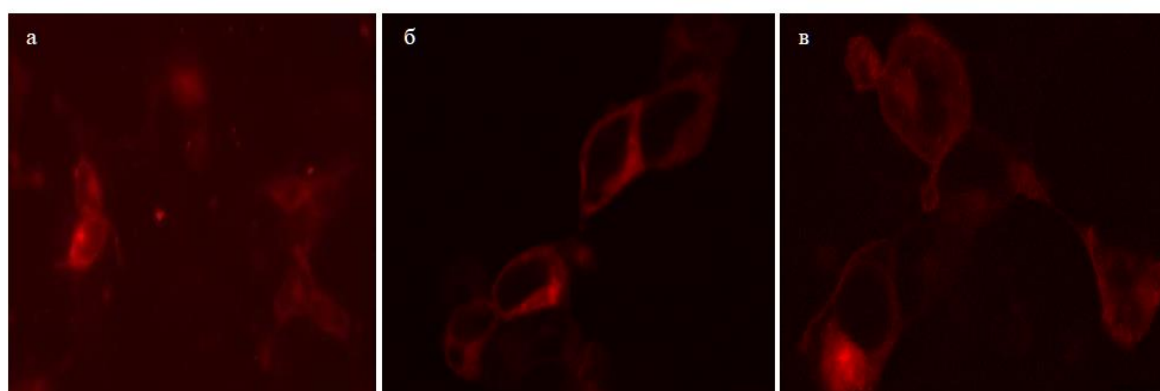


**Рисунок 12.** Схематическое изображение последовательностей химерных конструкций, реализующих топологию «insertion of cpFP». Последовательность cpFR189-188 (красный) располагается внутри последовательности престаина (синий).

Полученные конструкции были транзистентно трансфицированы для экспрессии в клетках линии НЕК293Т. Оценку уровня флуоресценции и локализации экспрессии химерных белков проводили через 48 ч после трансфекции.

При инсерции ФБ cpFR189-188 в наружные петельные участки молекулы престаина (конструкции E2, E3, E4) наблюдалась низкая интенсивность флуоресценции, формирование крупных агрегатов в цитоплазме, а также патологически округлая морфология клеток. Эти признаки могут указывать на токсичность конструкций.

Конструкции с инсерцией cpFR189-188 во внутриклеточные петельные участки (I2, I4, S) демонстрировали среднюю интенсивность флуоресцентного сигнала и преимущественно мембранную локализацию (Рис. 13). Последующее функциональное тестирование, однако, установило, что они не проявляют индикаторных свойств (не показано).



**Рисунок 13.** Флуоресцентные микрофотографии клеток линии НЕК293Т, трансфицированных конструкцией а) I2, б) I4, в) S.

**в) Топология «insertion into cpFP» (Prestin-X, где X – длина междоменного линкера)** предполагает инсерцию гена престаина внутрь гена циркулярного пермутанта

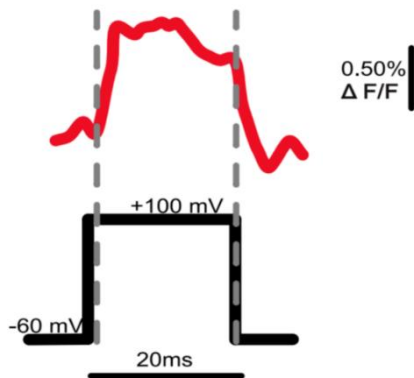
флуоресцентного белка (cpFR189-188) (Рис. 10в). Дизайн конструкций в топологии «insertion into cpFP» (Prestin-X) использовался ранее при разработке линейки ГКИМП VSD-FR189-188. Строение конструкций при этом схоже с таковым для Prestin-FR, отличие заключается в инверсии фрагментов полипептидной цепи FusionRed. Нами была создана серия конструкций с разными вариантами длины N-концевого линкера (от 2 до 17 а.о.). Результаты первичного тестирования вариантов Prestin-X при экспрессии в клетках HEK293T представлены в Табл. 3.

**Таблица 3.** Аминокислотный состав вариантов N-концевого линкера и характеристики первичного тестирования в клетках HEK293T для топологии «insertion into cpFP».

Название конструкции	Аминокислотная последовательность N-концевого линкера	Уровень флуоресцентного сигнала*	Локализация
Prestin-2	GS	Средний	Цитоплазматическая, есть гранулы
Prestin-4	GSGS	Средний	Мембранная, есть гранулы
Prestin-5	SGTGS	Средний	Мембранная, есть гранулы
Prestin-6	GSGSGS	Средний	Мембранная, есть гранулы
Prestin-10	SGTGSGSGGS	Средний	Цитоплазматическая, есть гранулы
Prestin-17	SGTGSGSGSGSGSGSGS	Низкий	Цитоплазматическая, есть гранулы

\*оценка уровня флуоресцентного сигнала производилась по времени экспозиции возбуждающим светом. При значениях экспозиции короче 1/100 с определяли уровень флуоресцентного сигнала как «высокий», от 1/100 до 1/2 с – как «средний», длиннее 1/2 с – как «низкий».

Первичное тестирование показало удовлетворительную интенсивность флуоресцентного сигнала одновременно с мембранной локализацией у вариантов Prestin-4, Prestin-5 и Prestin-6. Для химерных белков с наиболее коротким (Prestin-2) и наиболее длинными N-концевыми линкерами (Prestin-10 и Prestin-17) наблюдалась неспецифическая локализация флуоресцентного сигнала, а для варианта с линкером 17 детектировался крайне низкий уровень флуоресцентного сигнала. Функциональное тестирование (стимуляция клеток с одновременной регистрацией динамики флуоресцентного сигнала) осуществлялось в коллаборации с Лабораторией клеточной нейробиологии обучения ИВНД РАН. Тестировались три прошедшие первичное тестирование конструкции (Prestin-4, Prestin-5 и Prestin-6), для варианта Prestin-5 детектировали выраженный флуоресцентный ответ при изменении потенциала (Рис. 14).



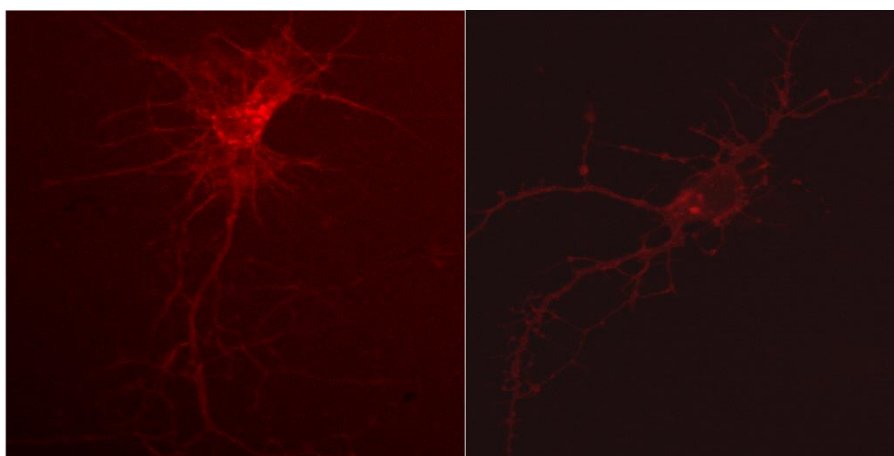
**Рисунок 14.** Изменение интенсивности флуоресцентного сигнала (красный цвет) при тестировании Prestin-5 в клетке линии HEK293T.

Изменение мембранного потенциала производилось от -60 мВ до +100 мВ (черный цвет).

Изменение амплитуды флуоресцентного сигнала Prestin-5 при увеличении мембранного потенциала с -60 мВ до 100 мВ  $\Delta F/F$  составило в среднем  $1,23 \pm 0,91\%$ .

Prestin-5 продемонстрировал узкий динамический диапазон флуоресцентного ответа по сравнению с таковым для большинства ГКИМП последних поколений. В то же время его кинетические характеристики ( $\tau_{\text{on}} = 0,57$  мс,  $\tau_{\text{off}} = 1,50$  мс) сравнимы с характеристиками наиболее «быстрых» индикаторов на основе микробных опсинов и значительно выше таковых у большинства существующих ГКИМП на основе ФБ. При этом Prestin-5 обладает положительным соотношением  $dF/dV$ , что является важным преимуществом для практического использования такого варианта флуоресцентного индикатора.

Для Prestin-5 была осуществлена экспрессия в первичной эмбриональной культуре нейронов мыши с целью оценки уровня флуоресцентного сигнала и характера экспрессии в модельной системе, релевантной для задач нейробиологии. Трансфекция конструкции Prestin-5 в первичной эмбриональной культуре нейронов мыши проходила методом нуклеофекции и имела эффективность 20%. Нейроны демонстрировали нормальную морфологию (Рис. 15), наблюдалась преимущественно мембранная локализация химерного белка с присутствием в соме и в отростках небольших агрегатов ФБ.



**Рисунок 15.** Конфокальное изображение, экспрессия Prestin-5 в первичной эмбриональной культуре нейронов мыши, девятый день после трансфекции.

Наблюдаемые результаты демонстрируют применимость ГКИМП Prestin-5 для задач, связанных с разрешением тонких деталей нейрональной структуры.

### 3. Заключение

В рамках настоящей работы реализован широкий спектр задач, с которыми сталкиваются исследователи при разработке ГКИМП. Мы осуществили генно-инженерную оптимизацию красного флуоресцентного белка FusionRed для использования его в роли репортерного домена генетически кодируемых индикаторов. На основе бимолекулярного варианта FR189-188-zip мы сконструировали индикатор мембранного потенциала VSD-FR189-188, сочетающий в себе функциональные домены в новой для ГКИМП топологической комбинации «insertion into cpFP». Оптимизация индикатора VSD-FR189-188 позволила достичь субмиллисекундной кинетики флуоресцентного ответа на сдвиг мембранного потенциала. При изучении роли длины и состава междоменного линкера в детерминировании характеристик ГКИМП нами был обнаружен ранее неизвестный путь смены полярности ( $dF/dV$ ) флуоресцентного ответа индикатора, что представляет интерес для разработки широкого круга молекулярных инструментов на основе ФБ. В данной работе мы впервые применили электроподвижный белок млекопитающих престин в роли нового потенциал-чувствительного домена ГКИМП, кинетические характеристики полученного индикатора Prestin-5 ставят его в один ряд с лучшими из существующих ГКИМП. По совокупности описанных характеристик полученных химерных молекул можно с уверенностью говорить о том, что электроподвижный белок престин принципиально пригоден для применения в качестве потенциал-чувствительного ядра ГКИМП.

#### 4. Выводы

1. Создано 23 пермутированных варианта красного флуоресцентного белка FusionRed. Созданы бимолекулярные варианты красного флуоресцентного белка с двумя вариантами точек разрыва в аминокислотной последовательности белка FusionRed: 76-73 и 189-188. По результатам тестирования при экспрессии модельных конструкций в эукариотической клеточной линии выявлено, что полученные бимолекулярные варианты способны образовывать зрелую флуоресцирующую форму и могут быть использованы в качестве репортерной части потенциал-чувствительного индикатора;
2. Разработан флуоресцентный индикатор VSD-FR189-188, реализующий новую для ГКИМП молекулярную архитектуру «insertion into cpFP»;
3. Проведена оптимизация длины междоменного полипептидного линкера индикатора VSD-FR189-188, которая привела к получению улучшенных ГКИМП с субмиллисекундной кинетикой флуоресцентного ответа;
4. Обнаружен феномен смены «полярности» ( $dF/dV$ ) ответа флуоресцентного индикатора мембранного потенциала семейства VSD-FR189-188 при изменении длины междоменного полипептидного линкера;
5. Впервые в качестве потенциал-чувствительного домена ГКИМП был использован электроподвижный белок млекопитающих престин. Создано и протестировано 18 вариантов конструкций химерных белков на основе престина и ФБ FusionRed в трех различных топологических комбинациях. Получен ГКИМП Prestin-5, обладающий высокими кинетическими характеристиками ( $\tau_{on} = 0.57$  мс,  $\tau_{off} = 1.50$  мс), но сравнительно узким динамическим диапазоном (1.23%  $\Delta F/F$  на 100мВ).



## 5. Список работ, опубликованных по теме исследования

### 5.1. Статьи

1. Кост Л.А., Путинцева Е. В., Переверзева А. Р., Чудаков Д. М., Лукьянов К. А., Богданов А. М. 2016. «Бимолекулярная флуоресцентная комплементация на основе красного флуоресцентного белка Fusion Red» *Биоорганическая химия*, том 42 (6), 683–688, doi:10.7868/S0132342316060051. Англоязычная версия: doi:10.1134/S1068162016060054.
2. Kost L.A., Nikitin E.S., Ivanova V.O., Sung U., Putintseva E.V., Chudakov D.M., Balaban P.M., Lukyanov K.A., and Bogdanov A.M. 2017. «Insertion of the Voltage-Sensitive Domain into Circularly Permuted Red Fluorescent Protein as a Design for Genetically Encoded Voltage Sensor» *PLoS ONE* 12 (9). doi: 10.1371/journal.pone.0184225.
3. Kost L.A., Ivanova V.O., Balaban P.M., Lukyanov K.A., Nikitin E.S., and Bogdanov A.M. 2019. «Red Fluorescent Genetically Encoded Voltage Indicators with Millisecond Responsiveness» *Sensors* 19 (13): 2982. doi:10.3390/s19132982.
4. Muslinkina L., Pletnev V.Z., Pletneva N.V., Ruchkin D.A., Kolesov D.V., Bogdanov A.M., Kost L.A., Rakitina, T.V., Agapova Y.K., Shemyakina I.I., Chudakov D.M., Pletnev S. 2020. «Two Independent Routes of Post-Translational Chemistry in Fluorescent Protein FusionRed» *International Journal of Biological Macromolecules* 155 (July): 551–59. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.244.

### 4.2. Тезисы конференций

1. Ivanova V.O., Kost L.A., Povarova N.V., Nikitin E.S., Bogdanov A.M. «Amino acid linkers optimization for the FusionRed-based voltage sensor enhancement» *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 2018, pp.79-80;
2. Kost L.A., Ivanova V.O., Ruchkin D.A., Kolesov D.V., Pletneva N.V., Lukyanov K.A., Nikitin E.S., Bogdanov A.M. Towards the improvement of red voltage sensor. 11th Euro Biosensors&Bioelectronics Congress, Italy, Rome, October 23-24, 2019;
3. Кост Л.А., Богданов А.М., Лукьянов К.А. «Индикаторы мембранного потенциала. Разработка и оптимизация». В книге: Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии. Сборник тезисов XXXII Зимней молодежной научной школы. 2020. С. 16;
4. Кост Л.А. «Флуоресцентные индикаторы мембранного потенциала» Сборник тезисов XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых Перспективы развития фундаментальных наук» Россия, Томск, 2021.