

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Ермакова Юлия Геннадьевна

Новые оптогенетические технологии в активации и визуализации процессов в нейронных сетях.

специальность – 03-01-03 – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Профессор РАН
Белоусов Всеволод Вадимович

Москва 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	5
1.Обзор литературы	7
1.1. Пероксид водорода в живых клетках	7
1.2. Детекция активных форм кислорода <i>in vivo</i>	11
1.3. Структура и биохимические свойства флуоресцентных белков	13
1.3.1. Структура флуоресцентных белков.....	13
1.3.2. Хромофор	15
1.3.3. Яркость флуоресцентных белков	16
1.3.4. Фотостабильность флуоресцентных белков	17
1.3.5. pH-стабильность флуоресцентных белков и их производных	17
1.3.6. Красные DsRed-подобные флуоресцентные белки.....	18
1.4. Генетически кодируемые биосенсоры.....	19
1.4.1. Первые флуоресцентные сенсоры на основе пермутированных флуоресцентных белков	20
1.4.2.Транскрипционный фактор <i>Escherichia coli</i> OxyR.....	22
1.4.3. Генетически кодируемый высокоспецифичный сенсор для детекции пероксида водорода HyPer	23
1.5. Методы стимуляции нейронных сетей	27
1.5.1.Хемогенетика	27
1.5.2. Оптогенетика	29
1.5.3. Термогенетика	37
Цели и задачи	44
2.МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	46
2.1 Оборудование	46
2.2. Материалы	46
2.2.1. ДНК-Вектора.....	46
2.2.2. Реактивы и расходные материалы для клонирования	46
2.2.3. Программное обеспечение	48
2.3. Молекулярно-биологические методы	49
2.3.1. Амплификация фрагментов ДНК.....	49
2.3.2. Электрофорез в агарозном геле.....	49
2.3.3. Выделение ДНК из геля	50
2.3.4. Рестрикция	50
2.3.5. Переосаждение ДНК этанолом	50

2.3.6. Лигирование	50
2.3.7. Выделение плазмидной ДНК	51
2.4 Работа с бактериальными клетками	51
2.4.1. Трансформация бактериальных клеток	51
2.4.2. Скрининг колоний бактериальных колоний при помощи опрыскивания раствором пероксида водорода	52
2.4.3. Анализ суспензий бактериальных клеток с помощью флуоресцентного спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse	52
2.4.4. Отбор оптимальных клонов из библиотек.....	52
2.5. Работа с выделенным белком.....	53
2.5.1. Выделение белка из культуры клеток <i>E.coli</i>	53
2.5.2. Анализ спектральных характеристик белка <i>in vitro</i>	53
2.5.3. Анализ pH-чувствительности выделенного белка.....	54
2.6. Работа с эукариотическими культурами клеток	54
2.6.1. Культивирование и трансфекция клеточных линий HeLa и HEK293	54
2.6.2. Выделение и трансфекция первичной эмбриональной культуры кортикальных нейронов	55
2.6.3. Трансфекция клеток	55
2.7. Разведение и трансфекция <i>Danio rerio</i>.....	56
2.8. Флуоресцентная микроскопия	57
2.8.1 Микроскопия клеточных культур.....	57
2.8.2. Физиологическая стимуляция клеток HeLa Kyoto и HEK293	57
2.8.3. Термогенетическая активация и термометрия клеточных культур.....	58
2.8.4. Химическая и тепловая стимуляция клеток HEK293	60
2.8.5. Определение кинетических параметров работы сенсоров	61
2.8.6 Иммунофлуоресцентное окрашивание.....	61
2.9. Электрофизиологическая регистрация активности нервных клеток	62
2.10. Стимуляция поведения избегания у личинок <i>Danio rerio</i>	62
2.11. Анализ данных и статистика	64
3. Результаты и обсуждение	65
3.1. Красный генетически-кодируемый сенсор для детекции пероксида водорода	65
3.1.1. Создание HyPerRed.....	66
3.1.2. Характеристика HyPerRed	67
3.1.3. Изучение HyPerRed в культуре эукариотических клеток	71
3.1.4. HyPerRed детектирует низкие концентрации H ₂ O ₂ , продуцируемые клетками при стимуляции ростовым фактором	72

3.1.5. Изучение динамики H ₂ O ₂ и GSH/GSSG в различных клеточных компартментах на уровне одной клетки.....	74
3.2. Термогенетика.....	79
3.2.1 Выбор флуоресцентной метки для термоактивируемых каналов TRPA1	81
3.2.2. Тестирование TRPA1 в культуре эукариотических клеток HEK293.....	84
3.2.3. Выбор температурных условий экспрессии TRPA1	85
3.2.4. Выбор длины волны активирующего света	87
3.2.5. Определение параметров работы TRPA1 в клетках HEK293 при активации ИК излучением	89
3.2.6. Определение кинетических характеристик работы термоактивируемых каналов TRPA1	91
3.2.7. Термогенетическая активация нейронов мыши в культуре.....	93
3.2.8. Термогенетическая стимуляция личинок <i>Danio rerio in vivo</i>	104
ВЫВОДЫ	111
заключение	112
список сокращений	114
список литературы.....	117
Приложение 1	133

ВВЕДЕНИЕ

Синтетическая биология представляет собой область исследований, в которой принципы генной инженерии используются для создания живых систем с заданными свойствами. Одним из центральных принципов синтетической биологии является создание нового свойства системы за счет переноса в неё генов эволюционно-далекого организма или химерных белков. Этот подход позволил разработать широкую панель молекулярных методов стимуляции и визуализации процессов *in vivo*.

Генетически-кодируемые сенсоры являются одним из популярных способов детекции различных внутриклеточных лигандов, таких как пероксид водорода (H_2O_2), ионы кальция (Ca^{2+}), фосфорилированные производные глюкозы, инсулин, соотношения АТФ/АДФ, НАД⁺/НАДН, окисленного и восстановленного глутатиона (GSSG/GSH), а также активность ферментов, таких как каспазы, киназы и фосфорилазы. Но подавляющее большинство существующих сенсоров обладают спектральными свойствами зеленых или желтых флуоресцентных белков, что делает зачастую невозможным совместное использование нескольких сенсоров в одном эксперименте. Поскольку для детекции метаболических и сигнальных процессов в живых объектах имеет большое значение локализация сигнала, распределение которого может зависеть от индивидуальных особенностей объекта, создание новых и расширение панели существующих сенсоров позволит проводить совместную, многопараметрическую микроскопию нескольких сигналов в одном образце.

Кислород является не только главным акцептором электронов в метаболических путях аэробных организмов, но и важной регуляторной молекулой. Продукты неполного восстановления молекулярного кислорода в эукариотических клетках называются активными формами кислорода (АФК). Долгое время считалось, что АФК являются только побочными продуктами аэробного дыхания клеток, но сегодня всё больше и больше данных свидетельствуют о том, что многие процессы в клетках регулируются кислородом не непосредственно, а через его активные формы. АФК синтезируются в клетке как спонтанно, в результате утечки электронов в дыхательных цепях, так и направленно, в результате функционирования специализированных ферментативных систем. Ввиду крайне высокой реакционной способности АФК, их синтез и распространение строго контролируется клеткой. Наиболее стабильной формой АФК является пероксид водорода, играющий роль вторичного посредника передачи сигнала во множестве физиологических и патогенных процессах, таких как регуляция работы клеточных ферментов, внутриклеточной передаче сигнала, ре-

гуляции просвета сосудов, развитие ишемической болезни сердца и т.д. Это делает концентрацию и локализацию продукции пероксида водорода значимым параметром в медицинских и научных исследованиях.

HuPer является первым флуоресцентным генетически кодируемым сенсором, который позволяет детектировать динамику внутриклеточного H_2O_2 на уровне живого организма, клетки или отдельного клеточного компартмента. Реакция HuPer с H_2O_2 является обратимой и специфичной.

В первой части работы речь пойдет о модификации сенсора HuPer для детекции пероксида водорода с целью создания его версии, обладающей спектральными характеристиками красных флуоресцентных белков. Создание данного сенсора позволит расширить возможности многопараметрической микроскопии сигнальных окислительно-восстановительных процессов в клетках.

Для изучения различных объектов биологии, таких как живые клетки, срезы мозга, животные *in vivo* не менее важно развитие методов стимуляции процессов в живых системах, т.к. они позволяют создавать регулируемые модели различных видов поведения, стимуляции различных видов передачи сигнала, метаболических процессов и паталогических процессов.

Существует множество подходов к регуляции клеточной активности с помощью различных химических соединений и белков. Многие белки, используемые для регуляции клеточных функций, представляют собой рецепторы, помпы и ионные каналы. Физическая природа активации выбранного белка определяет не только метод, используемый для его стимуляции в модели, но и ограничения определенного подхода. Так химическая стимуляция рецепторов с помощью введения метаболитных активаторов ограничена диффузией и зачастую приводит к медленной и пролонгированной активации выбранных рецепторов, активация видимым светом связана с ограничениями по доставке излучения и поглощением тканей, а также сложностями использования близких по спектру возбуждения белков. Один из векторов развития технологий стимуляции клеток является создание систем быстрой стимуляции с помощью наиболее эффективно проникающих в ткани видов излучения и магнитных полей, которые могут быть разработаны на базе технологий термогенетики.

Термогенетика представляет собой набор методов, направленных на стимуляцию или ингибирование клеток с помощью колебаний температуры образца.

Вторая часть данной работы посвящена развитию и оптимизации технологии термогенетики на базе термочувствительных рецепторов змей TRPA1 и активации с помощью инфракрасного (ИК) лазерного излучения.

1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Пероксид водорода в живых клетках

Пероксид водорода относится к группе активных форм кислорода (АФК), химически активных молекул, образующихся при неполном восстановлении молекулярного кислорода [1]. К ним относятся супероксид анион радикал (O_2^-), гидроксил радикал ($OH\cdot$) и пероксид водорода (H_2O_2) [2]. Пероксид водорода является единственной незаряженной формой АФК и обладает наибольшим периодом полураспада среди АФК в живых клетках. Долгое время пероксид водорода рассматривали только как побочный продукт функционирования дыхательной цепи аэробных организмов, токсичное вещество, ответственное за возникновение окислительного стресса [3, 4].

Клетки способны регулировать уровень АФК благодаря ферментам антиоксидантной защиты. Один из них, супероксид-дисмутаза (SOD), катализирует реакцию превращения супероксид аниона радикала в пероксид водорода, который, в свою очередь, под действием двух других ферментов – каталазы и глутатионпероксидазы (GPX), – превращается в молекулу воды и окисленный глутатион [5]. Наличие таких систем контроля продукции АФК способствует поддержанию окислительно-восстановительного статуса клетки. Было показано, что при возникновении таких патологий, как ишемическая болезнь сердца, инфаркт миокарда, инсульт головного мозга, наблюдается повышение уровня АФК в тканях и клетках [5, 6].

Лишь в конце 90-х годов 20 века появились первые данные о том, что пероксид водорода контролируемо продуцируется практически во всех эукариотических клетках и в низких концентрациях принимает участие в нормальных физиологических ответах, таких как пролиферация, миграция, дифференциация, апоптоз и является компонентом системы окислительно-восстановительной системы передачи сигнала [4].

В индуцируемой продукции пероксида водорода главную роль играют ферменты класса НАДФН-оксидаз (Nox). Nox представляют собой мультисубъединичные ферментативные системы, локализованные в различных мембранах которые переносят электроны через клеточные мембраны, восстанавливая при этом молекулярный кислород до супероксид анион радикала и пероксида водорода (рисунок 1).

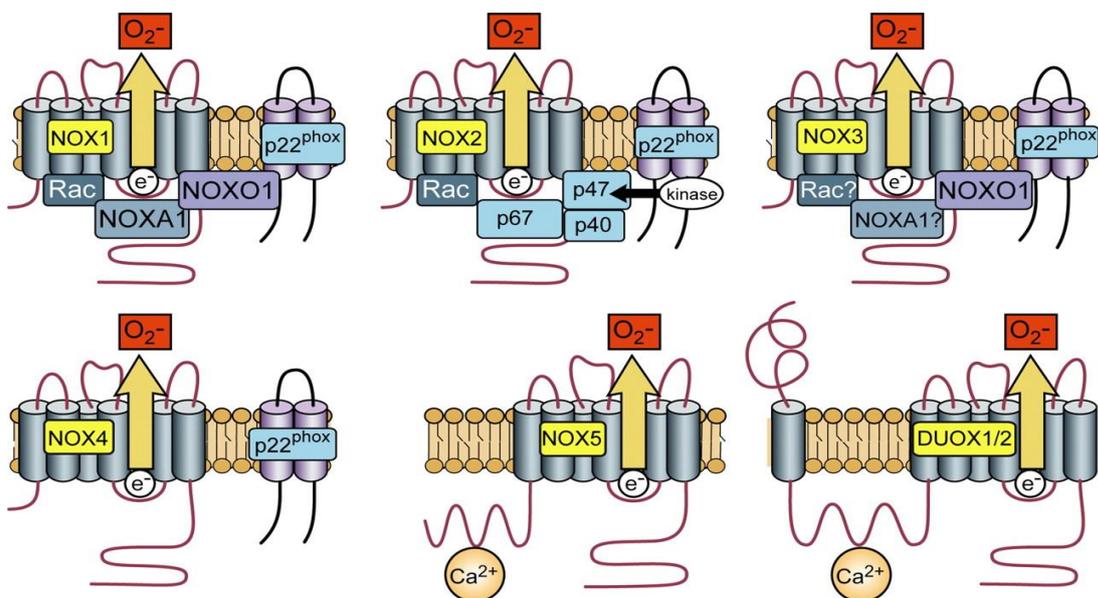


Рисунок 1. Схема строения ферментов Nox. Указана каталитическая субъединица, мембранная и цитоплазматические компоненты. NADPH связывается на цитоплазматической стороне комплекса, а выделение аниона супероксида происходит во внешнюю среду. Приведено из [8] с изменениями.

Каталитические субъединицы всех НАДФН-оксидаз обладают шестью трансмембранными доменами и содержат два кофактора – гем в мембранной части и один флаavin с цитоплазматической стороны. НАДФН-оксидазы найдены только в эукариотических клетках, хотя у прокариот известны схожие по строению и функции белки [7]. Первичной функцией этих ферментных комплексов считается продукция АФК. Продуктом работы Nox является супероксид анион, который в результате спонтанной или ферментативной реакции дисмутации превращается в пероксид водорода. Первыми были изучены фагосомальные Nox, относящиеся к подгруппе Nox2 [8, 9].

Фагосомальные НАДФН-оксидазы включают в себя растворимые цитозольные белки p47, p67 и G-белок семейства Rac1, функционирующий как гуанозинтрифосфатаза, а также мембранные белки p22 и gp91Phox. Последний является каталитическим центром комплекса [5]. Nox осуществляют перенос электронов от клеточного НАДФН через мембрану, и образует супероксид анион радикал, дисмутирующий до H_2O_2 . Согласно наиболее распространенной гипотезе, первичное разрушение клеток патогенов в фагосомах происходит в том числе из-за окисления их компонентов активными формами кислорода [10].

В дальнейшем НАДФН-оксидазы были открыты в большинстве типов нефагоцитирующих клеток, где была показана их сигнальная функция [4]. К настоящему времени в клетках млекопитающих обнаружены семь изоформ НАДФН-оксидаз: Nox1-5, DUOX1 и

DUOX2, являющиеся компонентами сигнальных каскадов, активируемых цитокинами, инсулином, эпидермальным ростовым фактором (EGF), тромбоцитарным фактором роста (PDGF), фактором некроза опухоли альфа (TNF- α) и интерлейкином-1 (IL-1) [11-14].

Например, связывание тромбоцитарного ростового фактора с рецептором на поверхности фибробластов вызывает активацию тирозинкиназного домена рецептора, который фосфорилирует фосфатидилинозитол-3-киназу (PI3K), активируя её (рисунок 2). PI3K превращает фосфатидилинозитолдифосфат (PIP₂) в фосфатидилинозитолтрисфосфат (PIP₃). PIP₃ взаимодействует с Rac1, стимулируя обмен GDP на GTP, что приводит к активации Rac1. Активация Rac1 приводит к активации комплекса НАДФН-оксидазы и продукции H₂O₂, который функционирует как внутриклеточная сигнальная молекула и повышает уровень фосфорилирования по остаткам тирозина некоторых белков, окисляя тиолат-анион в активном центре тирозин-фосфатаз (рисунок 2) [4, 13]. Таким образом, перексид водорода задействован в регуляции активности сигнальных киназно-фосфатазных каскадов в самых разных типах клеток и тканей. Изучение именно сигнальных функций таких низкомолекулярных соединений, как пероксид водорода, представляет особенный интерес. Однако для исследования участия низкомолекулярных вторичных посредников в сигнальных процессах важно изучать их динамику и локализацию *in vivo*.

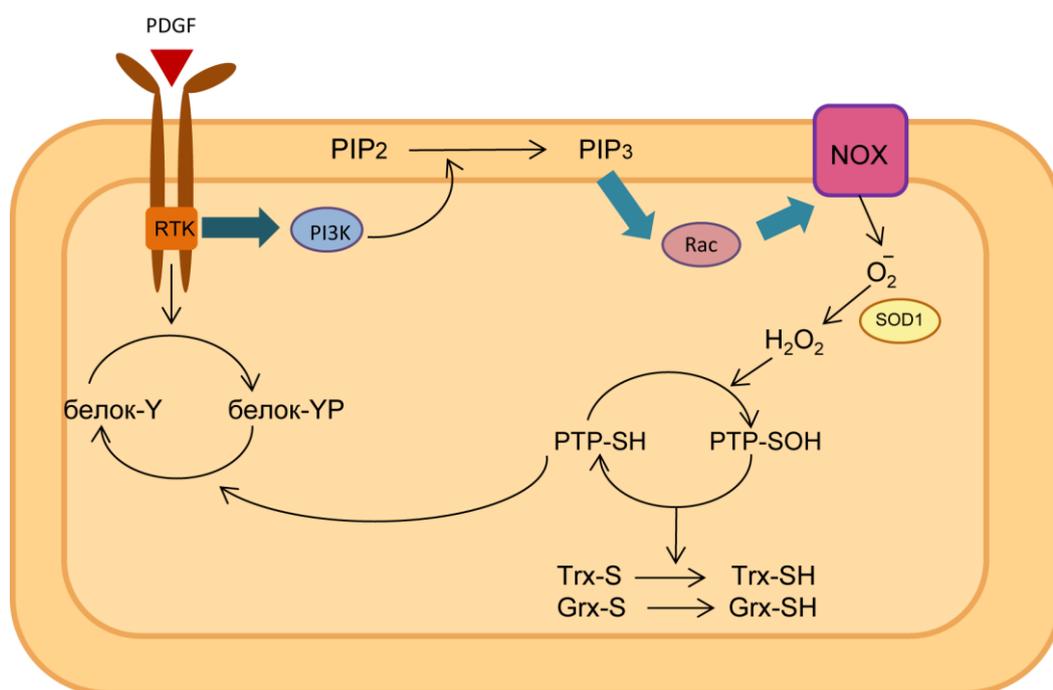


Рисунок 2. Схема PDGF-зависимой продукции H₂O₂ и её влияния на активность тирозин-фосфатаз. PDGF - тромбоцитарный фактор роста, RTK – рецепторная тирозин-киназа, PI3K - фосфатидилинозитол-3-киназа, PTP - тирозин-фосфатаза, Grx – глуторедоксин, NOX – НАДФН-оксидаза, SOD - супероксиддисмутаза, Trx – теоредоксин. Переведено из [13] с изменениями.

Также в 2012 году была показана сигнальная роль пероксида в репарации поврежденных у эмбрионов *Danio rerio* [15]. Пероксид водорода является одним из наиболее быстро генерирующихся после повреждения хемоаттрактантов, привлекающих к зоне повреждения нейтрофилы [16]. Нейтрофилы движутся по направлению градиента пероксида водорода, анализируя концентрацию этого аттрактанта с помощью каскада LYN Src-киназ. В нейтрофилах экспрессируется участвующий в распаде пероксида водорода фермент миелопероксидаза, способствующий снижению концентрации пероксида водорода. Таким образом нейтрофилы не только обладают хемотаксисом по отношению к градиенту пероксида водорода, но также способны регулировать интенсивность этого сигнала [17]. А миелопероксидаза, генерирующая активные производные хлора для инактивации патогенов, на уровне ткани работает как антиоксидант.

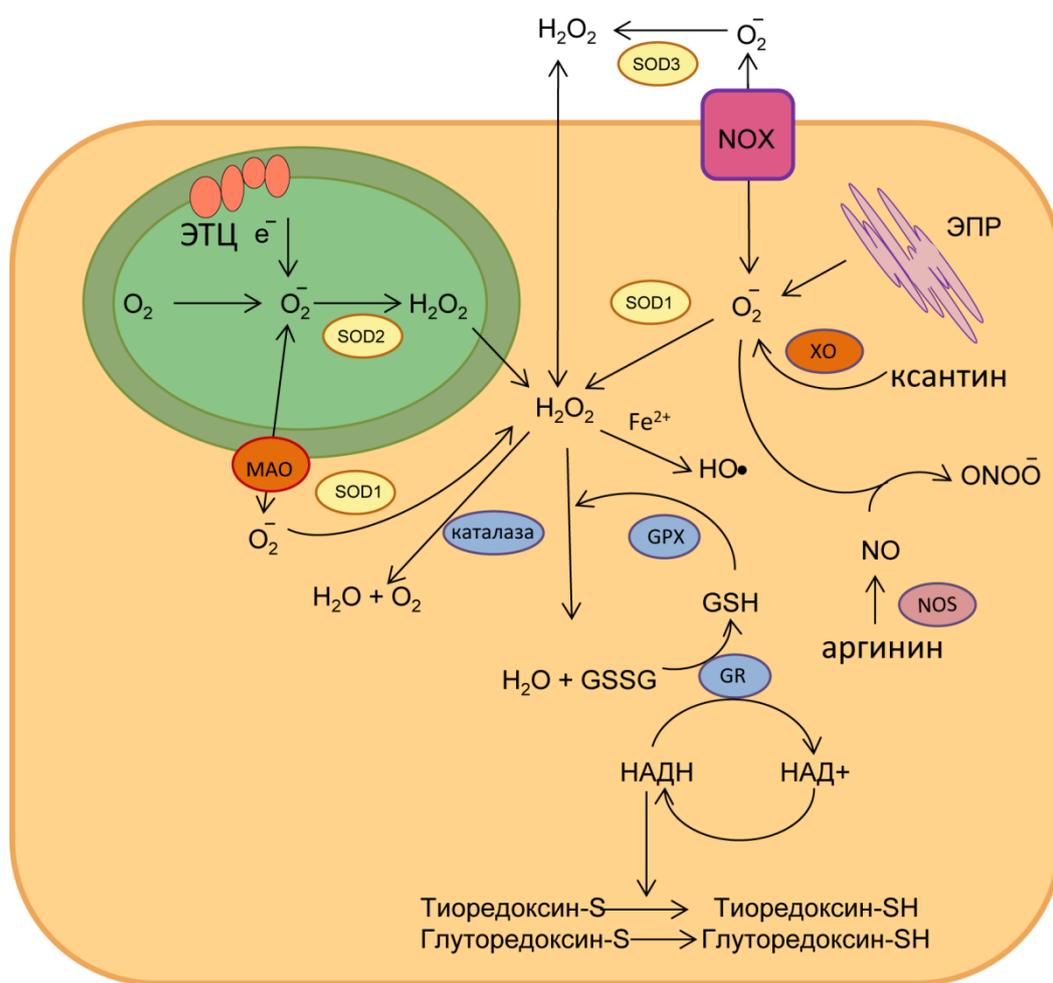


Рисунок 3. Продукция и превращения активных форм кислорода в клетке. Указаны основные участники продукции и превращений активных форм кислорода, включая ферменты антиоксидантной системы клетки. ЭТЦ-электронтранспортная цепь. GPX - глутатионпероксидаза, GR - глутатионредуктаза, Grx – глутаредоксин, GSH, GSSG - восстановленный и окисленный глутатион, MAO - моноаминоксидаза, NOS – NO-синтаза, NOX – НАДФН-окисдаза, SOD - супероксиддисмутаза, Trx – теоредоксин, XO- ксантиноксидаза.

Одним из главных источников АФК в живых клетках являются митохондрии (рисунок 3). Продукция активных форм кислорода в митохондриях неразрывно связана с процессами окислительного фосфорилирования. В нескольких участках в дыхательной цепи электроны могут напрямую взаимодействовать с кислородом с образованием свободных радикалов [18]. Продукции активных форм кислорода в митохондриях приписывают возрастные повреждения ДНК, причём митохондриальная ДНК более подвержена окислительным повреждениям, чем ядерная ДНК [19]. Для защиты клеточных и митохондриальных структур от супероксида, в митохондриях экспрессируются супероксиддисмутаза SOD2.

Также было показано, что в мозге именно митохондриальные АФК увеличивают эффективность GABA-опосредованной передачи сигнала в клетках мозжечка путём увеличения концентрации GABA-рецепторов на постсинаптическом окончании за счёт передислокации каналов, обладающих определённой субъединицей, которая подавлялась ингибитором комплекса III антимицином А [20].

Другой источник АФК в митохондриальном компартменте - фермент моноаминоксидаза (МАО) - располагается на внешней мембране митохондрий и осуществляет окислительное дезаминирование моноаминов, таких как дофамин, адреналин, серотонин и др., с выделением пероксида водорода, что подчеркивает значение МАО в нервной системе, где её экспрессия обнаруживается в нейронах и глиальных клетках [21, 22].

1.2. Детекция активных форм кислорода *in vivo*

Сложность изучения локализации и динамики эндогенных АФК заключается в том, что они содержатся в клетках низких концентрациях (10-900 нМ для пероксида водорода)[23], а также быстро уничтожаются системами антиоксидантной защиты. На данный момент существует несколько подходов к детекции АФК и, в частности, пероксида водорода, *in vivo*.

Первый подход состоит в определении активности клеточных ферментов, ингибируемых АФК. В активном центре аконитазы, фермента цикла трикарбоновых кислот, катализирующего превращение цитрата в изоцитрат, находится легко окисляющийся 4Fe-4S кластер [24]. Пероксид водорода вызывает окисление и разрушение активного центра как митохондриальной, так и цитоплазматической формы аконитазы (34,49), активность которых затем восстанавливается в клетке путём введения в 4Fe-4S кластер иона двухвалентного железа. Таким образом, определение соотношения активной и неактивной форм аконитазы может служить чувствительным и обратимым способом детекции АФК. К недостаткам

этого способа можно отнести сложность детекции активности аконитазы, а также невозможность различать такие окислители как пероксид водорода, радикальные производные оксида азота и супероксид анион [25].

Второй подход состоит в использовании люминесцентных красителей различной химической природы, к которым относятся люминол, дихлорфлуоресцин, AmplexRed, PeroxyGreen и его производные.

Люминол. Этот люминесцентный краситель не способен проникать внутрь клеток, обладает широким спектром чувствительности к окислителям: люминол окисляется пероксидом водорода, супероксид анионом, перхлоратами, оксидом азота и активными формами азота [26].

Дихлорфлуоресцин (DCF), способный проникать внутрь клеток, который флуоресцирует после окисления активными формами кислорода. Метод использования DCF также обладает рядом существенных недостатков: неспецифичность по отношению к различным АФК, возможность окисления активными производными азота, свободная диффузия красителя в клетке и, как следствие, невозможность работы на уровне отдельных клеточных органелл. Но главным недостатком DCF является генерация им АФК под воздействием света, что приводит к неспецифической амплификации сигнала и цитотоксическому эффекту [26].

AmplexRed (10-ацетил-3,7-дигидроксифеноксазин), после взаимодействия с H_2O_2 в пероксидазной реакции превращается в красный флуоресцентный продукт резорурфин. AmplexRed характеризуется специфичностью и высокой чувствительностью к пероксиду водорода, а также стабильностью и низким уровнем фонового сигнала, но этот агент не способен проникать внутрь живых клеток, а после взаимодействия с H_2O_2 окисляется необратимо, также имеет место интерференция флуоресценции с продуктами разрушения НАДФН при гибели клеток [27].

PeroxyGreen и **PeroxyCrimson (PG1 и PC1)**, также высокочувствительны к пероксиду водорода и способны проникать в клетки. Спектр возбуждения и эмиссии флуоресценции красителей PG1 и PC1 находится в видимом диапазоне длин волн, эти красители малотоксичны для клеток и обладают высокой специфичностью к H_2O_2 среди различных форм АФК [28]. На основе PeroxyGreen были разработаны арилборонатные красители **SNAP PeroxyGreen 1 и 2**, локализацию которых в клетке можно регулировать путём модификации этими красителями клеточных белков без нарушения их функции. Однако они не способны дискриминировать H_2O_2 и пероксинитрит и являются необратимыми красителями [29, 30].

Учитывая недостатки перечисленных методов, разработка новых подходов, позволяющих изучать локализацию и динамику АФК в живых клетках, является перспективным

направлением молекулярной биологии, и следующим этапом развития способов детекции пероксида водорода *in vivo* стали генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры, к которым относятся Orp1-roGFP2 и HyPer [31-34].

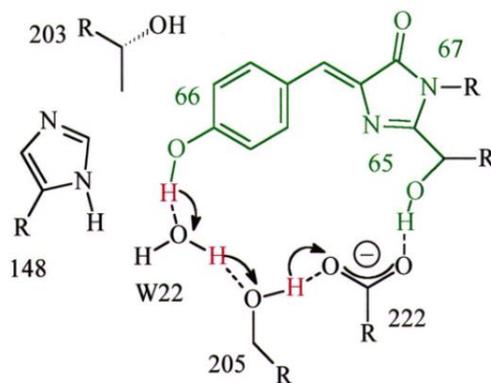
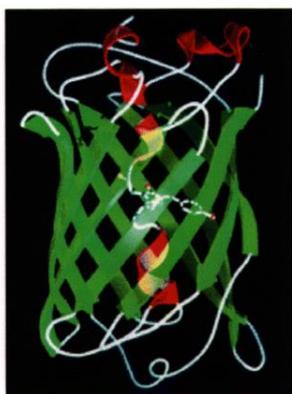
Биосенсор HyPer представляет собой химерный флуоресцентный белок, состоящий из регуляторного домена бактериального транскрипционного фактора OxyR, реагирующего с пероксидом водорода, и интегрированного в пептидную цепь OxyR варианта желтого флуоресцентного белка [31].

1.3. Структура и биохимические свойства флуоресцентных белков

Открытие зеленого флуоресцентного белка (GFP), впервые выделенного из медузы *Aequorea victoria*, и последовавшее получение рекомбинантных форм GFP, позволили создать абсолютно новый подход к изучению отдельных молекул, клеточных структур, а также самих клеток *in vivo* [35, 36]. К настоящему времени методами генной инженерии получено огромное количество GFP-подобных белков, отличающихся от белков дикого типа спектральными свойствами (интенсивностью и формой спектра возбуждения и эмиссии флуоресценции), стабильностью, временем созревания хромофора, величиной квантового выхода, способностью к олигомеризации. Кроме того, некоторые флуоресцентные белки, обладающие схожими свойствами, были выделены из организмов, относящихся к другим филогенетическим типам [35, 36].

1.3.1. Структура флуоресцентных белков

Главными преимуществами флуоресцентных белков для применения их в исследованиях *in vivo* являются их низкая токсичность, автокаталитическая реакция образования хромофора, и возможность варьировать локализацию белка на уровне клетки или организма. Флуоресцентные белки и хромобелки семейства GFP состоят из 220-240 а.о., молекулярная



масса этих белков составляет в среднем 24-25 кДа.

Рисунок 4. Пространственная структура и строение хромофора GFP. Указаны аминокислотные остатки, принимающие участие в протонировании/депротонировании хромофора.

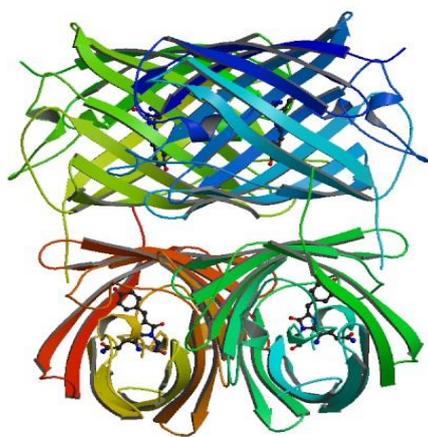
Приведено из [37].

Третичная структура молекулы GFP представляет собой β -бочонок, состоящий из 11 β -тяжей и 10 петель, соединяющих эти слои (рисунок 4). Полость бочонка пересекает α -спираль, несущая хромофор [36, 38].

Различные флуоресцентные белки в той или иной степени склонны к олигомеризации. В некоторых случаях это свойство является положительным, т.к. оно усиливает эффективность FRET [39], но в большинстве случаев оно затрудняет использование флуоресцентных белков.

Олигомеризация флуоресцентных частей химерных белков приводит к нарушению их функций и затруднениям в изучении их работы, более того, использование химерных конструкций на основе собственно олигомерных белков с олигомеризующимися флуоресцентными белками может привести к образованию плотных агрегатов [40-42]. Такие агрегаты могут быть токсичны для живых клеток, что препятствует получению стабильных линий эукариотических клеток и животных. Ярким примером токсичности подобных агрегатов является белок copGFP (ppluGFP), который образует в клетках эукариот похожие на иглы кристаллы, вызывающие её гибель в течение нескольких часов [43].

Белок *Aequera victoria* GFP в физиологических для медузы *Aequera victoria* концентрациях формирует димеры [44], большинство синтетических флуоресцентных белков, полученных из методом ненаправленного мутагенеза и обладающих отличными от исходного белка спектральными свойствами, являются мономерами [45-47]. Некоторые флуоресцентные белки, такие как GFP из *Renilla areantois* [48-50] и phiYFP из *Pialidium sp.*



[49], существуют преимущественно в виде димеров уже начиная с концентрации порядка 10 нМ.

Рисунок 5. Структура тетрамера DsRed. Полипептидные цепи мономеров показаны разными цветами [51].

Существование тетрамеров флуоресцентных белков было впервые обнаружено при исследовании кристаллов белка DsRed из *Discosoma sp* [52, 53]. Каждый мономер DsRed контактирует с двумя соседними мономерами при помощи гидрофобных остатков фенилаланина, триптофана и изолейцина, собранных

в компактных гидрофобных кластерах на поверхности β -тяжей, и окруженных остатками полярных аминокислот. Дополнительную стабилизацию тетрамера обеспечивают контакты С-концевых а.о. (так называемые “DsRFP-clasps”). Олигомеризация красных природных флуоресцентных белков существенно затрудняет их использование. По данным кристаллографии путем направленного мутагенеза кластеров олигомеризации были созданы димерные красные флуоресцентные белки [43, 54-56], а в последствии и преимущественно мономерные флуоресцентные белки [57, 58].

На сегодняшний день среди красных флуоресцентных белков наименьшей степенью олигомеризации характеризуются красные белки FusionRed[59], mScarlet[60] и зеленые белки mClover3[61], mNeonGreen[62], представляющие собой практически полностью мономерную фракцию.

1.3.2. Хромофор

Хромофор образуется в результате автокаталитической реакции циклизации из аминокислотных остатков α -спирали Ser65-Tyr66-Gly67. У различных представителей семейства GFP может варьировать остаток 65, но у всех природных флуоресцентных белков позиции Tyr66 и Gly67 ультраконсервативны [63, 64]. Внутренняя структура молекулы флуоресцентного белка катализирует протекание специфических реакций циклизации трипептида хромофора (т.н. созревание хромофора).

Первая стадия созревания хромофора GFP представляет собой циклизацию между Ser65 и Gly67 и последующую дегидратацию с образованием структуры, напоминающей имидазольное кольцо. Вторая, более длительная стадия, заключается в окислении Tyr66 кислородом воздуха [65].

На спектральные свойства флуоресцентных белков существенное влияние оказывают нековалентные взаимодействия между хромофором и боковыми радикалами аминокислотных остатков, создающих микроокружение хромофора. Например, равновесие между диссоциацией и протонированием окисленного Tyr66 в составе хромофора, в большой степени определяется его микроокружением [38].

Спектр возбуждения GFP имеет два пика возбуждения с максимумами 398 нм и 477 нм, и спектр эмиссии флуоресценции с максимумом 500 нм. Зависимость спектра флуоресценции от длины волны возбуждения свидетельствует о том, что существует, по меньшей мере две химически различающиеся формы хромофора (рисунок 6), но равновесие между этими формами не успевает восстановиться за время жизни молекулы в возбужденном состоянии [36, 66].

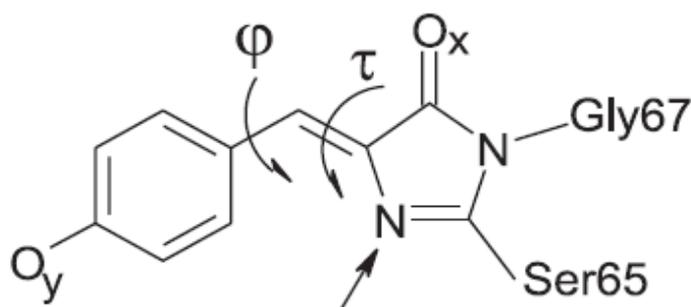


Рисунок 6. Структура хромофора GFP. *O_х, O_у, N* - возможные сайты протонирования; *φ* и *τ* - двугранные углы, которые могут изменяться в возбужденном состоянии .

Поглощение в области 475 нм обусловлено депротонированной

формой хромофора, а поглощение в области 398 нм - протонированной [66]. У всех GFP-подобных белков протонированная форма хромофора подвергается депротонированию после перехода в возбужденное состояние (так называемый ESPT, excited state proton transfer): сразу после поглощения кванта возбуждающего света один из двух протонов хромофора диссоциирует с высвобождением части поглощенной энергии. Этот эффект был использован для создания на основе GFP белков с большим Стоксовским смещением, которые имеют один пик возбуждения флуоресценции в области 400 нм, и один пик эмиссии флуоресценции в области 500 нм [67, 68].

1.3.3. Яркость флуоресцентных белков

Чувствительность и динамический диапазон любого метода детекции флуоресценции зависит от яркости используемого флуоресцентного белка. Чем ярче флуоресцентный белок, тем меньше он требует квантов возбуждающего света для достижения максимального уровня сигнала, и тем меньше возможный фототоксический эффект использования этого белка. Также использование яркого флуоресцентного белка или его производных позволяет использовать его в очень низких концентрациях, что снижает вмешательство в естественные процессы, протекающие в живых системах. Яркость флуоресцентного белка определяется двумя параметрами – квантовым выходом флуоресценции и молярным коэффициентом экстинкции.

Интегрально наиболее яркими флуоресцентными белками на сегодняшний день являются зелёные и желтые флуоресцентные белки (эмиссия в области 500-530 нм), наименее яркими – голубые флуоресцентные белки (эмиссия в области 420-460 нм) [51]. Также использование голубых флуоресцентных белков не является предпочтительным *in vivo*, т.к. свет с длиной волны 375-405 нм плохо проникает в толстые слои ткани, а также имеет наибольшее повреждающее действие на живые организмы.

Среди индивидуальных белков позицию наиболее яркого флуоресцентного белка на сегодняшний день занимает красный тандемный белок tdTomato, в составе которого два

мономера предсуществующего белка mTomato объединены в одну полипептидную цепь, а наиболее яркого зеленого представителя – mNeonGreen.

1.3.4. Фотостабильность флуоресцентных белков

Фотостабильность флуоресцентных белков является ключевым фактором для их использования в длительных сериях экспериментов, а также в использовании методов, основанных на FRET. Хромофор флуоресцентного белка защищен белковой «оболочкой» из β -листов от взаимодействия с окружающей средой, что определяет их относительно высокую фотостабильность и низкую фототоксичность. В течение эксперимента на фотостабильность используемого флуоресцентного белка влияют интенсивность света возбуждающего лазера, интервалы между облучением возбуждающим светом а также длина волны возбуждающего света. Для оценки фотостабильности флуоресцентных белков, обладающих сходными спектральными свойствами, используют их полувремя их фотовыцветания при одинаковой интенсивности возбуждающего света. Для сравнения фотостабильности белков, обладающих различными спектральными свойствами, также используют полувремя фотовыцветания из расчёта на 1000 фотонов на одну молекулу флуоресцентного белка [51]. На фотостабильность флуоресцентного белка также оказывают влияние физиологическое состояние клетки, локализация флуоресцентного белка и состав среды, в которой культивируются изучаемые клетки [69].

Особый интерес представляет так называемая фотоконверсия флуоресценции. Она представляет собой процесс изменения структуры хромофора флуоресцентного белка в результате интенсивного облучения. Фотоконверсия известна для многих природных и синтетических флуоресцентных белков – green-to-red для EGFP [70], фотоконверсия red-to-green для белка Orange и красных флуоресцентных белков [71], которая также может быть вызвана двух-фотонным возбуждением флуоресценции этих белков, а также yellow-to-cyan для жёлтых флуоресцентных белков [3].

1.3.5. pH-стабильность флуоресцентных белков и их производных

Ключевым параметром для оценки pH-стабильности флуоресценции GFP-подобных белков является pK_a – значение pH, при котором флуоресценция достигает половины максимального значения. В большинстве случаев с повышением уровня pH возрастает интенсивность флуоресценции и достигает максимума в диапазоне pH 8-9. Для большинства белков в дальнейшем не происходит повышение уровня флуоресценции вплоть до значений pH 10-13, при которых начинается денатурация полипептидной цепи и разрушение хромофора. Большинство известных на сегодняшний день флуоресцентных

белков обладают высокой рН-зависимостью флуоресценции и их рКа лежат в области рН 5-7. Наибольшей рН-зависимостью обладают желтые флуоресцентные белки (рКа 5,5-8,5) и зеленые флуоресцентные белки (рКа 5-6), наименьшей – голубые флуоресцентные белки (рКа 2-4) и дальнекрасные флуоресцентные белки (рКа 3-4).

В некоторых физиологических процессах происходят локальные колебания уровня рН, что отражается на сигнале используемых флуоресцентных белков, поэтому рН-стабильность флуоресценции является важным параметром для выбора флуоресцентного белка и его производных [51].

1.3.6. Красные DsRed-подобные флуоресцентные белки

К линии DsRed-подобных флуоресцентных белков относятся белки серии mFruits, спектральные пики возбуждения и эмиссии флуоресценции которых расположены в области 540–590 и 550–650 нм соответственно. От тетрамерного DsRed дикого типа mFruits отличается олигомерное состояние – это преимущественно мономерные флуоресцентные белки, процент димерной формы при физиологических концентрациях не превышает 30% [72]. mFruits являются одними из наиболее ярких представителей мономерных флуоресцентных белков, не уступающих по яркости GFP дикого типа.

Долгое время считалось, что созревание DsRed-подобного хромофора, аминокислотный состав которого (Ser65-Tyr66-Gly67) аналогичен хромофорам зеленых флуоресцентных белков, происходит через стадию GFP-подобного хромофора, т.е. через зелёный интермедиат. Но последние данные подтверждают теорию о том, что созревание этих белков происходит через интермедиат с близким к mTagBFP [73] и mTagBFP2 [74] структурой хромофора, т.е. подобный голубым флуоресцентным белкам, содержащим замену Tyr66 на аминокислотный остаток His66. Голубая форма белка mCherry была зафиксирована методом масс-спектрометрии и кристаллографии, хромофор этой формы, N-[(5-гидрокси-1H-имидозол-2-ил)метилидин]ацетамид в анионной форме взаимодействует с фенильным радикалом Tyr66, образуя красную форму хромофора, которая в дальнейшем депротонируется [51, 75]. Наблюдение за превращением синей формы белка в красную белков линии mFruits может быть использовано для контроля продолжительности генной экспрессии, белки с наиболее длительным временем созревания (mStrawberry) могут быть использованы как мономолекулярные таймеры за счёт высокой яркости как конечной, так и промежуточной формы созревания хромофора [75]. Наименьшим временем созревания обладают наиболее популярные сегодня белки линии mFruits – mCherry, mApple, mOrange, tdTomato, и их производные. Их промежуточные стадии созревания практически не детектируются

обычным флуоресцентным микроскопом, что делает эти белки наиболее удобными для совместной микроскопии нескольких флуоресцентных белков.

1.4. Генетически кодируемые биосенсоры

Флуоресцентные белки – это уникальный компонент для создания полностью генетически кодируемых сенсоров, которые могут быть использованы для визуализации и определения ферментативной активности, конформационного состояния белков и изменения концентрации некоторых молекул в клетках, тканях и целых организмах.

На уровне всего организма генетически кодируемые сенсоры могут быть использованы для изучения сигнальных путей как внутри отдельных клеток, так и между несколькими клетками организма, передвижении клеток в течение онтогенеза и взаимодействия между клетками иммунной системы и нейронами.

Главные преимущества генетически кодируемых сенсоров перед различными флуоресцентными красителями состоят в том, что эти биосенсоры попадают в живые клетки путём трансфекции и полностью синтезируются в ней. Экспрессию биосенсора можно варьировать, изменяя его локализацию, уровень экспрессии, а также тканеспецифичность экспрессии.

Биосенсоры основаны на природных белках, поэтому их чувствительность к сигнальным молекулам сравнима с таковой для клеточных белков и подходит для детекции крайне низких концентраций действующих веществ (так различные бактериальные аналоги OxyR, детектируют H₂O₂ в концентрации от 2-5 нМ *in vitro*) [76, 77].

Конечно, у биосенсоров есть ряд недостатков: избыточная экспрессия биосенсоров как чужеродных для клетки белков может отрицательно влиять на нормальную жизнедеятельность клетки, биосенсоры, как белковые молекулы, могут подвергаться вторичным модификациям, которые способны повлиять на сигнал сенсора, они могут образовывать комплексы с клеточными белками. Для хотя бы частичного решения этой проблемы в качестве основы биосенсоров можно использовать изначально отсутствующие в клетке белки – например, для эукариотической клетки чужеродны белки прокариот, транскрипционные факторы которых обладают чувствительность к специфическим сигнальным молекулам и могут становиться основой для биосенсоров [51].

Существующие на сегодняшний день биосенсоры в основном разделяются на несколько групп, наиболее распространенными из которых являются: а) биосенсоры на основе одиночного флуоресцентного белка, не связанного с другими детекторными доменами, б) биосенсоры, основанные на одном флуоресцентном белке, связанном с нефлуоресцентным детекторным доменом, в) FRET-сенсоры, основанные на двух флуоресцентных

белках, г) транслокационные сенсоры, д) сенсоры, основанные на комплементации и е) сенсоры, основанные на димеризующихся доменах белков.

В дальнейшем речь пойдёт о сенсорах группы б, основанных на одном флуоресцентном белке (флуоресцентном ядре), связанном с белковым детекторным доменом.

1.4.1. Первые флуоресцентные сенсоры на основе пермутированных флуоресцентных белков

Существует достаточно много биосенсоров, созданных на основе флуоресцентных белков. Принцип работы любого сенсора заключается в специфическом взаимодействии с исследуемой молекулой с одновременной возможностью детекции данных взаимодействий по изменению спектральных свойств флуоресцентного белка в составе биосенсора. Так что каждый биосенсор состоит из двух функционально различающихся частей: первая представляет собой детекторный элемент, специфически взаимодействующий с исследуемой молекулой, связывание с которой приводят к конформационным изменениям, вторая представляет собой флуоресцентное ядро сенсора и служит для передачи сигнала. Конформационные изменения передаются через линкерные участки на флуоресцентный белок, который меняет свои спектральные свойства. Создано значительное количество сенсоров для визуализации различных сигнальных молекул и ионов в клетках, например Ca^{2+} , Cl^- , cAMP, NO, соотношения концентраций АТФ/АДФ и НАДН/НАД⁺, а так же H_2O_2 [31, 78]

Первыми сенсорами на основе пермутированных флуоресцентных белков были сенсоры на ионы Ca^{2+} . Чувствительный домен сенсоров состоит из взаимодействующих в присутствии Ca^{2+} кальмодулина (CaM) и пептида M13, соединенных с концами пермутированного флуоресцентного белка. Существуют два похожих семейства кальциевых сенсоров: *Pericam* на основе пермутированного EYFP [79], и *GCaMP* на базе пермутированного EGFP [80-82]. Данные кристаллографических исследований сенсора *GCaMP2* показали, что круговая пермутация создает небольшое «отверстие» в структуре флуоресцентного белка. Это приводит, во-первых, к тому что хромофор EGFP напрямую контактирует с молекулам растворителя, что способствует протонированию тирозина хромофора, и, во-вторых, к разрушению системы водородных связей, стабилизирующих хромофор. Все вместе приводит к тому, что в апо-форме сенсор имеет низкую интенсивность флуоресценции [83]. Связывая кальций, CaM и M13 взаимодействуют, закрывая «отверстие», что приводит к депротонированию хромофора и восстановлению сети водородных связей и интенсивность флуоресценции сенсора возрастает.

Интересно, что у флуоресцентных белков, родственных EGFP (и семейство GCaMP), протонированная форма флуорофора либо отсутствует, либо присутствует в спектре поглощения, но не в спектре возбуждения флуоресценции. Поэтому сенсоры GCaMP исключительно одноканальные и детектируемым сигналом является интенсивность флуоресценции в одном спектральном канале. У белков родственных eYFP протонированную форму хромофора можно сделать флуоресцирующей внесением замены Y206F, что и было сделано в сенсоре Pericam [79]. Версия Pericam с данной заменой ратиометрическая. Впоследствии мы использовали эту замену при создании и сенсора на пероксид водорода.

Сочетание направленного и случайного мутагенеза уже позволили создать сенсоры GCaMP3 и GCaMP5, отличающиеся повышенным сродством к кальцию, высокой фотостабильностью и яркостью и увеличенным динамическим диапазоном [84, 85]. Последние представители этой линии GCaMP6 (s,f,m), являются самыми быстрыми и контрастными представителями генетически-кодируемых сенсоров для детекции Ca^{2+} [86]. Скорость их связывания с кальцием, а также высокий контраст и яркость позволили авторам детектировать активацию и распространение возбуждения от индивидуальных дендритов нейронов в мозге мыши *in vivo*.

Сегодня уже появились работы, описывающие принцип локального мониторинга кальция. Известно, что в основном кальциевые выбросы происходит в микродоменах вблизи кальциевых каналов [87, 88], в то время как сенсоры для детекции Ca^{2+} делокализованы между цитоплазмой и ядром. Таким образом, подвижность сенсора может «размывать» локальный сигнал и снижать его интенсивность. Для повышения пространственно-временного разрешения метода две группы воспользовались белковой природой сенсора и поместили его вблизи источника кальция: в одном случае в синаптический терминал [89], а в другом – в непосредственной близости с кальциевым каналом Ca(V)2.2 [90].

Настоящим прорывом в создании пермутированных сенсоров на кальций явилась работа группы Роберта Кемпбелла, создавшей кальциевые сенсоры разных цветов, от синего до красного, на базе пермутированных флуоресцентных белков [91]. До этого палитра сенсоров на кальций ограничивалась зелеными и условно-желтыми белками. Кемпбеллу с соавторами удалось создать пермутанты других цветов и сенсоры на их основе. Красный белок *srpApple* из сенсора R-GECO1.1 послужил основой для создания первого красного флуоресцентного сенсора на H_2O_2 , описанного в данной работе. Сенсоры на основе пермутированных флуоресцентных белков лишены большинства недостатков, присущих FRET-сенсорам. В первую очередь, у пермутированных сенсоров значительно выше динамический диапазон: изменения флуоресценции могут составлять 10-15 раз (по сравнению с 5-20% для FRET). Во-вторых, такие сенсоры проще устроены и зачастую состоят всего из

двух белковых модулей, флуоресцентного и сенсорного. Их меньший молекулярный вес позволяет значительно проще направлять их в субклеточные структуры. Единственным существенным недостатком большинства таких сенсоров является их рН-зависимость в физиологическом диапазоне рН, что успешно преодолевается использованием контролей и, со временем, созданием менее рН-зависимых пермутированных флуоресцентных белков.

1.4.2. Транскрипционный фактор *Escherichia coli* OxyR

Транскрипционный фактор *E. coli* OxyR, связываясь с H₂O₂, активирует транскрипцию кластера генов, ответственных за устойчивость бактерий к окислительному стрессу. OxyR стимулирует экспрессию генов, кодирующих каталазу, алкилгидропероксид редуктазу *ahpCF*, глутатион редуктазу и глуторедоксин *gorA* и *grxA* [92, 93]. OxyR состоит из двух доменов: N-концевой домен (1 - 80 а. о.) образует ДНК-связывающий участок, в то время как С-концевой домен (81 - 305 а. о.) регулируется пероксидом водорода и обеспечивает способность белка к олигомеризации [94].

В присутствии H₂O₂ происходит образование дисульфидной связи между остатками цистеина Cys199 и Cys208, что приводит к конформационным изменениям структуры регуляторного домена OxyR. Аминокислотный остаток Cys199 находится в гидрофобном окружении и может взаимодействовать только с небольшими и незаряженными молекулами, такими как H₂O₂. При взаимодействии Cys199 с H₂O₂ происходит окисление SH-группы до сульфеновой кислоты и образование дисульфидной связи с Cys208 с освобождением молекул воды. Скорость этой реакции очень велика (константа скорости 9,7 1/сек), т.к. окисленный до сульфеновой кислоты Cys199 не взаимодействует с глутатионом или другими гидросульфидами [34, 95].

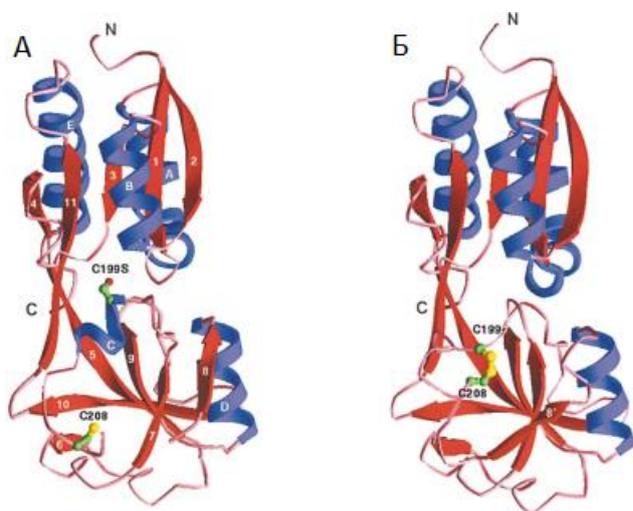


Рисунок 7. Структура регуляторного домена OxyR [94]. А) восстановленная форма; Б) окисленная форма. Синим цветом отмечены α -спирали, красным - β -тяжи; на структуре обозначены Cys199 и Cys208, участвующие в образовании дисульфидной связи.

Формирование дисульфидной связи приводит к стабилизации подвижного участка с 205-ого по 222-ой а.о. в структуре OxyR и изменению конформации всего белка (рисунок 7), что приводит к его связыванию с ДНК [31, 76, 94]. H₂O₂ – сравнительно мягкий окислитель, и взаимодействует с цистеинами только

в форме тиолат-ионов, поэтому вполне вероятно, что Cys199 в покое находится в депротонированном состоянии [76, 92].

Окисление регуляторного домена OxyR является обратимым процессом. Было показано *in vitro* восстановление OxyR глутаредоксином 1 и тиоредоксином [76].

1.4.3. Генетически кодируемый высокоспецифичный сенсор для детекции пероксида водорода HyPer

Генетически кодируемый биосенсор для детекции H₂O₂ HyPer (*Hydrogen Peroxide*), позволил изучить динамику H₂O₂ в процессах апоптотической гибели клетки, ответа клетки на стимуляцию факторами роста, колебаний концентрации H₂O₂ в цитоплазме, эндоплазматической сети и митохондриях, а также процессы регенерации у эмбрионов *Danio rerio*. Чувствительный домен сенсора представляет собой участок регуляторного домена белка *E. coli* OxyR, а флуоресцентный домен представляет собой циркулярно пермутированный желтый флуоресцентный белок (cpYFP, рисунок 8А) [31].

Т.н. круговая, или циркулярная, пермутация флуоресцентных белков необходима для увеличения подвижности микроокружения хромофора и, следовательно, для увеличения лабильности спектральных свойств хромофора. В первичную структуру флуоресцентного белка на уровне гена вносится разрыв в область между 145 и 146 а.о., нативные N- и C-концы совмещаются при помощи полипептидного линкера длиной от 6 до 11 а.о. [96]. Новые N- и C-концы находятся в непосредственной близости от хромофора и могут влиять на его микроокружение HyPer представляет собой конструкцию, в которой cpYFP соединен с двумя фрагментами чувствительного к H₂O₂ домена OxyR (80 - 205 и 206 - 305 а. о.) посредством коротких пептидных линкеров Ser-Ala-Gly (между OxyR и N*-концевым фрагментом) и Gly-Thr (между OxyR и C*-концевым фрагментом, рисунок 8А) [31]. Спектр возбуждения флуоресценции сенсора характеризуется двумя пиками: 420 нм и 500 нм, а спектр эмиссии – одним пиком 516 нм (рисунок 8Б) [97].

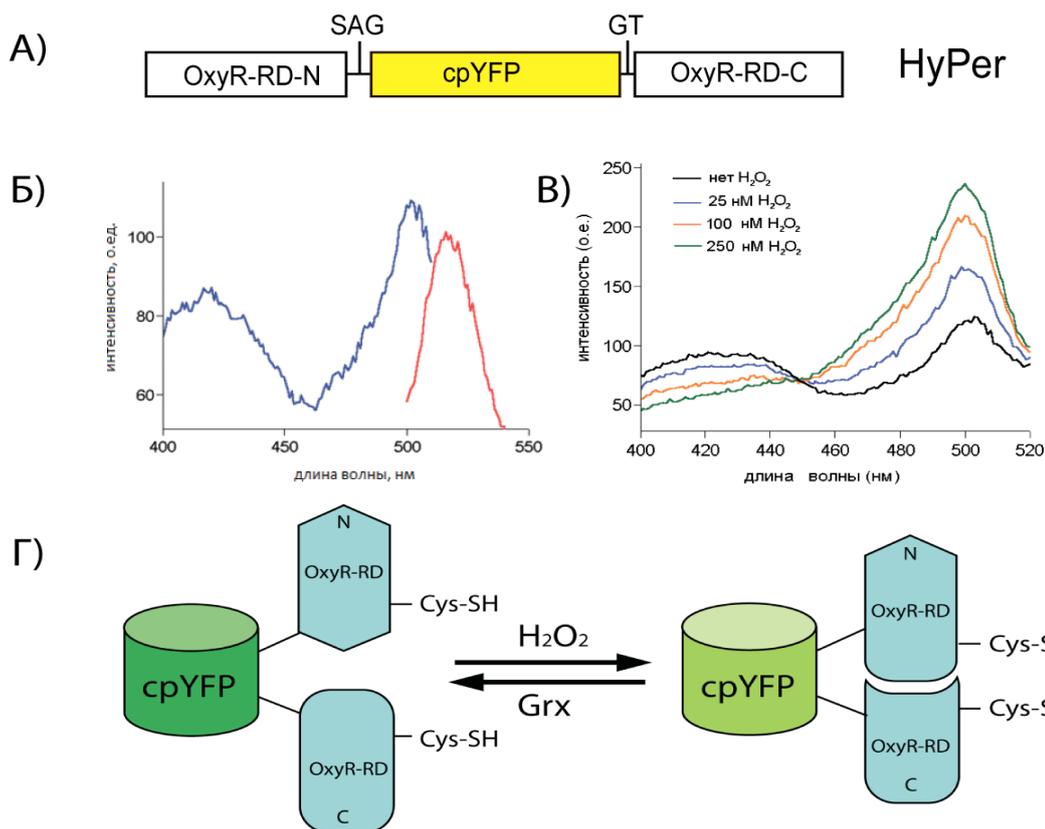


Рисунок 8. Генетически-кодированный сенсор для детекции пероксида водорода HyPer.
А) Схема строения гена сенсора HyPer. **Б)** Спектр возбуждения (синяя кривая с максимумами 420 и 500 нм) и спектр эмиссии (красная кривая с максимумом 516 нм) HyPer **В)** Изменение спектра возбуждения флуоресценции сенсора HyPer при взаимодействии с пероксидом водорода **Г)** Схема работы сенсора HyPer [31].

В результате окисления HyPer под действием H₂O₂ происходят конформационные изменения регуляторного домена OxyR, передающиеся на структуру cpYFP. При этом изменяется соотношение величин поглощения для протонированной и заряженной форм хромофора cpYFP (рисунок 8Г).

В присутствии H₂O₂ происходит увеличение интенсивности флуоресценции HyPer, причем наблюдается пропорциональное увеличение интенсивности возбуждения при 500 нм и уменьшение при 420 нм (рисунок 8Б, В). Таким образом, сигнал сенсора не связан с уровнем его экспрессии в клетке, т.к. сигнал определяется соотношением интенсивностей флуоресценции в двух каналах, а не общим уровнем флуоресценции. Полностью восстановленный HyPer в концентрации 25 нМ реагирует на добавление 25 нМ H₂O₂, добавление 250 нМ H₂O₂ приводит к полному окислению сенсора. Чувствительность HyPer к H₂O₂ сравнима с чувствительностью к H₂O₂ OxyR дикого типа. Кроме того HyPer демонстрирует исключительную специфичность к H₂O₂, свойственную OxyR. Взаимодействие HyPer с H₂O₂ является обратимым [31].

На протяжении последнего времени предпринимались попытки улучшить динамический диапазон *NuPer*. В Лаборатории молекулярных технологий ИБХ РАН был получен методом случайного мутагенеза *NuPer2*: в структуре домена *OxyR* присутствует случайная замена A406V [98]. Замена A406V соответствует известной по литературным данным мутации A233V в *OxyR* дикого типа [32].

NuPer2 обладает динамическим диапазоном ответа на H_2O_2 практически в 2 раза большим по сравнению с исходным биосенсором *NuPer*.

Позиция 233 в *OxyR* существенна для димеризации транскрипционного фактора (рисунок 9). Внесение замены A406V в структуру *NuPer* приводит к димеризации молекул сенсора, что подтверждается данными о том, что *NuPer* представляет собой смесь димера и мономера, в то время как *NuPer2* полностью представлен в виде димера [32].

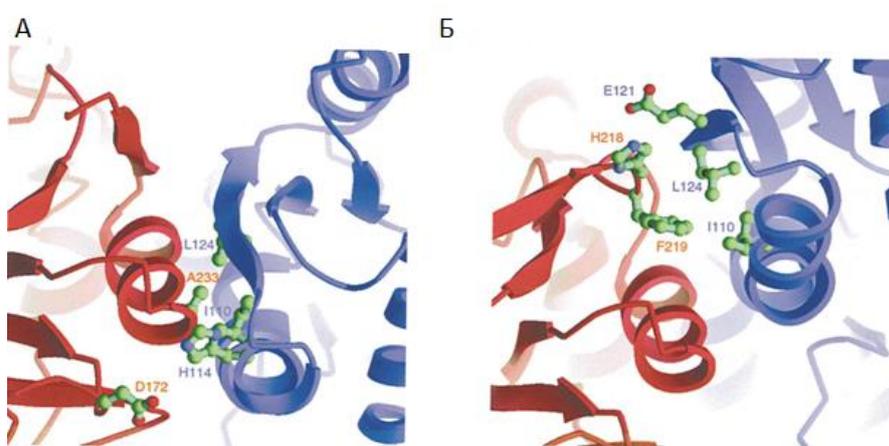


Рисунок 9. Интерфейс *OxyR*, отвечающий за димеризацию. А) восстановленная форма; Б) окисленная форма (красным и синим цветами отмечены разные мономеры). Приведено из [92].

Полноразмерный *OxyR* дикого типа функционирует как димер.

Димеризации способствуют гидрофобные взаимодействия и водородные связи аминокислотных остатков в составе αD спирали одного мономера с αA спиралью и $\beta 2$ тяжом другого (рисунок 9). Ala233 входит в состав αD спирали и находится в гидрофобном интерфейсе осуществляющем димеризацию транскрипционного фактора. Перестройка в интерфейсе *OxyR*, отвечающем за димеризацию, возможна лишь благодаря образованию дисульфидной связи между остатками Cys199 и Cys208 при специфическом окислении молекулы пероксидом водорода [92, 94].

Было показано, что замена Ala в положении 233 на Val (A233V) дестабилизирует восстановленную форму димера, но не оказывает воздействия на окисленную [94].

Но, как было показано в дальнейших экспериментах, скорость восстановления *NuPer2* в 2 раза ниже скорости восстановления исходного сенсора, что может быть объяснено стерическими затруднениями, вызванными димерным состоянием сенсора и низкой доступностью дисульфидной связи для клеточных глутатионтиоредуктаз.

В дальнейшем были исследованы ещё 2 группы замен, описанных для OxyR дикого типа: конститутивно активирующие OxyR замены (I110D, H114Y) и замены, вызывающие активацию как OxyR, так и OxyS (F219A, L124). Сенсор HyPer, несущий замену H114Y и названный в дальнейшем HyPer-3, обладает динамическим диапазоном HyPer2 и наибольшей скоростью окисления и восстановления. Скорости окисления и восстановления этого сенсора в 1,5-1,6 раза выше, чем у исходного сенсора HyPer, что делает HyPer3 предпочтительным сенсором для детекции пероксида водорода в живых системах [32].

HyPer, HyPer2 и HyPer3 сделаны на основе cpYFP и, следовательно, недостатками полученных сенсоров является их высокая рН-чувствительность, свойственная этому флуоресцентному белку. Повышение значения рН вызывает ложноположительный сигнал сенсоров.

Зависимость интенсивности флуоресценции обеих форм сенсора максимальны при рН 7,5-9, что отражает параметр ratio , частное интенсивности флуоресценции при возбуждении 500 нм к интенсивности флуоресценции при возбуждении светом длиной волны 420 нм. В этот диапазон попадают физиологические значения рН 7,4-7,6. Интересно отметить, что диапазон изменения ratio в ответ на изменение рН приблизительно одинаков для всех трёх сенсоров на основе cpYFP, в то время как динамический диапазон реакции на пероксид водорода у HyPer2 и HyPer3 в 2 раза выше, чем у HyPer.

Группой Р. Кэмпбелла была получена серия кальциевых сенсоров, основанных на различных пермутированных флуоресцентных белках [78]. Спектральные свойства этих белков сильно отличаются от cpYFP. Среди синтезированных пермутантов имеется один красный белок – GECO-Red, который имеет пик возбуждения флуоресценции 565 нм и пик эмиссии 600 нм. Практическая значимость красных флуоресцентных белков особенно велика для микроскопии тканей и целых организмов, так как свет с большей длиной волны лучше проникает в биологические образцы. Это объясняется тем, что вода, меланин и гемоглобин, основные вещества, которые поглощают свет в биологических тканях, имеют минимальный коэффициент экстинкции в диапазоне длин волн от 600 до 1100 нм [32, 99, 100].

Создание новых вариантов HyPer на основе красных флуоресцентных белков позволит получить сенсоры, которые возможно использовать для котрансфекций HyPer с разнообразными сенсорами на основе зелёных, желтых и голубых флуоресцентных белков.

1.5. Методы стимуляции нейронных сетей

Передача и восприятие информации на клеточном уровне является одним из наиболее важных свойств живых систем, т.к. эти параметры определяют взаимодействие организма как с окружающей средой, так и взаимодействие клеток, тканей, органов и систем органов одного организма между собой.

Белки, выполняющие рецепторную функцию, являются основным источником информации для живых организмов обо всех биотических и абиотических воздействиях на них со стороны окружающей среды и способны воспринимать все основные типы сигналов, описывающие чувствительность живого: механические (осязание и слух) [101], тепловые и холодные (термочувствительность) [102-105], световые (зрение), химические (обоняние, вкус) [106-108], вплоть до спорного механизма магниторецепции [109, 110].

Положительный сигнал (поглощение света, нагрев, связывание химического лиганда) приводит к активации чувствительного к нему белка, в большинстве случаев выраженную в изменении конформации чувствительного белка, что, в свою очередь, запускает систему биохимических каскадов (изменение проводимости мембраны, перемещение ионов кальция, активация киназ/фосфатаз, окислительно-восстановительные реакции), служащих для передачи информации на внутри- и межклеточном уровнях. Структуры комплексов рецепторов могут быть крайне разнообразны и включать десятки белков-партнеров, отвечающих за модуляцию и вторичное проведение сигнала.

Одна из классификаций подходов к стимуляции клеток основана на их разделении по типу сигнала, который используется для стимуляции непосредственно рецепторного белка, и выделяет такие группы методов как хемогенетика, оптогенетика и термогенетика, а также соногенетика и магнитогенетика, впрочем, эффективность и специфичность последних двух является вопросом дискуссионным.

1.5.1.Хемогенетика

Хемогенетика является одним из наиболее старых и распространенных подходов к активации клеток, и основана на взаимодействии рецепторного белка с химическим лигандом, время введения и дозировка которого позволяет регулировать активацию рецептора. Хемогенетика не позволяет проводить локальную активацию рецепторов, ограничена ско-

ростью и эффективностью диффузии, а также обладает рядом побочных эффектов, связанных с коактивацией нескольких видов рецепторов, обусловленной специфичностью активатора и константами сродства к нему рецепторов.

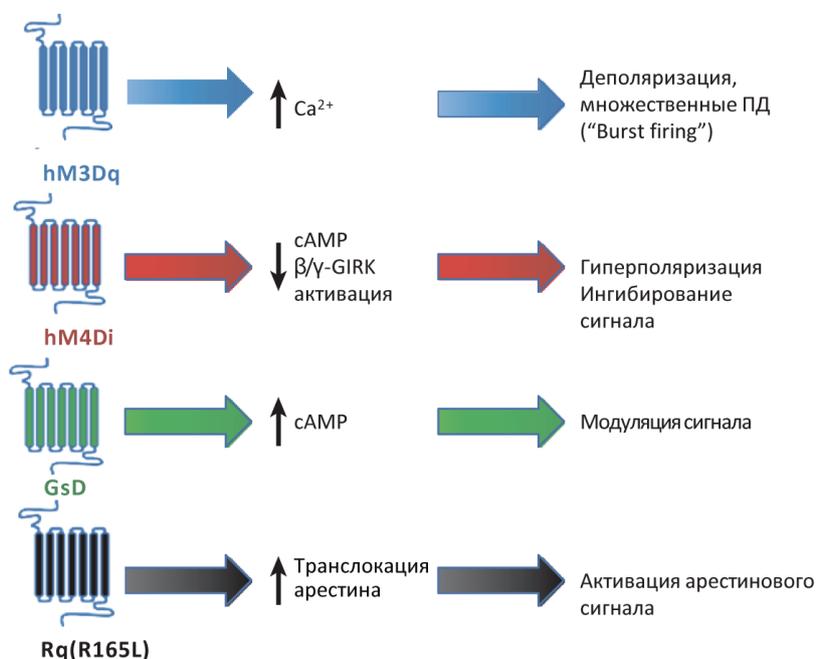
Инструментами хемогенетики могут быть практически любые белки, для которых известны метаболитные регуляторы. На заре биохимии ингибирование и стимуляция Na^+/K^+ -, H^+/K^+ - $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, Ca^{2+} АТФаз положило основу изучения водно-солевого метаболизма клеток, а также привело к открытию вида передачи внутриклеточного сигнала с помощью Ca^{2+} . Хемогенетическая стимуляция рецепторов, таких как Н- и М-хлониновые рецепторы, ГАМК_A, ГАМК_B, NMDA, пуринаргические рецепторы, дофаминовые и опиоидные рецепторы и изучение изменений в электрофизиологических параметрах клеток способствовало развитию молекулярной нейробиологии и нейрофизиологии.

Первый относительно специфический подход к стимуляции поведения нейронов с помощью хемогенетики был осуществлен на капсаицин-чувствительных рецепторах TRPV1 (*Transient Receptor Potential*), выполняющих в природе роль хемо-, термо- и механорецепторов[111-113]. Эти рецепторы были специфично экспрессированы в дофаминэргических нейронах мыши, а затем специфично стимулированы капсаицином, что привело к мощному выбросу дофамина и всплеску двигательной активности[114]. Главным минусом этого метода является то, что собственный TRPV1 экспрессируется во многих тканях и органах животных (эпителий почек, сосочки языка, кожа, чувствительные нервы), поэтому для реализации этого эксперимента авторам сначала пришлось получить нокаутную (*Trpv1* -/-) по гену этого рецептора мыш. Для повышения специфичности хемогенетики было предложено модифицировать собственные рецепторы организмов, улучшая их связывание с искусственными лигандами, или усложнение систем регуляции активации за счет дополнительных белков.

Наиболее современными направлениями хемогенетики в нейробиологии является получение и применение модифицированных рецепторов, чувствительных к синтетическим лигандам, получившим общее название PSAMs–PSEMs (*pharmacologically selective actuator molecules*) - “*pharmacologically selective effector molecules*”[115].

Первым синтетическим методом хемогенетики стал метод экспрессии искусственно созданных мутантных рецепторов RASSLs на базе опиоидных рецепторов KOR, которые приобрели чувствительность к синтетическому веществу спирадолину[116], и были успешно применены для регуляции сердечных ритмов[117], вкусовых ощущений[118] и модели паркинсонизма[119].

Также распространение получила линия синтетических рецепторов на базе М3-му-
 скариновых рецепторов под названием DREADDs (*Designer Receptors Exclusively Activated*
by Designer Drugs). Они реагируют с синтетическим веществом N-оксидом колазипина
 (CNO), выбранным в качестве лиганда за быструю диффузию сквозь гематоэнцефаличе-
 ский барьер, быструю фармакокинетику и химическую инертность. CNO является един-



ственным известным лигандом DREADDs, с другими нейромеди-
 аторами организма DREADDs не
 взаимодействуют.

**Рисунок 10. Синтетиче-
 ские рецепторы DREADDs и их
 функции.**

Впоследствии была разра-
 ботана целая панель DREADDs
 (hM1Dq, hM2Di, hM3Dq, hM4Di,
 hM5Dq, (рисунок 10)[120], кото-
 рые были использованы для иден-
 тификации центров голода[121],
 стимуляции воспоминаний [122],

специфического ингибирования серотониновых нейронов *in vivo* [123, 124] и д.р.

Наиболее распространены в практике применения hM3Dq рецепторы, которые при
 введении CNO вызывают деполяризацию нейронов, а также hM4Di, вызывающие гиперпо-
 ляризацию. Соответственно, их использование делает возможным либо активацию, либо
 подавление нейрональной активности, причем обратимым способом [125].

Как метаботропные рецепторы, DREADDs вызывают длительную стимуляцию
 нейронов, длящуюся в течение минут и часов, что вносит свои ограничения на их исполь-
 зование. Так использование hM3Dq в модели болевого воспоминания у мышей привело к
 генерации ложного воспоминания, за счет перекрытия активирующихся в различных
 условиях областей мозга[126].

1.5.2. Оптогенетика

Оптогенетика представляет собой группу методов, позволяющих проводить стиму-
 ляцию или ингибирование клеточной активности с помощью фоточувствительных белков.

В большинстве случаев для их активации используется видимый свет (450-640 нм), поглощение которого достигает 90% в ткани мозга на расстоянии 1 мм от торца оптоволокна [127].

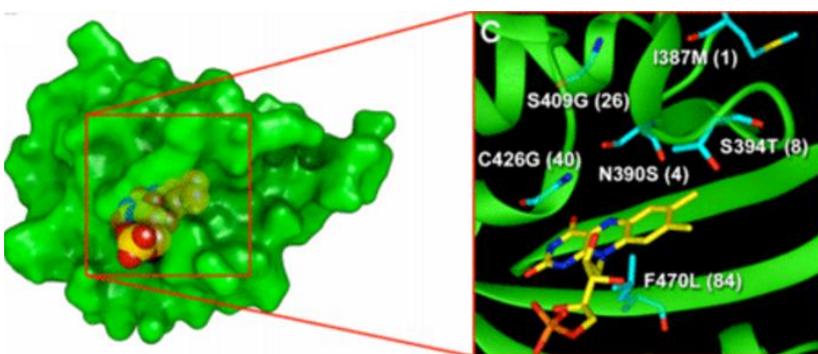
Оптогенетические инструменты разделяют на две основных группы: в первую входят производные бактериальных опсинов и галородопсинов, как наиболее быстрые стимуляторы, а во вторую метаболические стимуляторы, основанные на флуоресцентных, растительных светочувствительных белках и фотохимических агентах, активация которых требует длительного времени.

Медленные инструменты оптогенетики

К этой группе относятся фотоксические флуоресцентные белки KillerRed[128], KillerOrange[129]. При длительном обучении экспрессирующих их клеток светом 540-600 нм (KillerRed), 450-495 нм (KillerOrange), они индуцируют селективную гибель экспрессирующих их бактериальных или эукариотических клеток за счет продукции АФК[128]. KillerRed применяется как фототоксический белок в опухолевых моделях, изучении роли пероксисом[130], в модели локальных повреждений митохондрий и др.[131]

Существует ряд оптогенетических инструментов, основанных на растительных фоточувствительных доменах LOV (*Light-Oxygen-Voltage*), а также фоточувствительных флавопротеинах и фитохромах.

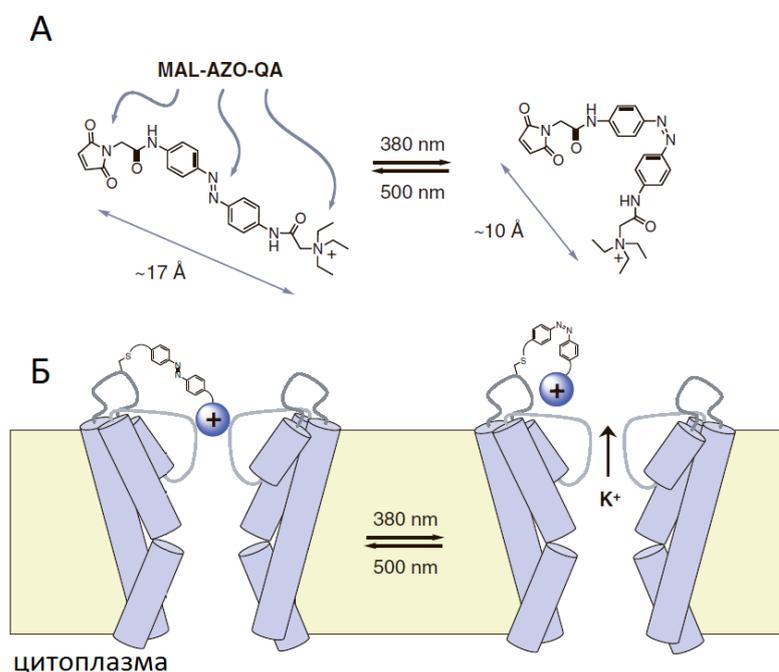
К ним относится miniSOG (*mini Singlet Oxygen Generator*)[132], флавопротеин, созданный на основе выделенного из *Arabidopsis thaliana* фототропина 2 (рисунок 11). Активация miniSOG светом 390-490 нм приводит к возбуждению флавинового хромофора (FMN) и продукции синглетного кислорода, обеспечивающего локальный фотоксический эффект.



miniSOG применяется как стимулятор локальных окислительных процессов, а также как киллерный белок, предназначенный для стимуляции избирательной гибели клеток.

Рисунок 11. Предполагаемая структура белка miniSOG и его активного центра. Взято из [132].

В арсенале оптогенетики также, как и в случае хемогенетики, представлены модифицированные рецепторы, такие как SPARK [133]. Они представляют собой модифицированные калиевые каналы типа shaker, связывающие фотосенсибилизирующий агент MAO-



AZO-QA (maleimide-azobenzene-quarternary ammonium). При облучении синим светом 380 нм MAO-AZO-QA меняет свою конформацию с транс- на цис-, и активирует канал, вызывая гиперполяризацию клетки, а при облучении светом 500 нм цис-конформация изомеризуется в транс- и канал SPARK снова инактивируется (рисунок 12).

Рисунок 12. Принцип работы фотосенсибилизированного канала SPARK. А) Фотосенсибилизирующий агент MAO-AZO-QA при активации 380 нм переходит в цис-конформацию и активирует канал, а при освещении светом 500 нм меняет конформацию на транс-форму и ингибирует работу канала. Б) Схема взаимодействия MAO с каналом SPARK. Приведено из [133].

Похожим образом устроен инструмент MAG-LiGluRe [134], в котором фотосенсибилизатор MAG (maleimide-azobenzene-glutamate) и чувствительный к нему рецептор глутамата LiGluRe на основе G-белка. При активации MAG светом 380 нм он меняет конформацию на цис-форму и активирует LiGluRe, вызывая деполяризацию клетки, а освещение светом 500-580 нм вызывает изомеризацию MAG в транс-форму, инактивируя рецептор. Эти системы являются усложненными аналогами систем фотовысвобождения медиаторов, таких как ионы кальция, АТФ, капсаицин и глутамат [135, 136], т.н. систем «имобилизованных медиаторов».

Основной принцип работы их оптогенетических аналогов состоит в том, что в цитоплазме клетки находится вещество или белок, который связан с лигандом в неактивированном состоянии. При облучении светом в нем происходят конформационные изменения, приводящие к локальному высвобождению лиганда и активации клеток/регуляции работы клеточного компартмента. Их отличает медленная кинетика работы, высокая селективность относительно лигандов (обычно пропускаемых/высвобождаемых катионов) и малая токсичность.

Примером такой системы является PACR (*photoactivatable Ca²⁺ releaser*)[137], который представляет собой интересный синтез оптогенетики и методики разработки кальциевых сенсоров линии GCaMP[86].

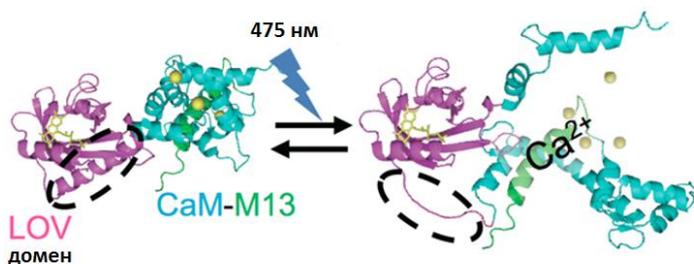


Рисунок 13. Схема работы системы PACR. CaM – кальмодулин. Пунктиром отмечена разрушающаяся при фотоактивации α -спираль LOV2. Рисунок из [137].

PACR представляет собой сенсор GCaMP2, в структуре которого круговой пермутант флуоресцентного белка *srGFP* заменен на LOV-домен фототропина 2 *Avena sativa* (овес), который оказывается фланкирован кальмодулином и пептидом M13. В неактивном состоянии молекула PACR связывает 4 иона Ca^{2+} , при облучении синим светом 450-480 нм LOV2-домен меняет свою конформацию за счет разрушения α -спирали, разделяя в пространстве кальмодулин и M13, в результате чего ионы Ca^{2+} освобождаются в цитоплазму (рисунок 13). Этот активатор был успешно применен для модуляции поведения *C. elegans*[137], а также для локальной активации нейронов без деполяризации.

Системы индукции кальциевого всплеска (ORAI, OptoSTIM, LOVS1K[138]), также основанные на родственных LOV доменам PHR криптохрома 2 (*Cry2*) из *Arabidopsis thaliana*, сшитых с регуляторными факторами ионных каналов, используют систему активации клеток на основе эндогенных ORAI или CRAC каналов, которые имеют высокую селективность по отношению Ca^{2+} (рисунок 14).

Первые две системы используют фотоактивируемые модуляторы на базе LOV-доменов для активации выброса Ca^{2+} через эндогенные клеточные каналы ORAI [138, 139]. Эффективность системы зависит от экспрессии каналов ORAI в различных клетках, диффузии активированного комплекса к каналу, и, отчасти, от внеклеточной концентрации Ca^{2+} . Кроме того, низкая индивидуальная проводимость канала ORAI (<10 фсек для внеклеточной концентрации Ca^{2+} 2мМ в Т-клетках, по сравнению с 4-10 псек для потенциал-зависимых Ca^{2+} каналов [140], что сильно ограничивает применимость данной системы.

Аналогичная система OptoSTIM была использована для активации нейронов [141], однако OptoSTIM демонстрирует очень медленную кинетику активации (до 5-25 мин облучения для активации), что не удивительно, т.к. для активации необходима реализация длинной цепи молекулярных событий после светового импульса: конформационные изменения в STIM с последующей олигомеризацией, транслокация олигомеров STIM к каналам CRAC, открытие CRAC, вход ионов Ca^{2+} в цитоплазму клетки.

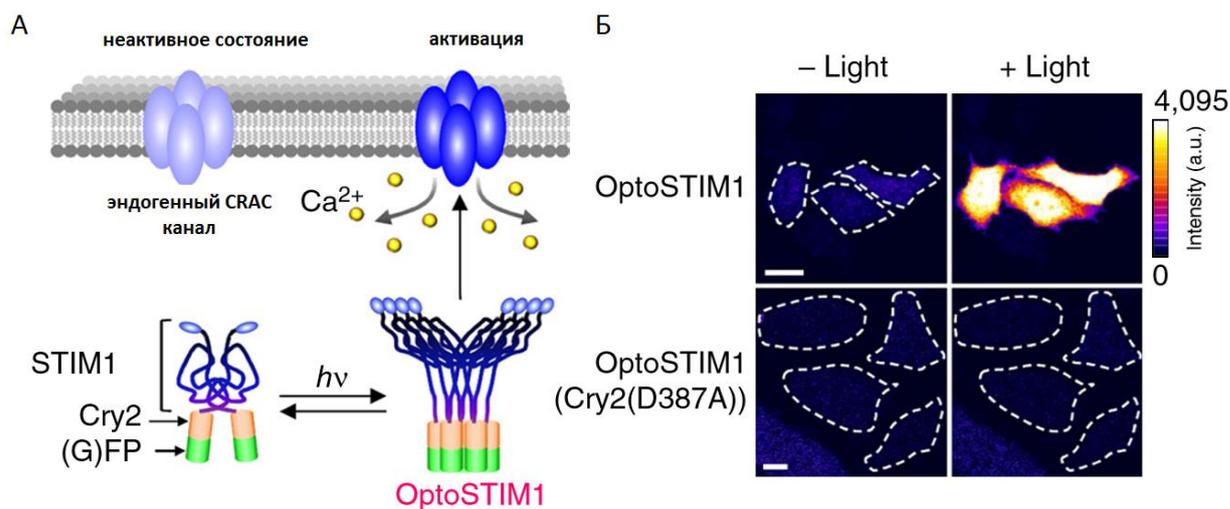


Рисунок 14. Система OptoSTIM. А) Схема работы системы OptoSTIM. Под действием света происходит димеризация STIM1, который затем связывается с эндогенными каналами CRAC, вызывая вход Ca^{2+} в клетки. Б) Клетки HeLa Kyoto, экспрессирующие OptoSTIM и его контрольной версии Cry(D387A), неспособной активироваться светом в процессе активации светом 475 нм.

Все это серьезно ограничивает временное разрешение системы OptoSTIM. Дополнительным ограничением является собственный профиль экспрессии CRAC, которые экспрессируются не во всех типах клеток. Тем не менее, система OptoSTIM нашла успешное применение как для стимуляции эукариотических клеток в культуре, нейронов мышцы в культуре, а также кожных покровов личинок *Danio rerio*, и стимуляции болевых воспоминаний у мыши *in vivo* [141].

Последним обновлением системы OptoSTIM является ее инфракрасный аналог OptoCRAC[139], возбуждаемый не синим светом, а светом длиной волны 695-730 нм, и обладающий практически аналогичными стимулирующими свойствами исходной версии OptoSTIM. Он был применен для активации панкреатических β -клеток, нейронов мышцы, стимуляции транспорта факторов транскрипции и т.д.[139], и представляет собой еще один пример попытки сместить возбуждение онтогенетических инструментов в инфракрасную область.

Бактериальные опсины

Отличительной чертой опсинов является быстрая кинетика активации/ инактивации (мсек-псек), позволяющая им воспроизводить частоты стимулирующего излучения вплоть до 100-200 Гц в зависимости от типа опсина [142], что в течение последних 10-ти лет сделало их основными инструментами оптогенетики.

Природные бактериальные опсины представляют собой мембранные ретиноидные фоточувствительные белки (рисунок 15А), для правильного функционирования которых необходимо связывание ретиналиевого хромофора, расположенного между 7-ю мембранными α -спиралями белка, формирующими пору для проведения ионов (рисунок 15Б)[143]. При поглощении кванта света транс-ретиналь изменяет свою конформацию на 13-цис-ретиналь, что приводит к конформационным изменениям в полости опсина и транспорту по системе водородных связей преимущественно катионов, таких как Na^+ , H^+ , а также K^+ и Ca^{2+} [144].

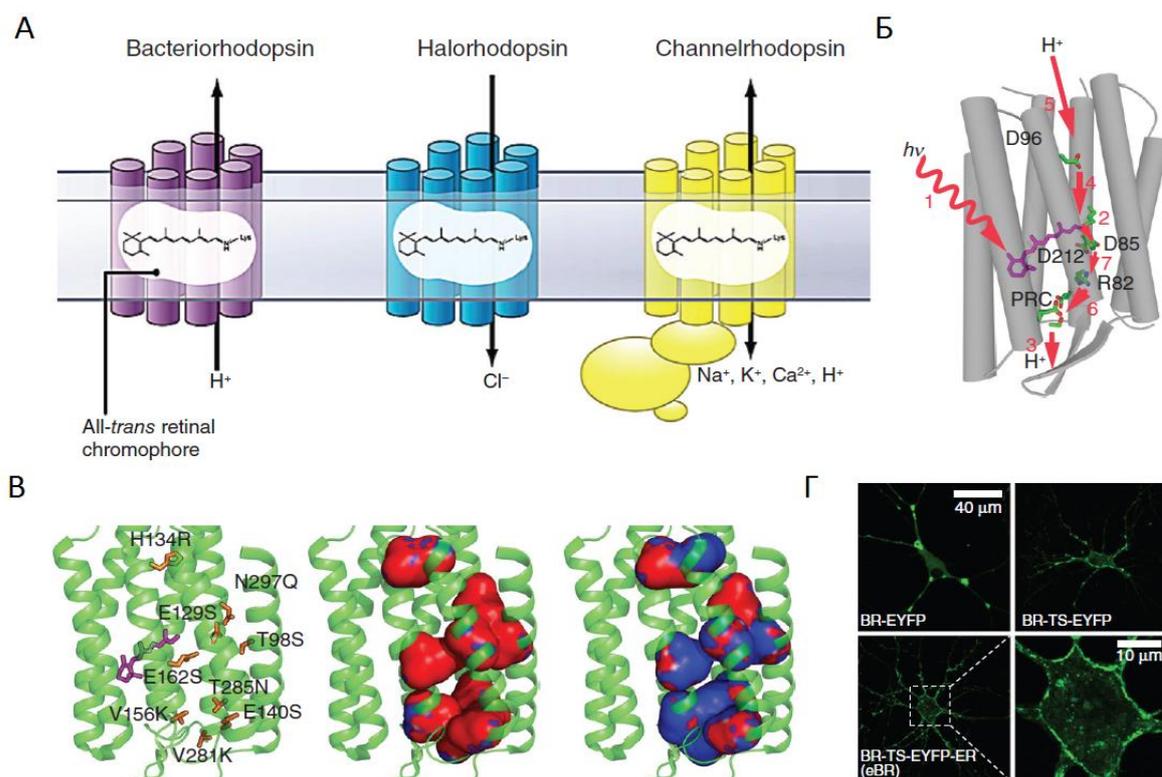
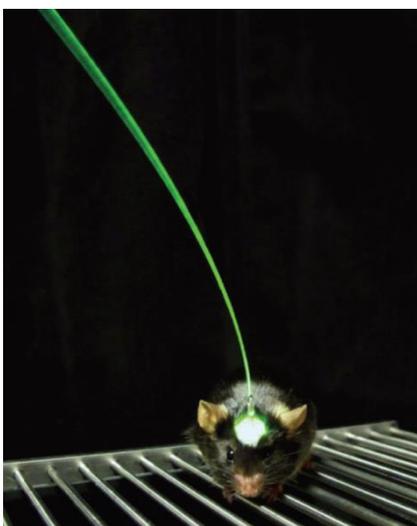


Рисунок 15. Свойства опсинов. А) Строение бактериородопсинов, галородопсинов и модифицированных опсинов. Б) Вторичная структура ChR, строение хромофора. Выделены остатки Asp85, Asp96, Asp212, Arg82, обеспечивающие миграцию протона по внутреннему каналу, т.н. протонтранспортный комплекс (PRC). В) Схема конформации ретиналя при переходе из транс в 13-цис конформацию. Трансмембранные спирали (зеленый) формируют гидрофобный карман связывания ретиналя (пурпурный), выделенные остатки формируют внутренний канал. Сперва показаны сайты направленного мутагенеза, позволяющие улучшить проводимость или менять селективность опсина, отрицательно (красный) и положительно (синий) заряженные. Г) Локализация флуоресцентных производных бактериального родопсина (BR) и EYFP; экспрессия в клетках HEK293 (слева сверху), эффект добавления транспортного сигнала нейритов (TS) (справа сверху), комбинация TS и сигнала транспорта в ЭПР (ER) в нейроне мыши в культуре (нижний ряд). Перевод из [145].

В эволюции синтетических бактериальных опсинов можно выделить 2 основных направления, направленных на: а) модуляцию проводимости индивидуальных каналов; б) на расширение панели спектральных свойств инструментов.

Индивидуальные мутации H134R и T159C увеличивают ионную проводимость ChR2 (собственно, наиболее распространенный на практике вариант ChR2-H134R), мутации T159 и E123 в комбинации (ET/TC) также увеличивают проводимость и кинетику активации опсина относительно исходного ChR2 из *Chlamydomonas reinhardtii* (рисунок 15B)[146]. Среди вариантов производных ChR2, ChIEF, химера, состоящая из элементов ChR1 и ChR2, обладает наиболее высокой проводимостью вместе с наиболее быстрой кинетикой активации относительно ChR2 [147]. Также можно отметить, что ChIEF практически не пропускает двухвалентные катионы, и является одним из наиболее специфичных к Na^+ бактериальных опсинов.



Эксперименты по изменению селективности опсинов привели к появлению CatCh[148], опсина, проницаемого преимущественно для Ca^{2+} . Он позволяет проводить одновременно деполяризацию клетки и стимуляцию входа Ca^{2+} . Наиболее высокой проводимостью, совмещенной с крайне медленной кинетикой инактивации обладает опсин ChR2-XXL[149], активация которого вызывает множественные потенциалы действия в течение 76 ± 12 сек.

Рисунок 16. Мышь с интегрированным в мозговую ткань оптоволоконном. Рисунок из [145].

Другим вектором развития опсинов стало смещение их спектральных свойств в длинноволновую область. Природные опсины в основном возбуждаются синим светом, доставка которого в образцы, превышающие по толщине 3-4 слоя клеток, требует оптоволоконной системы доставки лазерного излучения (рисунок 16), а в случае животных операции для создания краниального окна в черепе и интеграции оптоволоконна в области, которую собираются стимулировать.

Первым шагом к расширению спектральной панели опсинов стало открытие галородопсинов TRP1-2, природных опсинов, поглощающих преимущественно желтый свет 568, 588 нм и выделенных из штаммов бактерий *Halobacterium halobium* [150]. Они представляют собой помпы для анионов Cl^- , и их активация вызывает гиперполяризацию нейронов и ингибирование нейронных сетей. Они расширили панель инструментов оптогенетики в

сторону ингибирования активности, позволив регулируемо включать и выключать заданные группы нейронов с помощью комбинации ChR/TPT. Путем направленного мутагенеза из аналогов TPT из *Natronomonas pharaonis*, были получены галородпсины линии NpHR, eNpHR[151], которые отличает сниженная относительно TPT токсичность, отсутствие агрегации при экспрессии с ЭПР или комплексе Гольджи, а также большая проводимость. Несколько худшими аналогами гиперполяризующих опсинов являются синтетические производные ChR2 с изменённой ионной селективностью, способные пропускать анионы (iChloC, iC⁺⁺, GtACR) [152, 153], которые обладают синим спектром поглощения ChR2, что делает их неприменимыми совместно с большинством опсинов, а также медленная кинетика их активации (10-ки мсек) осложняет их применение.

Затем был выделен первый красный опсин C1V1 из *Volvox carteri*, имеющий максимум возбуждения 589 нм [154]. Его открытие позволило селективно управлять активацией различных областей путем специфической экспрессии в различных регионах мозга различных версий ChRs, но пока глобально не решило проблему доставки излучения в мозг. После расшифровки структуры C1V1[155] была получена его хлор-специфичная версия iC1V1[156], первый ингибирующий опсин с максимумом возбуждения 587 нм. На C1V1базе был получен синтетический красный опсин ReaChR (*Red-activatable Channelrhodopsin*)[157], который возбуждается светом в области длин волн 590-630 нм. Авторы смогли активировать его без сверления черепа животного, установив оптоволокно в слуховой проход животного в модели стимуляции двигательных центров вибрисс.

Интересным представителем группы ингибиторных «синих» опсинов является фотопереключаемый опсин SwiChR (*Step-Waveform Inhibitory ChannelRhodopsin*), он селективен к анионам хлора и может быть активирован синим светом (475 нм), остается активным даже в по окончании световой стимуляции, но при стимуляции красным светом (632 нм) SwiChR претерпевает конформационный переход, блокирующий анионный канал, что приводит к инактивации опсина [153].

Спектр возбуждения «красных» опсинов C1V1, ReaChR практически целиком входит в спектр поглощения ингибирующих «жёлтых» NpHR, eNpHR, поэтому в случае их совместного использования необходимо использовать очень узкие спектральные полосы.

На этом на сегодняшний день движение бактериальных опсинов в сторону длинноволнового активирующего света заканчивается, но использование в оптогенетике двухфотонного возбуждения, позволило почти двукратно увеличить длину волны возбуждающего

света для C1V1 (1100-1200 нм), и применить его без сверления краниального окна для активации дендритов нейронов трансгенной мыши в процессе изучения формирования памяти [158]. Побочным эффектом двухфотонной стимуляции стал сильный разогрев черепа и кожи животного в процессе стимуляции, т.к. двухфотонная стимуляция C1V1 оказалась менее эффективной, чем однофотонная. Также неизвестно, изменяется ли кинетика активации опсинов при двухфотонной стимуляции, что может иметь решающее значение в случае высокочастотных стимуляций.

Таким образом, с начала своего развития «быстрая» оптогенетика, позволяющая проводить стимуляцию клеток в течение миллисекунд развивалась в направлении улучшения проводимости используемых ей белков и решения проблемы доставки света в глубокие слои образца, остановившись на отметке 620 -630 нм в однофотонном режиме и 1100-1200 нм в двухфотонном режиме.

Сегодня на этой отметке проходит граница между методами оптогенетики и термогенетики.

1.5.3. Термогенетика

Термогенетика представляет собой подход для регуляции активности клеток с помощью термоактивируемых каналов надсемейства TRP, применимый как для модельных клеточных культур, так и для животных *in vivo*. Часть способов активации каналов в термогенетике можно отнести к группе методов оптогенетики, т.е. методики активации клеток с помощью света, с тем отличием, что «свет» в данном случае относится к не видимому излучению, а чаще всего инфракрасному (ИК) [159], сверхвысокочастотному (СВЧ) [160], либо радиоволновому излучению. Однако в простейшем случае активация достигается общим изменением температуры среды.

Терморесепторы большинства организмов, представленные каналами TRPA1[104], TRPV1[113], являются неселективными катионными каналами, т.е. способны при активации пропускать через себя гидратированные катионы Na^+ , H^+ , K^+ , Mg^{2+} и Ca^{2+} .

TRPA1, TRPV1 большинства организмов формируют гомотетрамеры, каждый мономер длиной ок. 985-1113 а.о. имеет крупный N-концевой цитоплазматический домен, несущий 14-18 анкирин-подобных повторов (10-12 а.о.), 6 мембранных α -спиралей и короткую цитоплазматическую C- петлю, участвующую в тетрамеризации и связывании химических агонистов (рисунок 17) [161-163]. Между трансмембранными спиральями S5и S6 формируются 2 короткие спирали, образующие погружающийся внутрь поровый элемент, отвечающий за низкую селективность и высокую проводимость TRPA1, TRPV1.

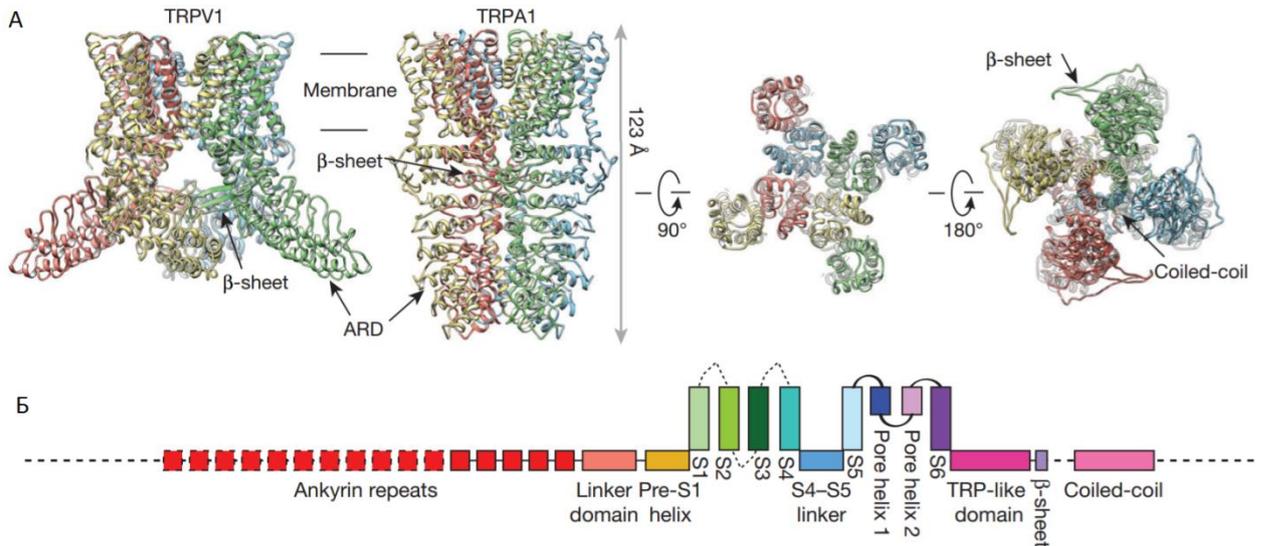


Рисунок 17. Структура терморецепторов. А) Расшифровка кристаллической структуры TRPV1, TRPA1. Отдельные полипептидные цепи выделены цветом. Б) Схематическое представление гена TRPA1. Приведено с изменениями из [163].

Преимущественно через TRPA1 и TRPV1 в клетки поступают катионы Ca^{2+} , т.к. градиент между внутри- и внеклеточной концентрациями этого катиона максимален. Диаметр поры TRPA1, TRPV1 на 3 порядка больше, чем у натриевых светочувствительных ChRs (*ChannelRhodopsine*) [164], поэтому иногда в литературе их называют «кальциевыми», что отражает не столько их строение, сколько функцию. Описанные TRP каналы относительно быстро (30 -100 мсек) активируются и инактивируются, т.к. являются рецепторами физического воздействия (температуры), а также имеют ряд химических агонистов, способных приводить к их активации (алилизотиоционат АИТС, капсаицин Csp и др.) за счет окисления остатков цистеина в С-чувствительной части канала [165, 166].

Механизм работы TRPA1, TRPV1 до сих пор неизвестен полностью, и, очевидно, он отличается у различных подсемейств, т.к. функция термочувствительности возникла и исчезла в процессе эволюции в довольно далёких представителях подсемейств, а также претерпела разделение с восприятием боли и холодовой чувствительностью в подсемействе TRPM [167].

Эмпирический механизм работы TRPs предполагает, что при повышении температуры образца до определенного значения (температурный порог, пороговая температура) канал открывается и пропускает через себя катионы, активируя клетку. Чем быстрее повышается температура, тем быстрее активируется канал, чем выше конечная температура (в

пределах физиологических значений), тем быстрее возникает активация клетки, что сходно с зависимостью от интенсивности света кинетики активации ChRs [104, 113]. Для TRPV1 известно, что профиль ионной проводимости индивидуального тетрамера следует за профилем тепловой стимуляции и период рефрактерности (послеактивационной инертности) настолько короткий, что его зачастую невозможно измерить [168].

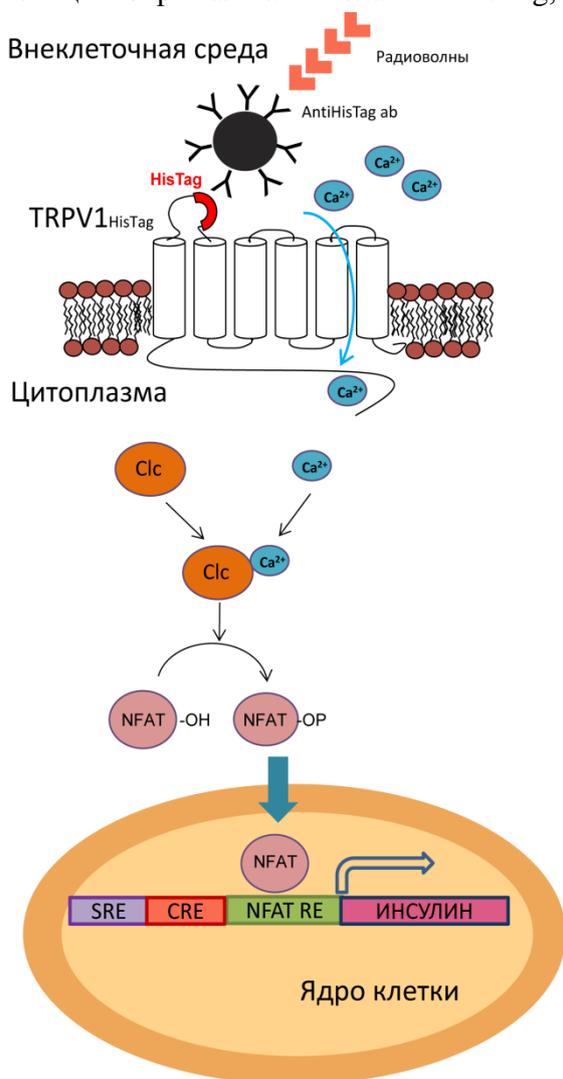
Для TRPV1 предложено несколько моделей тепловой активации, основанных в основном на миграции гидрофобных остатков, находящихся в верхнем липидном слое мембраны, во внеклеточную среду, что приводит к разрушению структуры боковых β -листов в субъединицах канала [169] и [170]. На основе этой модели был предложен способ синтетически сенсibilизировать рецепторы к температуре, устанавливая ключевые для активации остатки с помощью моделирования. Этот опыт был реализован для K^+ потенциал-зависимых каналов Kv1. Но авторам так и не удалось получить порога активации канала, отличного от 36-37 °C [170], характерного для TRPs с нарушением функции термочувствительности.

Относительно TRPA1 змей (eoTRPA1, saTRPA1) [104], а также TRPA1 человека известно, что перенос части ключевых анкириновых повторов рецептора может изменять его термочувствительность. Так повторы 3-8 формируют термоэнхансер, усиливающий реакцию рецептора на изменение температуры, а повторы 10-15 формируют первичный термочувствительный центр [171]. Если перенести эти элементы от TRPA1 змей (eoTRPA1 или saTRPA1) на место аналогичных в гене TRPA1 человека, который утратил чувствительность к температуре, то у TRPA1 человека появится термочувствительность, причем аналогичная донорному TRPA1 змей. При переносе только повторов 3-8 эта функция будет слабой, почти на порядок слабее исходного канала, при переносе только термоэнхансера 10-15, термочувствительность TRPA1 человека не проявляется.

Термоактивируемые каналы позволяют использовать для активации длины волн т.н. «оптического окна» (960-2100 нм), где основные пигменты живых организмов: меланины, кератины, гемоглобин, - практически не поглощают, что важно для таких плотных и глубоких органов, как сердце и мозг, а также TRP могут быть активированы СВЧ-излучением, или высокочастотным магнитным полем при введении специфических магнитных наночастиц [111, 172].

Пионерскими в области безволоконной стимуляции экспериментами стали работы по использованию крысиного TRPV1 для активации глубоких слоев мозга. Этот рецептор относится к одним из наиболее изученных, и характеризуется нестабильным и высоким порогом активации, который в зависимости от системы активации колеблется от 39 до 43 °C [102].

Авторы встраивали в первую внеклеточную петлю TRPV1 канала эпитоп HisTag (6xHis), который служил местом связывания антител к нему (рисунок 18). Магнитные частицы покрывали антителами к HisTag, делая возможной специфическую доставку магнитных частиц к рецептору.



ных частиц к рецептору.

Рисунок 18. Схема регуляции метаболизма глюкозы в крови мыши с помощью термогенетики [172]. Магнитные частицы, покрытые антителами к HisTag, связываются с эпитопом HisTag на поверхностной петле TRPV1. Стимуляция радиоволновым излучением приводит к активации TRPV1 и входу в клетки катионов Ca²⁺. Это стимулирует фосфорилирование транскрипционного фактора NFAT кальциевозависимой киназой Clc (calcineurin), фактор NFAT транспортируется в ядро клетки и запускает синтез инсулина с интегрированной в геном с помощью Cre-рекомбиназы вставки.

Этот модифицированный рецептор TRPV1 был использован в аналогичной схеме активации для индукции синтеза инсулина у трансгенных мышей (рисунок 18) [172]. В качестве альтернативного способа активации авторы синтезировали магнитные частицы внутри клеток, трансфицировав TRPV1⁺ клетки дополнительными копиями гена ферритина, эндогенного клеточного белка, 24-х субъединичный комплекс которого может содержать до 4000 атомов Fe²⁺ [173]. Эти клетки также демонстрировали повышение уровня кальция в цитоплазме при стимуляции радиоволновым излучением, всего на 1/3 уступая по эффективности клеткам, которые стимулировали с помощью неорганических магнитных частиц [172]. Для улучшения связывания частиц ферритина с TRPV1 легкая цепь ферритина была слита с геном EGFP, а к С-концу TRPV1 был добавлен ген короткого антитела к EGFP, в результате чего олигомеры ферритина сорбировались на С-конец TRPV1 через мостик из антитела.

В другой работе сайт специфического связывания магнитных частиц у TRPV1 отсутствовал, а магнитные частицы для стимуляции высокочастотным магнитным полем (465 кГц, радиоволны) были введены в мозг экспрессирующей TRPV1 мыши с помощью стереотаксиса. При включении магнитного поля наблюдали нагрев мозга в области локализации магнитных частиц и активацию нейронов, которую регистрировали по активации синтеза

EGFP под контролем *c-fos* [111]. Специфичность активации авторы тестировали на клетках HEK293FT, экспрессирующих TRPV1 и генетически-кодируемый сенсор GCaMP5, при стимуляции клеток переменным магнитным полем возрастание кальциевого сигнала наблюдали только у клеток, экспрессирующих TRPV1.

Существует работа по активации TRPV1 с помощью ультразвука, положившая название методу «соногенетика», которая предполагает активацию механо- или терморепцепторов с помощью ультразвука [171]. Он был применен на модели регуляции направления движений *C. elegans*, но результаты этой работы заслуживают критической оценки и не раз были оспорены.

В более простых экспериментальных схемах термогенетическая активация экто-термных животных достигается за счет изменения температуры окружающей среды, что приближает данный подход к хемогенетическому: медленная ненаправленная активация и инактивация большой популяции нейронов.

В этом случае образец просто помещают в камеру с регулируемой температурой и проводят анализ поведения животного в зависимости от температуры. Этот подход часто используется в работе с пойкилотермными (холоднокровными) животными, такими как *Drosophila sp.* (дрозофила) [174, 175] и *Danio rerio* (zebrafish) [106, 112], а специфичность активации регулируется с помощью ткане- или органоспецифического контроля экспрессии TRPs на молекулярно-генетическом уровне.

Наиболее специфический активатор должен быть как можно менее инвазивен и как можно более незаметен для образца. Излучение, необходимое для активации термочannels, невидимо для живых организмов, что снижает влияние стресса животного в процессе стимуляции. За счет низкого поглощения собственными пигментами, инфракрасное и СВЧ излучение не вызывает фототоксических эффектов в первых слоях тканей образца, т.к. нет нужды 50-90-тикратно увеличивать дозу излучения, как это делается в случае синего света, используемого для активации ChRs, из-за поглощения в верхних слоях образца.

Впервые ИК излучение для активации организма *in vivo* было применено на модели стимуляции двигательной активности и брачного поведения *Drosophila sp.*, получившей название FlyMAD [159]. Авторами были получены линии мух, конститутивно экспрессирующих собственные dTRPA1 дрозофилы под общим нейрональным промотором, а также с использованием промоторов, специфических для мотонейронов и нейронов, активирующихся при брачном поведении. Была создана установка, позволяющая удерживать в фокусе лазерного пучка (800 мкм) как всю муху, так и фокусироваться на отдельных её частях

(усики, торекс, брюшко) и нагревать их. Активация поведения была достигнута за счет стимуляции с помощью dTRPA1 двигательных нервов, а остановка - за счет стимуляции ингибиторных нервов мухи.

Авторам впервые удалось продемонстрировать относительно локальный (на уровне части тела) регулируемый температурный контроль поведения животного *in vivo* с помощью термогенетики.

Термогенетика работает с таким базовым свойством объекта, как температура, поэтому в процессе эксперимента следует вести ее тщательный контроль, т.к. все живые организмы имеют собственный температурный оптимум, и выход за его пределы приведет к активации эндогенных температурных рецепторов, болевому шоку или гибели клеток в образце.

Также важно уделять внимание сочетанию живой модели, термочувствительного канала (его порог должен находиться в пределах физиологической нормы модели, и, желательно, быть ниже, чем порог собственных терморепцепторов) и способа доставки излучения. Например, существуют данные о неспецифической стимуляции нейронов, а также эукариотических клеток НЕК293 с помощью ИК [176], и специфические методы повреждения клеток с помощью фемтосекундных ИК импульсов, используемые, как способ трансфекции [177]. Для модельных организмов, имеющих собственные высокочувствительные температурные каналы, (например, dTRPA1 для *Drosophila sp.*, drTRPV1 для *Danio rerio*, mmTRPV1 и mmTRPV3 для *Mus musculus*), возможно использование как собственных TRPs, так и TRPs других организмов, например, летучих мышей *Desmodus rotundus* или различных видов змей. В случае использования собственных каналов экспериментатор вынужден использовать высоколокальные методы активации, т.к. собственные термоканалы экспрессируются в определённых органах и тканях животного, либо, как это было сделано для TRPV1 мыши, необходимо инактивировать экспрессию собственных терморепцепторов в областях, активацию которых проводить не входит в план эксперимента. Также существует риск вторичной регуляции активности TRPs с помощью клеточных белков, т.к. высока вероятность встречи термоканалов и их потенциальных белков-партнеров, а также ферментов, регулирующих активность TRPs в данном организме [107, 178].

С другой стороны, использование собственных TRPs увеличивает вероятность эффективной работы канала в выбранном модельном организме, а также то, что порог активации TRPs будет лежать в области физиологических температур животного.

Использование TRPs, привнесенных в организм из других источников, может нести риск иммунного ответа на чужеродный белок, изменение исходных параметров работы канала, например, его кинетики работы или порога активации, но, в свою очередь, этот подход

позволяет наиболее оптимально подобрать порог активации для модельного организма, задать специфичность и/или возможность индукции экспрессии TRPs.

Выбор метода для стимуляции или ингибирования активности клеток должен учитывать ограничения, налагаемые видом выбранной стимуляции. Так методы хемогенетики предполагают ограничение распространения лигандов диффузией, скоростью и распространением веществ в ликворе и крови животного, а также медленную кинетику активации и инактивации используемых рецепторов.

Методы оптогенетики имеют ряд недостатков, связанных в основном с ограничениями по доставке активирующего видимого света в глубокие слои ткани и низкой проводимостью индивидуальных белков-опсинов, бактериальных опсинов, являющихся главными инструментами быстрой оптогенетики. Так при оптоволоконной доставке излучения в диапазоне 350-635 нм на расстоянии 1 мм от торца оптоволокна теряется около 90% мощности излучения [179], что приводит к использованию избыточных мощностей стимуляции, которые обладают фототоксическим эффектом [180]. Использование двухфотонной стимуляции требует дополнительных исследований по эффективности активации опсинов в двухфотонном режиме, а также может быть связано с нагревом ткани и различным побочным эффектам активации. Термогенетика позволяет «сместить» возбуждение рецепторов в область длинноволнового ИК излучения, которого более эффективно проникает в ткани живых организмов, а также использовать СВЧ и радиоволновое излучение для активации объектов.

Сегодня панель инструментов, используемых в термогенетике, представлена только неселективными катионными каналами TRPA1, TRPV1, TRPV3-4 [102, 104, 106, 112, 113, 159]. Среди представленных в области термогенетики работ отсутствуют примеры охарактеризованной быстрой и локальной активации терморекцепторов, что в некоторых случаях связано с используемыми рецепторами, а зачастую с характеристиками установок, использованных для активации клеток, также исследователи в основном используют собственные или эволюционно близкие механо- и термочувствительные каналы для активации образцов. Расширение панели термочувствительных каналов, описание кинетических характеристик их работы, тестирование эволюционно отдаленных терморекцепторов дополнит наши знания о параметрах работы TRPs и разработка установок по локальной и быстрой активации терморекцепторов расширит круг моделей, в которых термогенетика может быть предпочтительной альтернативой хемо- и оптогенетике.

Применение и подбор условий экспрессии термоактивируемых каналов змей подробно описано в разделе «Термогенетика» в результатах настоящей работы.

ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

Цель настоящей работы заключалась в создании и применении генетически кодируемого флуоресцентного сенсора для детекции пероксида водорода HyPerRed, обладающего спектральными свойствами красных флуоресцентных белков, а также в разработке методов активации клеток с помощью термочувствительных белков TRPA1 змей.

Для выполнения сформулированной цели были поставлены и реализованы следующие задачи:

1. Методом направленного мутагенеза создать и провести отбор клонов красного генетически кодируемого сенсора для детекции пероксида водорода HyPerRed.
2. Охарактеризовать сенсор для детекции пероксида водорода HyPerRed в условиях *in vitro* и *in vivo*.
3. Оценить возможность использования биосенсора HyPerRed в условиях физиологической стимуляции продукции пероксида водорода.
4. Оптимизировать и охарактеризовать флуоресцентные химеры термочувствительных каналов змей TRPA1 для экспрессии в культуре клеток млекопитающих, включая нейроны.
5. Провести *in vivo* стимуляцию поведения избегания у личинок *Danio rerio* с помощью активации термочувствительных каналов змей TRPA1.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Оборудование

Автоматические пипетки (Gilson; Eppendorf); настольная центрифуга MiniSpin (Eppendorf); Вортекс Model CV1500; водный термостат TW203 (ELMI); суховоздушный термостат Термит (ДНК-Технология); термостатируемый шейкер Exella E25 (New Brunswick Scientific); УФ-трансиллюминатор TF-20M; анализатор изображения Alpha Imager 2000 (Alpha Innotech Inc.); электропоратор MicroPulser (BioRad); CO₂ инкубатор; культуральный ламинарный шкаф Labconco Logic Class II type A2; флуоресцентный микроскоп Leica DMI 6000 B; флуоресцентный бинокляр Olympus US SZX12; спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian); инъектор PLI-100A (Harvard Apparatus); оборудование для горизонтального гель-электрофореза: GNA-200, Hoefer HE33 (Pharmacia), Minicell EC370M (E-C Apparatus Corp.); весы Чюа JP2-300 (Anselma-Industrie); ультразвуковой гомогенизатор Sonic Vibra cell 5, кюветы для электропорации (BioRad), кюветы для спектрофлуориметра Sarstedt; амплификатор Biorad C-1000 Touch (MJ Research, США), камера для горизонтального электрофореза с источником питания EC370 Minicell (E-C Apparatus, США), ламинарный бокс 2го класса защиты (ESI-FluFrance), камера Горяева, CO₂ инкубатор, водный термостат, вихревая мешалка, набор хирургических инструментов: ножницы, пинцеты, офтальмологические пинцеты (Dumond).

2.2. Материалы

2.2.1. ДНК-Вектора

pQE30, pQE30-mNeonGreen, pDest:Huc:GCaMP6s, pGL3-cmv-IRES2-EGFP (Addgene). Вектора pLVT-mcs, pQE30-HyPer, pQE30-HyPerRed, pC1-HyPer, pC1-Hyper2, pC1-HyPer3, pC1-HyPer2-IMS, pC1-HyPer-dmito, pC1-HyPer-dmito и все производные термоактивируемых каналов были разработаны в нашей лаборатории; вектора, кодирующие caTRPA1, eolTRPA1 были подарены лабораторией проф. D. Julius (Канада), вектор pDest-z-crest3-LexA-LexAop-ChEF-tdTomato был подарен лабораторией A.Sagasti (США), вектор pcDNA3.1-cmv-R-GECO1 был подарен лабораторией R. Campbell.

2.2.2. Реактивы и расходные материалы для клонирования

В настоящей работе использовали реактивы: этанол 96%, изоамиловый спирт, изопропиловый спирт, уксусная кислота, гидроксид натрия, гидроксид калия, хлорид калия, ацетат калия, соляная кислота, ампициллин (Sigma), канамицин (Sigma), додецисульфат

натрия (SDS), тетраборат натрия гексагидрат, цитрат натрия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, соляная кислота, хлорид магния гексагидрат, агароза (Sigma), трис-гидрокси-метиламинометан (Tris), бромистый этидий, глицерин, акриламид, метиленбискриламид, бакто-агар, смесь dNTPs, деионизованная вода milliQ, β -меркаптоэтанол, АИТС (Sigma), H_2O_2 (Диа-М), тапсигаргин (Sigma), цианид *m*-хлорофенилгидразон СССР (Sigma), ротенон (Sigma), бычий сывороточный альбумин (SibEnzyme, NEB).

Коммерческие ферменты: Для клонирования были использованы рестриктазы Vsp1 (Ase1), Asu NH1 (Nhe1), CciN1 (Not1), EcoR1, HindIII BamHI, SmaI, SalI, ApaI, NotI, NdeI, XhoI, NaeI, KpnI, XbaI (NEB, SibEnzyme), полимеразы Encyclo (Evrogen), Phusion High Fidelity (NEB), Tersus (Evrogen), Taq (Evrogen) с прилагаемыми соответствующими буферами; дезоксирибонуклеотиды (dNTPs) (Fermentas) лигаза T4 (Evrogen). Олигонуклеотидные праймеры для проведения ПЦР были синтезированы фирмой Evrogen

Коммерческие наборы реактивов: наборы для очистки ДНК (Qiagen); набор реактивов для экстракции ДНК из геля и реакционных смесей (Евроген); набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid MiniPrep (Евроген); маркер для электрофореза нуклеиновых кислот 1 kbase ladder (SibEnzyme); готовая смесь для ПЦР ScreenMix (Евроген).

Реактивы для выделения белка: Смола TALON (Clontech), имидазол (Sigma), для очистки белков использовали колонки с готовым носителем Micro Bio-Spin P-30 Tris Chromatography Columns (BioRad), сефадекс G-50 (GE Healthcare Life Sciences). В качестве амма для клонирования и экспрессии был использован штамм XL1Blue (life technologies).

Эукариотические коммерческие линии клеток: в работе использовали клетки линии HeLa-Kyoto (предоставлены профессором С.Schultz (European Molecular Biology Laboratory, Германия)), HEK293 (АТСС).

При работе с эукариотическими клетками использовали: трансфецирующий реагент FuGene HD (Roche), X-tremegene 9 (Roche), Lipothectamine LTX (Life technologies), среду, DMEM (ПанЭко), FBS fetal bovine serum heat inactivated (РАА), антибиотики стрептомицин и ампициллин (ПанЭко), раствор Versen (ПанЭко), раствор Хэнкса с 20 mM HepesNa (ПанЭко), среду OptiMem (Sigma), Image Media: DMEM без фенолового красного и бикарбоната натрия, не содержащая инактивированной бычьей сыворотки, добавлен 20 mM HepesNa и 20 mM глутамин (Sigma). Для культивирования первичной диссоциированной культуры нейронов использовали: среда Neurobasal, инактивированная эмбриональная бычья сыворотка, поли-D-лизин 150 кДа, добавки B27, GlutaMax, соли Tyrode, бескальциевый раствор HBSS, набор для кальциевой трансфекции Calcium Phosphate Transfection Kit, цитарабин (Invitrogen, США), лёд, деионизованная вода. Также были использованы 75 см²

флаконы (ЛабТэк), пластиковые пробирки на 15 и 50 мл, клеточное сито на 70 мкм (Falcon, USA), 35 мм чашки со стеклянным дном (MatTek), восьми луночные слайды (Ibidi).

Разведение *Danio rerio*: в работе использовали *Danio rerio* линии АВ (дикий тип), среда для выращивания эмбрионов ЕЗ (5 мМ NaCl, 0.17 мМ KCl, 0.33 мМ CaCl₂, 0.33 мМ MgSO₄, and 0.1% метиленовый синий, pH 7.0), трикаин (Sigma).

Буферные растворы:

буфер TAE - 50 мМ Трис-ацетат (pH 8,0); 20 мМ ацетат натрия; 2 мМ ЭДТА.

буфер для нанесения ДНК для агарозного электрофореза - ксиленианол 0,1%; бромфеноловый синий 0,1%; SDS 0,5%; ЭДТА 1 М pH 8; глицерол 50%.

Раствор для реперфузии (в мМ: 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 27.5 глюкозы, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂ и 1.5 MgCl₂, pH 7.4) преаэрированный в 95% O₂, 5% CO₂.

Система растворов для определения pH-чувствительности белков: – 40 мМ натрий цитратные буферы, 150 мМ KCl, pH 2,5-6,0; 40 мМ фосфатные буферы, 150 мМ KCl, pH 6,5 – 8,5; 40 мМ натрий тетраборатные буферы, 150 мМ KCl, pH 9,0- 12,0.

Микробиологические среды:

Среда SOB: 2% триптон, 0,55% дрожжевой экстракт; 0,01 мМ Трис-HCl pH 8,0; 10 мМ NaCl; 10 мМ KCl; 20 мМ Mg²⁺ (в виде MgCl₂ и MgSO₄).

Среду автоклавировали 60 мин при 1 атм. и хранили при температуре -20 °С.

Среда LB: 1% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 0,1% NaCl; 0,01 мМ Трис-HCl, pH 8,0.

Среду автоклавировали 60 мин при 1 атм. и хранили при комнатной температуре. Перед автоклавированием в среду дополнительно добавляли агар (Difco) до концентрации 1,5 %. Для селекции клеток, содержащих плазмиду, в среду добавляли ампициллин до концентрации 50-100 мкг/мл или канамицин до концентрации 35 мкг/мл.

2.2.3. Программное обеспечение

Для сборки схем векторов и анализа ДНК-последовательностей использовали программы Vector NTI (Life technologies), SnapGene (Biotech LCC), а также EditSeq и SeqMan пакета Lasergene (DNASTAR).

Анализ изображений проводился в программе ImageJ (EMBL), обработка данных проводилась в программе OriginPro (OriginLab). Фигуры и иллюстрации были обработаны в программе Illustrator 9 (Adobe). Для статистической обработке по протоколу ANOVA была использована программа SPSS 11 (SPSS Inc.).

2.3. Молекулярно-биологические методы

2.3.1. Амплификация фрагментов ДНК

На стадиях получения конструкций, ненаправленного и направленного мутагенеза, клонирования и тестирования полученных конструкций применяли ПЦР. Амплификацию проводили на приборе PTC-100 Thermal Cycler (MJ Reserch) или C-1000 (BioRad) и протоколу соответствующей полимеразы (Tersus, Encyclo, Taq, High Fidelity Phusion).

При стандартной амплификации с помощью ПЦР каждая реакционная проба содержала термостабильную полимеразу с соответствующим фирменным буфером, праймеры (0,7 мкМ), смесь dNTP (в среднем 0,5 мкМ), матричную ДНК (5 - 100 нг). Для доведения смеси до нужного объема использовали H₂O степени очистки milliQ.

Для получения химерных конструкций, инсерции фрагментов генов и эпитопов, а также для сайт-направленного мутагенеза использовали метод «overlap extention PCR» по протоколу[181]. Этот метод предполагает использование в качестве матрицы и затравки присутствующие в реакционной смеси фрагменты с комплементарными друг другу участками длиной 17-30 п.н.. Оптимизацию и мутагенез линкерных участков также проводили по протоколу «overlap extention PCR» с тем отличием, что перекрывающиеся линкерные участки (6-9 п.н.) были вырождены последовательности ПЦР фрагментов. Случайный мутагенез проводили для улучшения свойств некоторых конструкций с использованием набора для случайного мутагенеза (Clontech) на основе полимеразы Taq. Для ПЦР скрининга бактериальных колоний на содержание вектора с нужной вставкой использовали смесь Screen Mix (Evrogen). Для этого замешивали реакционную смесь по методике производителя с добавлением нужных праймеров, затем к каждой пробе добавляли биомассу клеток отобранных колоний. Перед началом стандартной ПЦР смесь инкубировали 1 мин при 95 °С для экстракции плазмидной ДНК в реакционную смесь.

2.3.2. Электрофорез в агарозном геле

Разделение ДНК фрагментов проводили в 1 % агарозном геле. Гель готовили на TAE буфере с добавлением EtBr до конечной концентрации 0,5 мкг/мл. Электрофорез проводили в этом же буфере. Каждый образец ДНК в объеме 1 - 2 мкл смешивали с небольшим количеством буфера для нанесения. В случае очистки ДНК на геле наносили всю пробу. Для определения длины фрагмента и концентрации ДНК в пробе использовали маркер 1 kbase ladder (SibEnzyme), наносили на гель 100-125 нг в лунку. Для визуализации фрагментов

ДНК гель фотографировали при помощи анализатора Alpha Imager 2000. Для последующего выделения ДНК из геля его анализировали на УФ трансиллюминаторе TF20M под УФ низкой интенсивности

2.3.3. Выделение ДНК из геля

После проведения электрофореза в 1% агарозном геле под УФ трансиллюминатором TF20M вырезали необходимые фрагменты. Для выделения ДНК из геля использовали колонки и реактивы фирмы Евrogen и прилагаемый протокол. Элюцию ДНК с колонки осуществляли 30-50 мкл H₂O milliQ. Полученную пробу анализировали электрофорезом в 1-1,5 % агарозном геле.

2.3.4. Рестрикция

В работе использовали эндонуклеазы рестрикции и соответствующие буферы фирмы SibEnzyme, NEB, следуя прилагаемому протоколу производителя. Коммерческий буфер для работы рестриктаз, BSA, рестриктазы вносили в пробу, следуя протоколу производителя, ДНК вносили в пробу в количестве от 250 нг до 1 мкг пробы доводили до 30 мкл водой milliQ, и проводили рестрикцию на 37 °С в течение 1 ч в случае линейного фрагмента ДНК, и 2-3 ч - в случае плазмидной ДНК. После рестрикции пробы ДНК очищали с помощью набора реактивов для экстракции ДНК из реакционных смесей фирмы Евrogen. В случае рестрикции векторов для приготовления библиотек реакцию рестрикции проводили в пробе объемом 100 мкл, содержащей до 7 мкг целевого вектора.

2.3.5. Переосаждение ДНК этанолом

Метод переосаждения ДНК этанолом использовали для концентрирования пробы или для обессоливания перед электрической трансформацией. К образцу добавляли 1/10 объема 5 М раствора ацетат калия. После перемешивания добавили 3 объема 96 % этанола и центрифугировали 15 мин при 13200 об/мин. Супернатант отбирали, полученный осадок промывали таким же объемом 80 % этанола. После центрифугирования 8 мин при 13200 об/мин, осадок высушивали и растворяли в необходимом объеме H₂O milliQ.

2.3.6. Лигирование

Лигирование полученных фрагментов в вектор (pQE30, pC1) осуществляли с использованием лигазы фага T4 (Sibenzyme). Реакцию проводили в объеме 15 мкл по протоколу производителя. Инкубацию проводили в течение 16 - 18 часов при 14 °С.

2.3.7. Выделение плазмидной ДНК

В работе использовали набор для выделения плазмид методом щелочного лизиса Evrogene Cleanup Standart и Cleanup Mini. Выделение проводили по прилагаемому протоколу.

2.4 Работа с бактериальными клетками

2.4.1. Трансформация бактериальных клеток

Электропорация

Электропорацию проводили для трансформации клеток лигатов, предварительно переосажденным этанолом растворённом в воде milliQ. Компетентные клетки для электропорации, расфасованные по 40 мкл в бессолевом растворе глицерина, хранили на -70° . Перед трансформацией их размораживали 10 минут на льду, добавляли 50-100 нг ДНК и помещали в предварительно охлажденные кюветы для электропорации (BioRad). Электропорацию проводили на приборе MicroPulser (BioRad), программа Ec1. Затем суспензию компетентных клеток смешивали с 1000 мкл среды SOB, инкубировали 40 минут при перемешивании на 37° C и рассеивали на твердую среду LB с антибиотиком.

Химическая трансформация

Также для трансформации бактериальных клеток применяли метод химической трансформации. Компетентные клетки для химической трансформации, предварительно расфасованные по 100 мкл в буфере, содержащем 0,1 M CaCl₂, хранили при -70° . Перед трансформацией их размораживали 10 минут во льду, добавляли 50-100 нг плазмидной ДНК и инкубировали во льду еще 20 мин. После этого их в течение 90 секунд прогревали до 42° и снова помещали на 5 минут в лед для охлаждения. Затем суспензию компетентных клеток смешивали с 300 мкл среды SOB, инкубировали 40 минут при перемешивании при 37° C и рассеивали на твердую среду LB с антибиотиком.

После трансформации бактерии выращивали на чашках Петри с 2,5 % агаром и соответствующим антибиотиком (ампициллин или канамицин) 16-18 часов при 37° C. Затем полученные клоны скринировали либо с помощью ПЦР реакции, либо визуально по уровню флуоресценции под флуоресцентным бинокуляром.

2.4.2. Скрининг колоний бактериальных колоний при помощи опрыскивания раствором пероксида водорода

Чашки с бактериальными колониями при комнатной температуре фотографировали под флуоресцентным бинокулярным микроскопом (Olympus US SZX12), затем опрыскивали из мелкодисперсного пульверизатора водным раствором 200 мкМ пероксида водорода, выдерживали в течение 1-1,5 мин до впитывания капель, и снова фотографировали. Затем обрабатывали оба снимка в программе EMBL ImageJ: вычитали значение фонового сигнала и сравнивали интенсивности флуоресценции отдельных колоний до и после опрыскивания. Если соотношение интенсивностей превышало 1,1, такие колонии пересеивали на новые чашки Петри с агаром и ампициллином и подращивали при 37 °С в течение 10-12 часов, а затем анализировали с помощью флуоресцентного спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse.

2.4.3. Анализ суспензий бактериальных клеток с помощью флуоресцентного спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse

Этот метод позволяет оценить спектральные характеристики полученных химерных белков. Для этого клетки, являющиеся потомками одного отобранного ранее клона, в небольшом количестве отбирали и суспендировали в 1,5-2 мл буфера PBS в кювете для спектрофлуориметра. Детектировали спектры возбуждения или эмиссии соответствующих белков в присутствии и отсутствии насыщающей концентрации пероксида водорода.

2.4.4. Отбор оптимальных клонов из библиотек

Отбор оптимальных (т.е. с наиболее выраженной реакцией на пероксид водорода) клонов, на первом этапе осуществляли с помощью флуоресцентного бинокулярного микроскопа (Olympus US SZX12). Визуально оценивали наличие флуоресценции отдельных колоний *E.coli* в соответствующих областях спектра. Отобранные клоны переносили на новую чашку и подращивали при 37 °С в течение 10-12 часов. На следующем этапе с помощью флуоресцентного спектрофотометра Varian Cary Eclipse оценивали спектральные характеристики полученных химерных белков. Для этого клетки, являющиеся потомками одного отобранного на первом этапе клона, в небольшом количестве отбирали и ресуспендировали в 1 мл буфера PBS в кювете для флуориметра. Детектировали спектры возбуждения в соответствующем интервале до и после добавления к клеткам 200-290 мкМ H₂O₂

2.5. Работа с выделенным белком

2.5.1. Выделение белка из культуры клеток *E.coli*

Клетки *E.coli* штамма XL1Blue были трансформированы целевыми конструкциями в составе вектора pQE30 методом химической трансформации. Клетки были высеяны на чашки Петри с твердой питательной средой и ампициллином (100 мкг/мл) и подращены в течение 14 ч при 37 °С. Затем колонии были пересеяны в 200 мл среды LB и выращивались при 25°С на термостатируемом шейкере при постоянном перемешивании 190 об/мин в течение 36-38ч. Затем клетки осадил центрифугированием с охлаждением в центрифуге Beckman J21 при 4000g в течение 30 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 7 мл 40 мМ Tris-HCl, содержащего 150 мМ KCl , 10 мМ MgSO₄ и 2 мМ меркаптоэтанол (буфер А) и лизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Sonic Vibra cell 5 на ледяной бане в течение 30 мин. Полученный лизат центрифугировали в центрифуге Beckman J21 при 18000g при 4°С в течение 30 мин. Супернатант объемом 3 мл наносили на колонку с Talon Metal Affinity Resin (Clontech) объемом 3,5 мл, уравновешенную буфером (скорость тока жидкости здесь и далее обеспечивается только силой тяжести). Колонку промыли 35 мл буфера А, а затем элюировали белок 40 мМ Tris-HCl, содержащим 150 мМ KCl , 10 мМ MgSO₄, и 200 мМ имидазол. Полученный элюат объемом 1 мл в течение 10 мин нанесли на колонку Sephadex G-5 (GE Healthcare) объемом 5 мл, уравновешенную буфером А для удаления имидазола. Полученный белок был использован для изучения его спектральных свойств на спектрофотометре Varian Cary Eclipse.

2.5.2. Анализ спектральных характеристик белка *in vitro*

Этот метод позволяет оценить спектральные характеристики полученных химерных белков. Аликвоту белка растворяли в 1,5-2 мл буфера PBS в кювете для флуориметра так, чтобы значение интенсивности флуоресценции в максимуме составляло 100-150 единиц (ок 250 нМ белка). С помощью спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse регистрировали спектры возбуждения флуоресценции биосенсоров на основе srYFP с 390 до 510 нм при эмиссии 530 нм. Для сенсоров на основе mApple регистрировали спектры возбуждения 490 нм до 610 нм при эмиссии 630 нм. Для тестирования версий биосенсоров линии НуPer к пробе добавляли H₂O₂, с 6 до 350 нМ, и регистрировали изменения спектра возбуждения флуоресценции окисленного белка.

Для анализа спектра поглощения аликвоту белка растворяли в PBS, и регистрировали спектр поглощения в интервале 200-800 нм, так, чтобы максимальное значение поглощения не превышало 1 ед.п. Коэффициент экстинкции был определен по формуле

$\epsilon_i = \text{Abs}_i * \text{Cprot}(\text{M})^{-1} * l(\text{cm})^{-1}$ где, Abs_i – оптическая плотность, l – длина оптического пути, C – концентрация белка в пробе. Концентрация белка определена с помощью метода Бредфорда и спектрофотометрического метода анализа концентрации хромофора.[182]

Для определения квантового выхода флуоресценции (QY) HyPerRed, а также двух контрольных белков-стандартов mCherry, mKate2 записывали миссии флуоресценции при возбуждении в максимуме флуоресценции (575 нм).

QY определяли по формуле $QY = QY1 * (\text{Abs}_1 * \text{Em}_2 * \text{Abs}_2^{-1} * \text{Em}_1^{-1})$ где Abs_1 & Em_1 поглощение и эмиссия белка-стандарта (mKate2: Abs_{588} Em_{633} ; mCherry: Abs_{577} Em_{610}), Abs_2 & Em_2 – поглощение (Abs_{575}) и эмиссия (Ex_{605}) HyPerRed QY1 – квантовый выход белка-стандарта (mKate2: 0,62 and mCherry: 0,22), QY – квантовый выход флуоресценции HyPerRed.

2.5.3. Анализ pH-чувствительности выделенного белка

Для анализа pH чувствительности пробы, содержащие выделенный белок в одинаковой концентрации, инкубировали в течение 20 мин при 25°C в буферах со значениями pH 2,9 – 12,4 с шагом 0,8. Затем проводили измерение интенсивности флуоресценции в максимумах возбуждения и эмиссии флуоресценции на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse, а также регистрировали спектр флуоресценции белка для каждой пробы.

Для значений pH в диапазоне 2,5 – 6,0 использовали 40 mM цитратные буферы, содержащие 150 mM KCl, для диапазона значений pH 6,5-8,5 использовали 40 mM калий-фосфатные буферы, содержащие 150 mM KCl, для значений pH 9,0-12,0 использовали 40 mM натрий тетраборатные буферы, содержащие 150 mM KCl.

2.6. Работа с эукариотическими культурами клеток

2.6.1. Культивирование и трансфекция клеточных линий HeLa и HEK293

HeLa Kyoto и HEK293: клетки культивировали в DMEM с 10% FBS при 37 °C в присутствии 5% CO₂. Клетки пересаживали раз в 3 дня с использованием 0.25% раствора трипсин-ЭДТА в растворе Версена.

Для микроскопии клетки высаживали на чашки со стеклянным дном или восьмилучные слайды. 24 часа спустя клетки были трансфицированы смесью ДНК и X-tremeGene 9 согласно протоколу производителя. Для этого смешивали 3 мкл реагента трансфекции и 100 мкл Opti-MEM (на один слайд - 4 мкл реагента и 130 мкл OptiMEM) и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Затем добавляли суммарно 1 мкг очищенной для трансфекции ДНК (1.3 мкг на слайд) и инкубировали ещё 25 минут. Затем трансфекционную

смесь добавляли к клеткам и инкубировали в течение ночи. На следующий день питательную среду заменяли свежей, эксперименты ставили в тот же день.

2.6.2. Выделение и трансфекция первичной эмбриональной культуры кортикальных нейронов

Для получения смешанной первичной культуры гиппокампальных нейронов (по протоколу [183] с изменениями), мы брали мышей линии С57, полученных из вивария ИБХ. Перед выделением, центр подложки (35 мм чашки со стеклянным дном или 10, 14, 22 мм покровного стекла) покрывали 100 мкл 0.1 мг/мл раствора поли-D-лизина и инкубировали в течение 40 мин в CO₂-инкубаторе.

На 17м дне беременности мышь декапитировали, эмбрионы анестезировали в ледяной HBSS с низким содержанием Mg²⁺ и Ca²⁺; под бинокулярным микроскопом экстрагировали мозг, полушария отделяли от остальных отделов мозга, тщательно очищали от оболочек мозга и изолировали кортексы. Кортексы собирали в 15 мл пробирку с HBSS на льду, затем трижды промывали в HBSS и инкубировали в 0.25% трипсин-ЭДТА в течение 15 минут на водяной бане при 37 °С. По окончании инкубации кортексы трижды промывали в тёплой DMEM с добавлением 10% FBS и 20 mM глутамина и осторожно разбивали на клетки путём десятикратного ресуспендирования без воздушных пузырьков в 1 мл наколничник автоматической пипетки. Клетки сажали в центр покрытых поли-D-лизином 35 мм чашек со стеклянным дном плотностью 15*10⁴ клеток в 100 мкл среды DMEM, предварительно промытых 3-4 раза по 100 мкл DMEM. 40-90 мин спустя среду заменяли 2 мл среды Neurobasal medium с добавлением B27, 5% инактивированной FBS, 20 mM GlutaMax и пенициллина-стрептомицина. Каждые 2-3 дня 1/3 объёма среды заменяли на свежую нейробазальную среду вплоть до 17го дня.

2.6.3. Трансфекция клеток

Трансфекция одним вектором клеток HeLa Kyoto, HEK293

Клетки HeLa Kyoto рассаживали за сутки до трансфекции на чашки в среде DMEM, содержащей 10% инактивированной эмбриональной сыворотки (PAA Laboratories) из расчёта 20-50 тыс. клеток на одну чашку.

Для трансфекции применяли реагент X-tremegene 9 или FuGene HD и модифицированные протоколы фирм производителей. На 100 мкл среды Opti Mem добавили 3 мкл X-tremegene 9, после интенсивного перемешивания инкубировали 6 минут. К раствору образовавшихся липосом добавляли плазмидную ДНК (1 мкг) в 50 мкл среды Opti Mem, перемешивали и инкубировали 30 минут. Затем трансфекционную смесь добавляли в 2 мл среды

DMEM, содержащей 10% инактивированной эмбриональной сыворотки и инкубировали клетки в ней в течение ночи.

На следующий день среду меняли и на 2 мл свежей среды DMEM, содержащей 10% инактивированной эмбриональной сыворотки. За 15 мин до микроскопии среду во всех чашках заменяли на раствор Хэнкса с вересом без бикарбоната натрия.

Измерение активности сенсоров проводили на первый и второй день после трансфекции.

Котрансфекция несколькими конструкциями клеток HeLa Kyoto, HEK293

При котрансфекции несколькими векторами целевые плазмиды смешивали в 50 мкл среды Opti Mem в равных количествах, чтобы конечное количество ДНК составляло 2 мкг. На 100 мкл среды Opti Mem добавили 6 мкл X-tremegene 9, после интенсивного перемешивания инкубировали 6 минут. К раствору образовавшихся липосом добавляли подготовленную плазмидную ДНК, перемешивали и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Затем трансфекционную смесь добавляли в 2 мл среды DMEM, содержащей 10% инактивированной эмбриональной сыворотки и инкубировали клетки в ней в течение ночи.

Последующие действия проводились аналогично протоколу трансфекции одной конструкцией.

Трансфекция нейронов мышцы в культуре

На 4ый день с момента посадки нейрональную культуру трансфецировали. На каждую 35мм чашку (или стекло любого диаметра), готовили трансфекционную смесь в 100 мкл среды Opti Mem: 2.5 мкл Lipothectamine LTX/ 2 мкл Plus Reagent/ 1 мкг плазмидной ДНК. Смесь инкубировали в отдельной пробирке 10 мин после интенсивного перемешивания, затем трансфекционную смесь добавляли в 2 мл нейробазальной среды в чашке, и инкубировали клетки в ней в течение ночи.

При котрансфекции в расчете плазмид использовали аналогичный проткол, смешивая плазмидную ДНК в соотношении 1:1 по молям.

2.7. Разведение и трансфекция *Danio rerio*

В работе использовали *Danio rerio* линии АВ (дикий тип), культивируемые в ИБХ РАН. Эмбрионы выращивали при 26-28 °С в среде E3 (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, pH 7,0) при световом цикле 12:12. Для трансфекции был использован протокол [184] с некоторыми изменениями: 0.58 d капилляры заполняли 4-7 мкл раствора смеси плазмид в 0.1 М KCl (эксперимент - pC1:CREST3:LexA:LexAop:caTRPA1 с

pC1:LexAop:tdTomato; контроль - pC1:CREST3:LexA:LexAop с pC1:LexAop:tdTomato) и инъецировали в оплодотворенные ооциты на стадии 1 клетки в желточный мешок в объеме 1 нл (PLI-10, Harvard Apparatus). После инъекции эмбрионы выращивали до 1-3х дней и проводили анализ трансфекции эмбрионов с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DM6000. Для анестезии использовали 0.02% раствор трикаина в среде E3.

В среднем на личинку приходилось 40-60% трансфецированных нейронов соматосенсорного типа, что соответствует 10-15 клеткам на один эмбрион.

2.8. Флуоресцентная микроскопия

2.8.1 Микроскопия клеточных культур

Для визуализации флуоресценции трансфецированных клеток использовали флуоресцентный микроскоп Leica DMI 6000 оборудованного ртутной лампой 120W HXP (Osram) в качестве источника света и CCD камерой Photometrics CoolSNAP HQ. Использовали иммерсионный масляный объектив HCX P2 ApoLambda blue 63*1,4 Oil и воздушный объектив 20x1.0 Air.

HEK293, HeLa Kyoto в возрасте 3-4 день после посадки и нейрональные культуры в возрасте 12-14 дней с момента посадки помещали в камеру микроскопа в 1 мл раствора Хенкса (HBSS), содержащего 20 mM HEPES и 20 mM глюкозы при 25, 30 or 37°C. Детекцию флуоресценции проводили в каналах, соответствующих значениям возбуждения и эмиссии флуоресценции использованного в работе флуоресцентного белка: HyPerRed (TX2), EGFR-YFP (GFP), HyPer. Hyper2-3 (FRET: (CFP-YFP) и GFP), tdTomato (TX2), R-GECO1 (TX2), mCherry(TX2), GCaMP6s (GFP), EGFP (GFP), mNeonGreen (GFP). Экспозиция и интенсивность варьировали в зависимости от типа эксперимента. Полученные серии изображений анализировали с помощью программы Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS AF). Конечную обработку и обсчет изображений осуществляли с помощью программы EMBL ImageJ и Excel.

2.8.2. Физиологическая стимуляция клеток HeLa Kyoto и HEK293

При физиологической стимуляции клеткам HEK293 или HeLa Kyoto на первый и второй день после трансфекции промывали 1 мл раствора Хенкса с 20 mM HePesNa, сменяли среду DMEM на 2 мл Image Media (среды DMEM без фенолового красного и бикарбоната натрия, не содержащей инактивированной бычьей сыворотки и витаминов, добавлен 20 mM HePesNa и 20 mM глутамин, концентрация глюкозы низкая (1 г/л)). Клетки переносили в термостатируемую камеру на температуру 37°C на 2 часа.

После этого периода из чашки с клетками в отдельную пробирку отбирали 300 мкл среды, поддерживая её температуру равной 37°C.

Начинали съёмку со следующими параметрами: объектив HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV, экспозиция составляла 100-150 мсек с интервалами 20 секунд. Через 2 мин после начала эксперимента к клеткам добавляли отобранную ранее аликвоту среды (300 мкл) с добавленным EGF (или тапсигаргина) до конечной концентрации 100 нг/мл (или 10 µМ в случае тапсигаргина) в клеточной среде в чашке и продолжали съёмку до 20 мин.

2.8.3. Термогенетическая активация и термометрия клеточных культур

Для обеспечения локального, точно контролируемого нагрева клеток с точностью до 0.1°C был разработан специальный волоконный зонд. Зонд содержит алмазный микрокристалл с плотностью NV центров алмаза достигающей до $10^{16} - 10^{17} \text{ см}^{-3}$, прикрепленный к концу оптического волокна с внешним диаметром 125 мкм, диаметром сердцевины 50 мкм и числовой апертурой $NA \approx 0,2$. Алмаз нагревается при помощи лазерного излучения, прошедшего через волокно, и обеспечивает локальный, хорошо контролируемый нагрев в клеточной культуре. Одновременное локальное измерение температуры осуществляется с помощью оптического детектирования магнитного резонанса, сдвиг частоты которого зависит от температуры. Магнитный резонанс вызван воздействием СВЧ поля, доставленного по двухпроводной линии СВЧ, идущей вдоль оптического волокна и состоящий из пары медных проводов с диаметром 50 мкм каждое, на дефект азотной вакансии (NV) в алмазе, который прикреплен на торце оптического волокна.

Волокно-оптический зонд служит для доставки непрерывного 532 нм лазерного излучения, что приводит, путем лазерного нагрева алмаза, к появлению сферического градиента температуры в окружающей зонд среде, который падает с расстоянием r от алмазного микрокристалла. Соответствующее уравнение теплопроводности дает следующее решение для этого температурного градиента: $T(r) = (R_d/r)(T_d - T_0)$, где R_d является радиусом алмазного микрокристалла на торце волокна, T_d температура алмазного микрокристалла, которая измеряется непосредственно в экспериментах, и T_0 температура в помещении.

Этот же волоконный зонд используется для измерения температуры. Для этого, СВЧ поле, доставляемое через двухпроводную СВЧ линию, интегрированную с волокном, применяется для связывания спиновых подуровней основного состояния NV центра в алмазе, поляризованных 532 нм лазерным излучением, прошедшим через оптический тракт волоконного зонда. Это лазерное излучение смещает 3A основного электронного состояния в возбужденное состояние 3E , приводя к фотолюминесценции, включающую в себя характерную БФЛ, которая наблюдается при комнатной температуре около 637 нм на фоне широкой

фононной боковой полосы, протяженностью до 800 нм. Фотолюминесценции (ФЛ), излучаемая NV центрами при лазерной накачки, лежит в диапазоне длин волн 630-800 нм, собирается с помощью того же оптического волокна, и передается через это волокно к системе регистрации, состоящей из кремниевого фотодиода с низким уровнем шума предусилителя и синхронного усилителя.

Для термогенетической активации нейронов была реализована оптическая система на базе генератора фемтосекундных импульсов на кристалле титан:сапфир (Ti:Sapphire), перестраиваемые в спектральном окне от 710 нм до 980 нм. Излучение данного диапазона далеко от длин волн поглощения гемоглобина и меланина, поэтому соответствует первому окну прозрачности биологических тканей. Для того, чтобы расширить диапазон длин волн для проведения исследований по фотостимуляции в длинноволновой области ближнего ИК диапазон и в область среднего ИК диапазона, был использован оптический параметрический генератор света (ПГС). Накачиваемый сверхкороткими импульсами из Ti:Sapphire лазерного генератора на длине волны 808 нм, ПГС формировал перестраиваемые в области от 1030 нм до 1580 нм импульсы длительностью до 120 фс при использовании сигнальной волны и в диапазоне от 1620 нм до 2100 нм – холостой волны. Лазерная система работала в квазинепрерывном режиме. Энергии одиночных импульсов данной системы составляли единицы наноджоулей, генерирующиеся с частотой 87 МГц, что позволяло очень точно регулировать тепловую нагрузку на культуру клеток. Таким образом, в нашем распоряжении был удобный инструмент для осуществления фотоактивации тепловых каналов в нейронах.

Высокая пространственная когерентность лазерного излучения, в отличие от тепловых и люминесцентных источников излучения, позволяет с легкостью управлять локализацией фотостимуляции и активировать отдельные клетки внутри плотно посаженной культуры. Оптическая система фотоактивации лазерным излучением, регистрации флуоресцентного сигнала клеток и записи поведения модельного организма, несущего термочувствительные каналы, была интегрирована в двухфотонный микроскоп. Для управления пространственным распределением лазерного излучения (размер, положение, мощность) в плоскости культуры клеток, на оптическом столе были собраны оптические телескопы, налажен контроль мощности и центральной длины волны излучения. Область нагрева управлялась размером пучка ИК излучения в фокусе и могла меняться от 30 мкм до 300 мкм. Контроль средней температуры в чашке с культурой клеток осуществлялся при помощи откалиброванной термодпары с точностью 0.1 °С. Базовая температура в измерениях

с помощью флуоресцентной микроскопии варьировалась от 18 °С до 24 °С в зависимости от исследуемых каналов.

В результате работы было выявлено, что наиболее сильный нагрев среды для визуализации культуры нейронов происходит на длине волны 1450 нм. Данное обстоятельство не было удивительным, т.к. эта длина волны соответствует локальному пику поглощения воды. В дальнейшем для активации нейронов мы использовали эту длину волны, что позволяло нам оперировать максимально короткими вспышками света для стимуляции клеток.

Первые эксперименты установили, что непрерывная стимуляция инфракрасным излучением на длине волны 1450 нм мощностью 30 мВт и диаметром пучка 300 мкм вызывает длительное (до 2-3 мин) повышение уровня ионов Ca^{2+} в цитоплазме клеток.

Продемонстрированный подход позволяет локально активировать отдельные нервные клетки в одной культуре, находящиеся на расстоянии от 50 мкм, что свидетельствует о высокой локальности данной системы, а также о её применимости для изучения межнейронных связей в образцах нейронных культур.

Импульсная активация нейронов проводилась как одиночными импульсами длительностью 15 мс на длине волны 1450 нм, так и сериями подобных импульсов с задержкой от 15 до 250 мс. Импульсы длительностью 15 мс формировались путем прореживания квазинепрерывного излучения ПГС на длине волны 1450 нм. Без прореживания общая мощность излучения на образце составляла 140 мВт, следовательно, один импульс имел энергию 2.1 мДж. Излучение фокусировалось в пятно диаметром 50 мкм, что определяет плотность энергии в эксперименте на уровне 100 Дж/см^2 на временном масштабе импульса 15 мс. Разрешение по времени в эксперименте составляло от 10 мс до 45 мс. Временное разрешение определялось системой регистрации кальциевого сенсора.

2.8.4. Химическая и тепловая стимуляция клеток НЕК293

Клетки НЕК293, котрансфицированные *saTRPA1-IRES2-EGFP* или *eo1TRPA1-IRES2-EGFP* и *R-GECO1* в возрасте 2х дней с момента посадки были перенесены в инкубаторы с температурой 25, 30 or 37°C на сутки, на 4ый день с момента посадки часть клеток оставили в неизменных температурных условиях, а часть проинкубировали в течение часа при 25°C. Затем клетки отмыли в раствор Хэнкса с температурой 25°C (для *saTRPA1*) или 30°C (для *eo1TRPA1*). Клетки активировали добавкой подогретой среды для микроскопии под контролем электродного термометра, регистрирующего конечную температуры в среде в образце. Конечная температура составила $30 \pm 1^\circ\text{C}$ (*saTRPA1*) или $38 \pm 1^\circ\text{C}$

(eolTRPA1). В качестве контрольного способа активации использовали химическую активацию каналов эмульсией 200 μM АИТС в растворе среды для микроскопии, которую добавляли к образцу в объеме не менее 1-% (200 мкл) от общего объема среды в образце.

2.8.5. Определение кинетических параметров работы сенсоров

Клетки HeLa Kyoto были посажены на специальные микроскопические слайды (объем дорожки 120 мкл) в количестве 10^3 на ячейку за день до трансфекции. Процедура трансфекции аналогична протоколу трансфекции клеток на чашках, отличие состоит в том, что конечная трансфекционная смесь, содержащая ДНК и липосомы, объемом 150 была внесена в лунки слайдов по 15 мкл/дорожка. После инкубации в течение ночи клетки были переведены в 120 мкл среды DMEM.

Перед микроскопией клетки были промыты и переведены в 120 мкл раствора Хенкса с 20 mM HePesNa. Далее из лунки убрали среду и проводили съёмку в течение 30-20 сек. Непосредственно в объёме дорожки слайда остается жидкость, в то время как лунки слайда пусты. После этого к клеткам добавляли 120 мкл раствора Хенкса с 20 mM HePesNa, содержащего от 6-400 мкМ пероксида водорода. Константа Кох была определена как время достижения 50% сигнала сенсора от момента добавления пероксида водорода. Константа скорости реакции псевдо-первого порядка между сенсором и пероксидам водорода была измерена как $K_s = V/[H_2O_2]$.

Параметры съёмки: объективы: HCX P2 ApoLambda blue 63*1,4 Oil и HCX PL APO CS 40.0x1.25 OIL UV. Экспозиция составляла 100-300 мсек с интервалами 5 секунд.

2.8.6 Иммунофлуоресцентное окрашивание

Клетки на чашке для микроскопии (30-35 мм) на стадии микроскопии (4ый день для НЕК293 и 12-14ый день с сосента посадки для нейронов) промывали 3 раза 1 мл PBS, фиксировали с помощью 1 мл 4% формальдегида в PBS в течение 15 минут на комнатной температуре, промывали 3 раза 1 мл PBS, затем пермеабилizировали 1 мл ледяного метанола (ок 96%) в течение 10 мин, промывали 3 раза 1 мл PBS, затем окаршивали первичными мышинными антителами antiбхHis (HIS -1, Sigma, H1029, 1.3 мг/мл) в растворе 1 мл PBS, содержащим 3% БСА в течение 40 минут на комнатной температуре, затем промывали 3 раза 1 мл PBS, окрашивали вторичными антителами к антителам мыши antimouse-AlexaFluor488 ((Invitrogen, A-21121, 2.3 мг/мл) в растворе 1 мл PBS, содержащим 3% БСА в течение 40 минут на комнатной температуре, затем промывали 3 раза 1 мл PBS, и проводили флуоресцентную микроскопию в канале GFP для AlexaFluor488.

2.9. Электрофизиологическая регистрация активности нервных клеток

Покровное стекло с культурой нейронов в возрасте 12-14 дней переносили в проточную камеру конфокального апрайт микроскопа и промывали раствором для реперфузии (в mM: 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 27.5 глюкозы, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂ и 1.5 MgCl₂, pH 7.4) преаэрированный в 95% O₂, 5% CO₂. Регистрация пэтч-кларп была проведена в режимах current-clamp и voltage-clamp. Боросиликатные электроды (сопротивление 5 MΩ) были заполнены раствором: (в mM) 132 глюконат калия, 20 KCl, 4 Mg-АТФ, 0.3 Na₂GTP, 10 Na-фосфокреатин, 10 HEPES, pH 7.25 (реактивы Sigma, St. Louis, MO, USA). Ток регистрировали в пошаговом режиме с помощью усилителя Axoclamp 2B amplifier (Axon Instruments, USA) со встроенным DigiData 1440A ADC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). В течение регистрации температура камеры поддерживалась равной 27±0.5°C (для caTRPA1) или 35.5±0.5°C (для eoTRPA1) скорость жидкости протока составляла 3 мл/мин. Конфокальная микроскопия метки tdTomato в процессе регистрации была осуществлена с помощью Zeiss LSM 5 Live (Germany) в эпифлуоресцентном режиме (Ex 532 нм, Em 550 нм).

Температура в культуре клеток была определена с помощью методики, описанной в протоколе[168], по уравнению.

$$I = I_0 \exp\left(-\alpha \left[\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right]\right)$$

where I_0 это изначальный ток при температуре протока 27 или 35.5°C, заданной, как базовая, α - экспериментальный калибровочный коэффициент. В процессе калибровки системы нагревания было установлено, что в эксперименте $\alpha \approx 1311 \pm 57 \text{ K}^{-1}$.

Для нагревания культуры нейронов были использованы импульсы длительностью 10-, 30-, 50- или 100-мс лазера 1050-нм или 1342 нм (1-50 мДж), доставленные к культуре с помощью оптоволокна, расположенного на расстоянии 250 мкм от исследуемого нейрона. Для каждой стимуляции используется не менее 5-ти нейронов и не менее 3х стимуляций каждого из них при одном наборе параметров.

2.10. Стимуляция поведения избегания у личинок *Danio rerio*

Флуоресцентные личинки были извлечены из хориона с помощью хирургических пинцетов (Dumont №5), затем были полимеризованы в раствор 1.5% агарозы в среде их культивации (раствор E3) 35C. Полимеризованный личинки инкубировали в течение 15 мин при C,

чтобы адаптировать животных к условиям микроскопии, также дождаться окончания вспышки двигательной активности у эмбрионов, экспрессирующих термоактивируемые каналы. Если планировалось проведение регистрации движений хвоста, то после полимеризации хвост личинки высвобождали из агарозы скальпелем (№20).

Стимуляция личинок *Danio rerio* осуществлялась импульсным лазерным излучением длительностью от 100 мс до 1 с на длине волны 1340 нм мощностью до 50 мВт. Выбор центральной длины волны был обусловлен компромиссом между эффективностью поглощения света в тканях личинки и возможностью доставить излучение до образца через слой воды. Плавная перестройка центральной длины волны лазерного излучения была осуществлена при использовании фемтосекундной лазерной системы на базе генератора импульсов на кристалле титан:сапфир (Ti:Sapphire), перестраиваемые в спектральном окне от 710 нм до 980 нм. Для того, чтобы расширить диапазон длин волн для проведения исследований по фотостимуляции в длинноволновой области ближнего ИК диапазон и в область среднего ИК диапазона, был использован оптический параметрический генератор света (ПГС). Накачиваемый сверхкороткими импульсами на длине волны 808 нм, ПГС формировал перестраиваемые в области от 1030 нм до 1580 нм импульсы длительностью до 120 фс при использовании сигнальной волны и в диапазоне от 1620 нм до 2100 нм – холостой волны. Лазерная система работала в квазинепрерывном режиме. Энергии одиночных импульсов данной системы составляли единицы наноджоулей, генерирующиеся с частотой 87 МГц, что позволяло очень точно регулировать тепловую нагрузку на культуру клеток.

При проведении экспериментов чашка с личинкой располагалась на столике апрайт микроскопа, через нижний порт которого направлялось нагревающее ИК излучение. Поперечный размер пятна и каустика в фокусе варьировалась при помощи управляемого телескопа Галилея и положения фокусирующей линзы ($f = 200$ мм). Размер пятна контролировался в каждой серии измерений путем помещения ПЗС-камеры в фокальную область излучения. Во время стимуляции личинки рыбы положение пятна контролировалось при помощи инфракрасной камеры DCU224M (Thorlabs). Запись быстрого поведенческого отклика личинки рыбы на активацию нейронов проводилась ПЗС-камерой DCU223M (Thorlabs) на тактовой частоте 64 кадра в секунду.

Для каждой личинки проводили 3 повтора стимуляции на одной мощности, чтобы создать выборку. Для начала регистрировали не активированную неподвижную личинку в течение 3-5 сек, затем стимулировали поведенческий ответ. Поведенческий ответ регистри-

ровался как положительный только в том случае, если он возник не позднее 500 мс с момента начала стимуляции вне зависимости от мощности, и если личинка была неподвижна перед моментом стимуляции не менее 1 с. Задержка поведенческого ответа измерялась как время от момента начала стимуляции до первого движения (сокращения миомеров) эмбриона. Длительность ответа измерялась как общее время двигательной активности личинки.

2.11. Анализ данных и статистика

Для экспериментов с изображениями, "n" представляет собой число независимых экспериментов (отдельных клеток или животных), включенных в каждую панель и описанных в рисунках. Минимальный размер "n" в эксперименте был выбран равным 10, и было проведено по меньшей мере 3 повтора эксперимента для каждого измерения, что дает нам 30 измерений в каждой группе. Это позволяет анализировать широкие выборки данных и наблюдать форму распределения данных, чтобы обеспечить достаточную мощность статистического теста. Анализ статистики проводили в программах Origin Pro 8.6 и SPSS 10.0. Для сравнения двух групп мы использовали парный t-тест, для множественных сравнений мы использовали односторонний протокол ANOVA тест с последующей коррекцией Бонферрони и тестом Дункана. На всех графиках приведено среднее значение \pm ошибка среднего.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Красный генетически-кодируемый сенсор для детекции пероксида водорода

Генетически кодируемый сенсор НуPer открыл новые возможности в изучении сигнальной роли пероксида водорода в живых системах. НуPer обладает рядом преимуществ перед другими красителями для регистрации пероксида водорода, т.к. он высоко специфичен к пероксиду водорода, кодируется генетически, что делает возможной его направленную экспрессию, и низко токсичен для клеток. Сигнал биосенсора является обратимым благодаря работе ферментов глуторедоксинов и тиоредоксинов. Но существующий сенсор обладает рядом недостатков, такими как низкая интенсивность флуоресценции, спектральные свойства, затрудняющие детекцию в толстых слоях тканей, а также рН-зависимость флуоресценции. рН изменяется во многих внутриклеточных процессах: при поглощении глюкозы, лактата, активном дыхании и ингибировании ряда компонентов дыхательной цепи, что приводит к необходимости параллельного с регистрацией пероксида водорода измерения показателя рН.

Поглощение и автофлуоресценция таких биомолекул, как меланины, кератин, гемоглобин в области 450-500 нм затрудняет возбуждение и детекцию флуоресценции биосенсоров на основе желтых и зеленых флуоресцентных белков, YFP и GFP, но круговые пермутанты этих белков были получены первыми, поэтому исторически сложилось, что большинство флуоресцентных биосенсоров основаны на этих белках.

рН-зависимость флуоресценции, спектральные свойства и общая интенсивность флуоресценции зависят преимущественно от флуоресцентного ядра сенсора, поэтому его замена на круговой пермутант красного флуоресцентного белка может привести к устранению хотя бы части этих недостатков. Красные флуоресцентные белки поглощают свет в области 550-580 нм и флуоресцируют в области длин волн 600-620 нм, который слабее поглощается живыми тканями, поэтому красные белки возбуждаются светом относительно низкой интенсивности, который хорошо проникает в толстые слои ткани, и позволяет детектировать флуоресценцию низкой интенсивности.

Мы поставили перед собой задачу улучшить существующий биосенсор НуPer и создать его аналог на основе красного флуоресцентного белка.

3.1.1. Создание HyPerRed

Для создания красного флуоресцентного сенсора для детекции пероксида водорода мы заменили последовательность cpYFP в последовательности гена сенсора HyPer на круговые пермутанты различных красных флуоресцентных белков: mKate2 [185], FusionRed [59] and cpmApple, кругового пермутанта белка mApple [186] из генетически-кодируемого красного сенсора для детекции кальция R-GECO1.1 [91] (рисунок 19А).

Мы создали несколько библиотек конструкций, которые отличались длиной вырожженных по последовательности аминокислотных линкеров между флуоресцентным (cpFP) и чувствительным (OxyR-RD) доменами сенсора. Конструкции в каждой библиотеке отличались по аминокислотному составу линкеров, чтобы оптимизировать условия созревания cpFP в составе нового сенсора. Исходно мы скринировали библиотеки, оба линкера в которых имели длину по 2 аминокислотных остатка (а.о.), как у сенсора R-GECO1.1, или первый линкер длину 3 а.о., а второй - 2 а.о., как у сенсора HyPer.

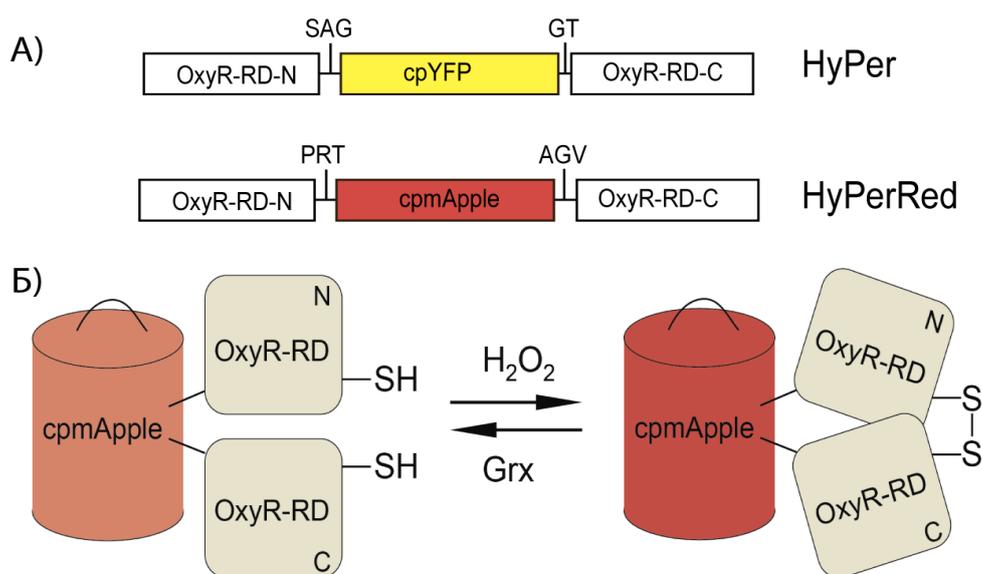


Рисунок 19. Структура HyPerRed. А) Схема строения генов HyPer и HyPerRed. Они отличаются флуоресцентным ядром и линкерными участками. Б) Схема работы HyPerRed. Формирование дисульфидной связи между остатками цистеинов С199 и С208 приводит к конформационным изменениям в структуре сенсора и увеличению флуоресценции сенсора. Grx – глуторедоксин.

Для того чтобы отобрать бактериальные колонии, чувствительные к H_2O_2 мы фотографировали бактериальные колонии *E.coli*, экспрессирующие индивидуальные конструкции исследуемой библиотеки под флуоресцентным бинокляром, опрыскивали их мелко-дисперсным водным раствором (аэрозолем) $200 \mu M H_2O_2$, а затем фотографировали коло-

нии после опрыскивания. Сравнивая интенсивность флуоресценции колоний на изображении после опрыскивания пероксидом водорода с их интенсивностью на изображении до обработки пероксидом водорода, мы отобрали колонии, отвечающие на опрыскивание раствором пероксида водорода повышением флуоресценции.

Все исследованные библиотеки продемонстрировали низкую интенсивность флуоресценции и низкую скорость созревания при 37 °С, но чувствительность к пероксиду водорода у отобранных из этих библиотек клонов оказалась крайне низкой, что говорит о неоптимальных условиях соединения доменов сенсора. Добавив одну аминокислоту к последнему линкеру, мы создали новые библиотеки, оба линкера в которых составляли по 3 а.о. В этих библиотеках было обнаружено множество клонов, эффективно созревающих при 37 °С, однако только библиотека на основе *srpApple* из R-GECO1.1 обнаружила в своем составе клоны, чувствительные к низким концентрациям H₂O₂. Вариант сенсора, обладающий максимальным ростом флуоресценции в ответ на добавление пероксида водорода, имел линкеры состава Pro-Arg-Thr и Ala-Gly-Val (рисунок 19) и демонстрировали 80%-повышение флуоресценции после добавления H₂O₂; этот вариант сенсора получил название HyPerRed и был проанализирован на выделенном белке.

3.1.2. Характеристика HyPerRed

Для того, чтобы охарактеризовать спектральные свойства и чувствительность HyPerRed мы очистили этот белок с помощью металл-аффинной хроматографии. Для предотвращения окисления остатков цистеина в составе сенсора к буферам выделения было добавлено 2 mM 2-меркаптоэтанола. И 2-меркаптоэтанол, и имидазол, который был использован для элюции белка с колонки, были удалены из проб с помощью гельфильтрации перед дальнейшими экспериментами. На рисунке 20А показан спектр очищенного белка HyPerRed. Максимум возбуждения флуоресценции находится на длине волны 575 нм, а максимум эмиссии флуоресценции – на 605 нм. Минимальное достоверное изменение спектра флуоресценции исследуемого белка наблюдается при добавлении к пробе H₂O₂ в концентрации 20 нМ, а полное окисление наблюдается после добавления более 300 нМ H₂O₂ (рисунок 20Б). Таким образом, HyPerRed обладает сравнимой чувствительностью к пероксиду водорода относительно других представителей линии HyPer (рисунок 20В)[31, 187, 188]. Добавление 1 mM 2-меркаптоэтанола к окисленному HyPerRed приводит к практически полному (до 97%) восстановлению сенсора и полному обращению его сигнала (рисунок 20Г).

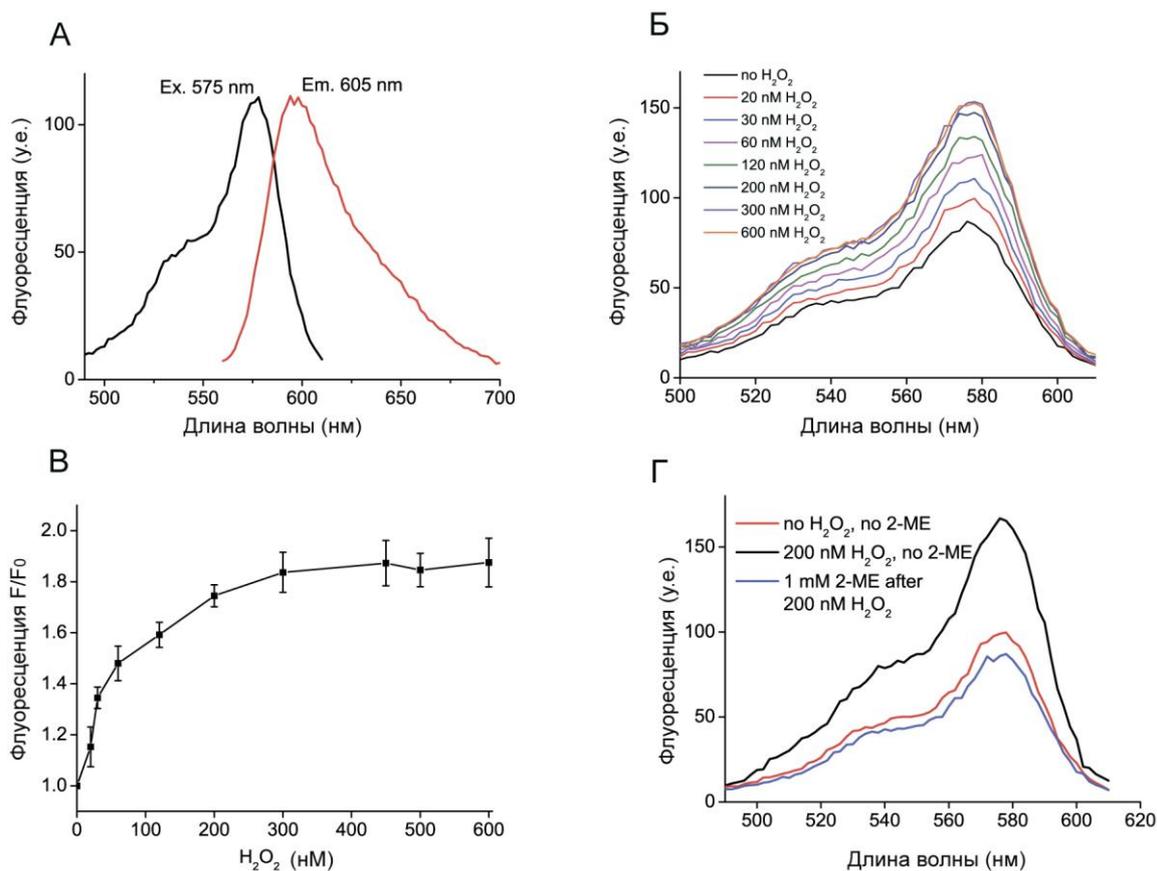


Рисунок 20. Спектральные свойства и чувствительность к H₂O₂ белка HuPerRed.

А) Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции очищенного белка HuPerRed. **Б)** Спектр возбуждения 15 нМ HuPerRed в Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 0.5 мМ 2-меркаптоэтанол, после добавления указанных концентраций H₂O₂. **В)** Чувствительность выделенного белка HuPerRed к H₂O₂. **Г)** Добавление 1 мМ 2-меркаптоэтанола к окисленному препарату HuPerRed ведет к восстановлению сенсора. Эмиссия измерена при 620 нм.

Остаток Cys199 (нумерация согласно wtOxyR) является критическим для реакции сенсора с H₂O₂ и формирует дисульфидную связь с остатком Cys208 как у wtOxyR, так и HuPer. Для подтверждения роли этого остатка для работы HuPerRed и его реакции с H₂O₂, мы заменили Cys199 на Ser199. Полученная мутантная конструкция обладала спектральными свойствами, аналогичными HuPerRed, но в то же время HuPerRed-C199S был не чувствителен к добавлению H₂O₂ (данные не представлены), что подтверждает гипотезу о том, что в HuPerRed, также как в OxyR и HuPer, Cys199 играет центральную роль в реакции сенсора с H₂O₂.

Флуоресценция большинства FP сильно зависит от pH. Мы определили pH-зависимость флуоресценции HuPerRed (рисунок 21А, Б). Кривая pH-зависимости HuPerRed отличается от таковой для HuPer и повторяет кривую pH-зависимости R-GECO1.1 в связанном с кальцием состоянии, pKa HuPerRed составляет 8.5, и 8.7 для HuPerRed-C199S, что

соответствует

полностью

восстановленному

HyPerRed.

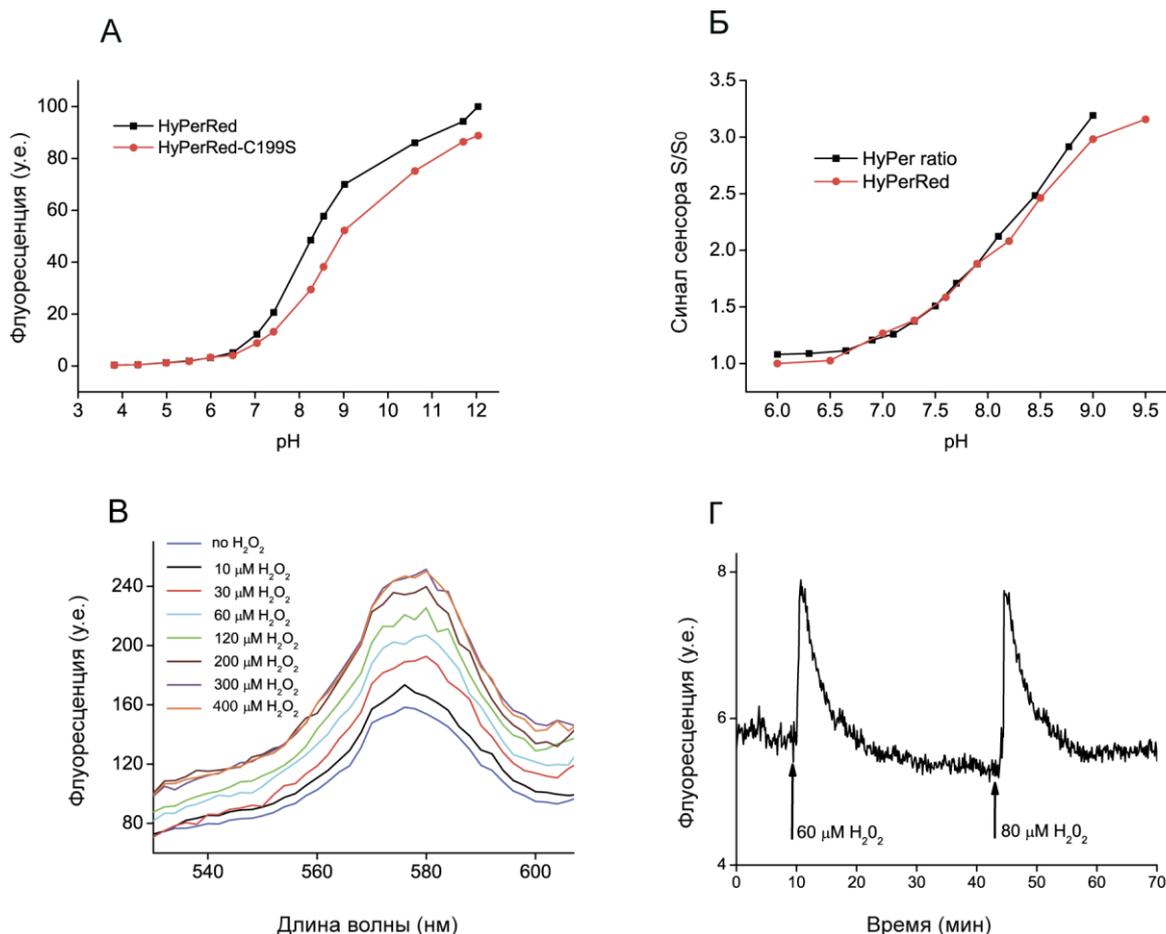


Рисунок 21. pH-зависимость и чувствительность HyPerRed в бактериальных клетках. А) pH зависимость HyPerRed и его нечувствительной к H₂O₂ версии HyPerRed-C199S. Б) pH-зависимость сигналов HyPerRed и HyPer, измеренные в цитоплазме эукариотических клеток. В) Спектр возбуждения HyPerRed в клетках *E. coli* при добавлении указанных концентраций H₂O₂. Эмиссия флуоресценции измерена при 620 нм. Г) Кинетика флуоресценции (возбуждение при 570 нм, эмиссия при 620 нм) HyPerRed в суспензии клеток *E. coli* в ответ на два последовательных добавления указанных концентраций H₂O₂.

Мы измерили pH-зависимость флуоресценции HyPerRed в цитоплазме эукариотических клеток в присутствии нингерицина и монензина, рКа восстановленной формы составляет 7.9 (рисунок 21Б), но здесь нужно учитывать ограничение калибровки pH до 9.0, приводящее к занижению значения рКа, т.к. дальнейшее повышение pH ведет к нарушению целостности клеток и их быстрой гибели.

Для оценки яркости флуоресценции сенсора HyPerRed мы измерили коэффициент экстинкции и квантовый выход флуоресценции этого белка. Квантовый выход очищенного HyPerRed в окисленной форме составляет 0.29. Коэффициент экстинкции при 577 нм составляет 39000 M⁻¹см⁻¹, делая HyPerRed в окисленной форме почти в 5-раз ярче HyPer в окисленной форме (таблица 1).

Таблица 1. Спектральные и динамические характеристики сенсоров HyPer.

сенсор	Спектр	Сигнал	Яркость	pKa окисленной формы	K _{ox} , нМ	K _s , M ⁻¹ S ⁻¹	Динамический диапазон, разы
HyPer	зеленый	рациометрический	1700	8.5	160	5·10 ⁵	3
HyPer2	зеленый	рациометрический	2500	8.3	290	1.2·10 ⁵	6
HyPer3	зеленый	рациометрический	1700	8.5	260	2.5·10 ⁵	6
HyPerRed	красный	интенсиометрический	11300	8.5	140	3·10 ⁵	2

Далее мы измерили чувствительность HyPerRed к пероксиду водорода при экспрессии в цитоплазме клеток *E.coli*. Мы ресуспендировали бактериальные клетки в PBS и измерили спектр флуоресценции бактериальной суспензии до и после добавления к клеткам пероксида водорода до конечной концентрации 10 - 400 μ M (рисунок 21В). Минимальные изменения спектра флуоресценции наблюдаются при добавлении 10 μ M пероксида водорода, что хорошо соотносится с данными для HyPer и wtOxyR *in vivo*. Добавление 300 μ M H₂O₂ полностью насыщают HyPerRed при экспрессии в цитоплазме бактериальных клеток (рисунок 21Г). Окисление HyPerRed в бактериальных клетках обратимо: после полного окисления сенсор восстанавливается, и флуоресцентный сигнал падает до базового значения в течение 8-10 мин, затем HyPerRed снова может быть использован в новом цикле окисления-восстановления.

HyPer и OxyR специфичны к H₂O₂ и не взаимодействуют с другими окислителями. Однако, замена флуоресцентной части сенсора может привести к структурным изменениям в OxyR-RD, снижая специфичность сенсора. Для подтверждения специфичности реакции HyPerRed с H₂O₂ мы проинкубировали очищенный белок HyPerRed с различными окислителями (таблица 2) *in vitro*. Оксид азота (NO, источник 1мМ MAHMA-NONOate), 1 мМ окисленный глутатион (GSSG), смесь ксантин-ксантин оксидаза /каталаза и смесь SIN-1/ каталаза не привели к изменениям в спектре HyPerRed. Таким образом, HyPerRed обладает специфичностью, сравнимой с таковой для OxyR и HyPer, относительно H₂O₂.

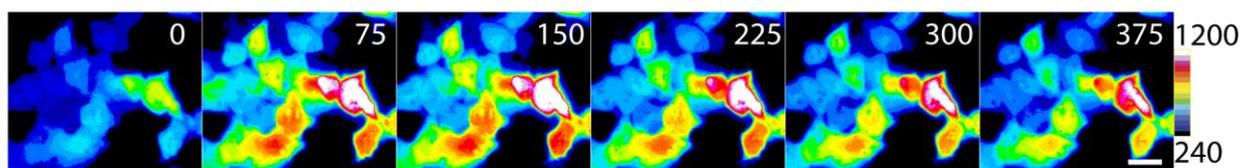
Таблица 2. Чувствительность сенсоров HyPer и HyPerRed к различным окислителям

in vitro

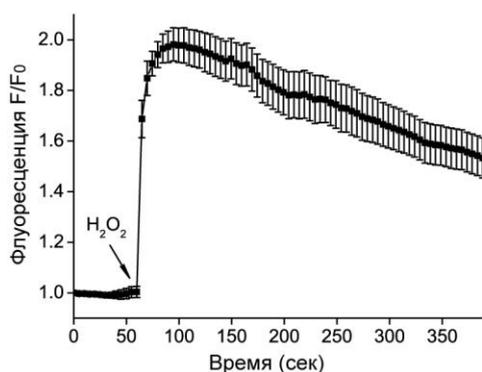
Окислитель	Источник	F/F ₀ (HyPerRed) ± s.d., n=3	S/S ₀ (HyPer) ± s.d., n=3
H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ (30 нМ)	1.3 ± 0.12	1.3 ± 0.12
H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ (300 М)	2.0 ± 0.34	3.0 ± 0.32
H ₂ O ₂	пероксиборат натрия (300 М)	1.8 ± 0.15	2.4 ± 0.17
Superoxide anion radical	ксантин (30 μМ)/ксантинооксидаза (25 mU)	1.0 ± 0.06	1.0 ± 0.05
GSSG	Окисленный глутатион GSSG (1 мМ)	1.0 ± 0.03	1.0 ± 0.04
NO	МАНМА NONOate (1 мМ)	1.0 ± 0.02	1.0 ± 0.03
ONOO ⁻	3-морфолиносиндамин (SIN-1; до 0.5 мМ)	1.0 ± 0.03	1.0 ± 0.05

3.1.3. Изучение HyPerRed в культуре эукариотических клеток

А



Б



В

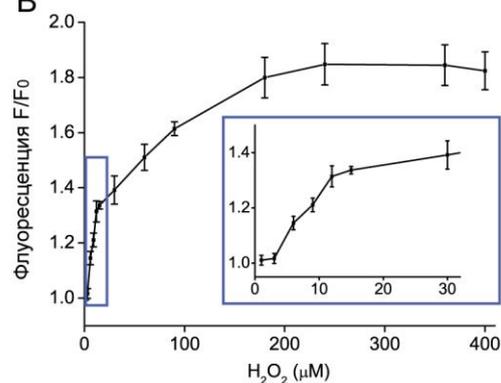


Рисунок 22. Ответ HyPerRed на добавление H₂O₂ в эукариотических клетках.

А) Изображения клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих HyPerRed в ответ на добавление 150 μM H₂O₂. Цифрами указано время в секундах. Масштаб, 40 μm. Таблица иллюстрирует изменение интенсивности флуоресценции HyPerRed. Б), Динамика изменения флуоресценции в индивидуальных, экспрессирующих HyPerRed и показанных на панели А. В) Возрастающие флуоресценции HyPerRed в клетках HeLa Kyoto в зависимости от экзогенной концентрации H₂O₂.

Мы исследовали реакцию HyPerRed на экзогенное добавление пероксида водорода при экспрессии в цитоплазме клеток линии HeLa Kyoto с помощью флуоресцентной микроскопии. Для определения чувствительности сенсора к пероксиду водорода мы добавляли возрастающие концентрации H_2O_2 к среде, в которой проводили микроскопию клеток. Добавление 6 μM пероксида водорода вызывало минимальные детектируемые изменения флуоресценции HyPerRed, что сравнимо с результатами, полученными для HyPerRed при экспрессии в цитоплазме бактериальных клеток *E.coli* (см 3.1.2.), а также с результатами, полученными ранее для зеленых версий сенсора HyPer (рисунок 22В) [31, 187, 188]. Добавление 200 μM H_2O_2 приводит к максимальному изменению сигнала HyPerRed (рисунок 22А,Б). Таким образом, HyPerRed можно использовать для детекции H_2O_2 в эукариотических клетках.

Далее мы проанализировали кинетические параметры HyPerRed при экспрессии в цитоплазме эукариотических клеток. Мы проводили эти измерения на клеточной культуре HeLa Kyoto с использованием так называемых микроскопических μ - слайдов, которые позволяют моментально заменить клеточную среду без H_2O_2 на среду с известной концентрацией пероксида водорода. Кинетические параметры окисления аналогичны для HyPer, HyPerRed, и wtOxyR. Концентрация пероксида водорода, необходимая для 50%-окисления сенсора (константа полуреакции K_{ox}) между сенсором и пероксидом водорода HyPerRed составляет 140 нМ (принимается равным 500-кратное снижение концентрации пероксида водорода $[H_2O_2]$ при его диффузии через клеточную мембрану эукариот). Константа скорости реакции псевдопервого порядка (K_s) составляет $3 \cdot 10^5 M^{-1} \cdot сек^{-1}$ для HyPerRed и $5 \cdot 10^5 M^{-1} \cdot сек^{-1}$ для HyPer. Время полувосстановления HyPerRed выше, чем для HyPer и ближе к HyPer2. Сигнал HyPerRed C199S не изменяется при добавлении к эукариотическим клеткам H_2O_2 (данные не представлены).

3.1.4. HyPerRed детектирует низкие концентрации H_2O_2 , продуцируемые клетками при стимуляции ростовым фактором

Мы исследовали возможность применения HyPerRed для изучения внутриклеточной передачи сигнала в живых клетках. HyPer может быть использован для детекции низких физиологических концентраций H_2O_2 . Определенные ранее кинетические параметры и чувствительность HyPerRed позволяют предположить, что этот сенсор также может быть использован для детекции низких концентраций H_2O_2 , образующихся в эукариотических клетках под действием ростовых факторов. Более того, спектральные свойства HyPerRed

делают его применимым в мультипараметрической микроскопии. Мы выбрали EGFR-каскад в качестве модельной системы по целому ряду причин. Из предшествующих экспериментов с сенсором HyPer нам было известно, что стимуляция EGFR с помощью EGF в клетках HeLa Kyoto индуцирует продукцию H_2O_2 в низких концентрациях [189].

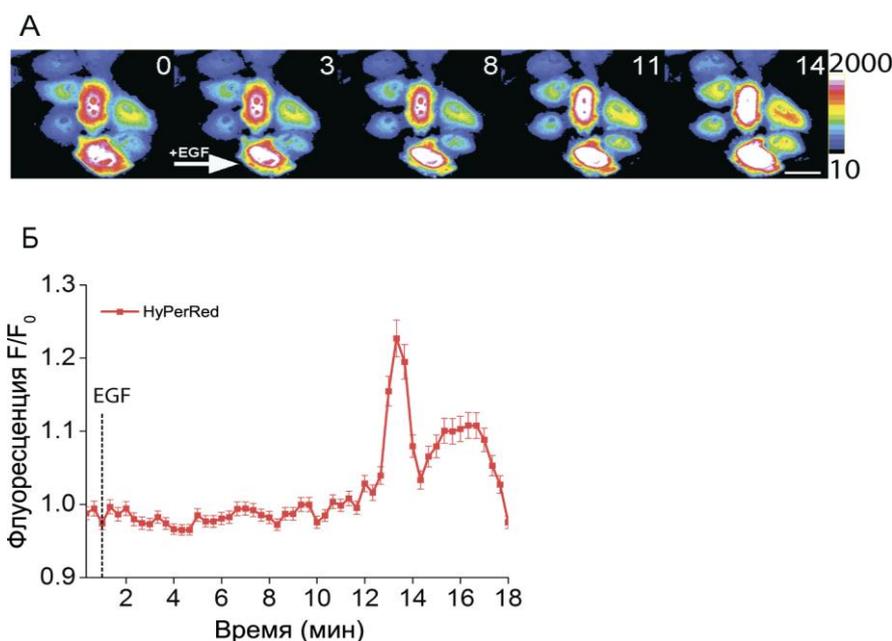


Рисунок 23. Стимуляция клеток HeLa Kyoto ростовым фактором EGF. А) HyPerRed в транзистентно трансфицированных клетках HeLa под действием 100 нг/мл EGF. Цифрами указано время в минутах. Масштаб, 40 μм. Б) Динамика флуоресценции HyPerRed в клетках панели А.

Добавление 100 нг/мл EGF к клеткам HeLa Kyoto, трансфицированным белком слияния EGFR-YFP и сенсором HyPerRed, ведет к эндогенной продукции H_2O_2 и повышению флуоресценции HyPerRed, что согласуется с данными, полученными для зеленых форм сенсоров HyPer (рисунок 23). В то же время, HyPerRed-C199S не демонстрирует никакого ответа на добавление EGF к среде клеток HeLa Kyoto, подтверждая, что изменения внутриклеточного pH не являются причиной изменения сигнала сенсора HyPerRed в этой модели (данные не приведены). Таким образом, чувствительность HyPerRed и его динамические параметры позволяют использовать этот сенсор для детекции низких внутриклеточных концентраций H_2O_2 . Спектральные свойства сенсора HyPerRed позволяют комбинировать его с зелеными, желтыми и синими флуоресцентными белками, что в дальнейшем позволяет использовать его для многопараметрической микроскопии сигнальных каскадов клеточных рецепторов.

3.1.5. Изучение динамики H_2O_2 и GSH/GSSG в различных клеточных компартментах на уровне одной клетки.

Общеизвестно, что изменения в уровне АФК могут быть связаны с изменением соотношения окисленных и восстановленных форм главных окислительно-восстановительных регуляторов клетки, таких как соотношение окисленного и восстановленного глутатиона (GSH/GSSG) или $NADP^+/NADPH$. В тоже время, клетки могут использовать восстановленные формы этих молекул для восстановления остатков цистеина белков после их окисления H_2O_2 . Однако, эта точка зрения была оспорена в недавней работе, описывающей ткане- и органоспецифические различия в окислительно-восстановительном балансе мухи *Drosophila melanogaster*, связанные с возрастом. Было показано, что уровень H_2O_2 может незначительно изменяться без видимых различий в соотношении GSH/GSSG [190].

Митохондрии являются клеточными компартментами с постоянной окислительно-восстановительной активностью. Считается, что до 1-2% молекулярного кислорода, поступающего в митохондрии, может пройти неполное восстановление в дыхательной цепи митохондрий [191]. Однако, такие высокие уровни продукции АФК были отмечены только *in vitro* на препаратах изолированных митохондрий [192]. Данные для более сложных систем часто являются противоречивыми, т.к. для их получения были использованы митохондриальные или цитоплазматические красители, зачастую обладающие низкой специфичностью к H_2O_2 или собственной фототоксичностью [193, 194]. Данные, полученные с помощью митохондриальных версий генетически кодируемых сенсоров, до сих пор не были получены для многих моделей.

Митохондриальная продукция АФК часто связана с кальциевым внутриклеточным сигналингом [195]. Считается, что выброс Ca^{2+} стимулирует продукцию АФК в митохондриях. В то же время существует множество работ, демонстрирующих повышение, или понижение, или вовсе отсутствие эффекта выброса Ca^{2+} на продукцию АФК в митохондриях [196-200]. Все эти данные были получены на препаратах изолированных митохондрий. Насколько эти данные могут быть экстраполированы на продукцию АФК в митохондриях живых клеток остается неизвестным. Могут ли эти вспышки продукции АФК в митохондриальном матриксе быть зарегистрированы при помощи генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров? Будет ли связана продукция пероксида водорода с изменением соотношения GSH/GSSG? Могут ли АФК, генерируемые в митохондриальном матриксе, распространяться на цитоплазматический компартмент? Для ответа на эти вопросы мы провели детекцию H_2O_2 при помощи красных и зеленых генетически-кодируемых сенсоров флуоресцентных сенсоров, а также с помощью зеленых сенсоров на соотношение GSH/GSSG в процессе выброса Ca^{2+} в цитоплазме.

Мы направленно экспрессировали HyPerRed в митохондриальном матриксе с помощью добавления двойного сигнала митохондриальной локализации (dmito-, double mitochondrial) к N-концу HyPerRed. Мы коэкспрессировали dmito-HyPerRed с различными вариантами митохондриальных и цитоплазматических сенсоров в клетках HEK293 для детекции изменений в уровне H_2O_2 , соотношении GSH/GSSG и значении pH.

Мы выбрали два способа повышения концентрации кальция в цитоплазме клеток: стимуляция клеток с помощью АТФ, агониста пуриnergических рецепторов GPCR [201], и при помощи тапсигаргина (TG), ингибитора обратного транспорта Ca^{2+} в ЭПР [202]. Добавление АТФ к среде клеток HEK293 не привело к повышению уровня АФК в матриксе митохондрий или цитоплазме этих клеток (данные не представлены). При добавлении тапсигаргина, ингибитора SERCA, Ca^{2+} -насоса, ответственного за откачку Ca^{2+} из цитоплазмы в ЭПР, мы наблюдали низко интенсивный, но хорошо различимый всплеск продукции H_2O_2 в митохондриальном матриксе (рисунок 24). Так как HyPerRed характеризуется pH-чувствительностью, аналогичной таковой для зеленых версий HyPer, мы проверили, может ли быть обусловлен ответ HyPerRed на TG продукцией H_2O_2 , или он обусловлен TG-зависимым защелачиванием матрикса митохондрий. Для этого мы коэкспрессировали dmito-HyPerRed с мито-HyPerC199S (dmito-SypHer). В то время как dmito-HyPerRed отвечал на добавление TG кратковременным повышением флуоресценции, сигнал dmito-SypHer (R/R_0) не изменился в ответ на добавление TG (рисунок 24В, Г), что говорит о стабильности pH в митохондриальном матриксе в данной системе. Таким образом, именно продукция пероксида водорода является причиной повышения сигнала dmito-HyPerRed.

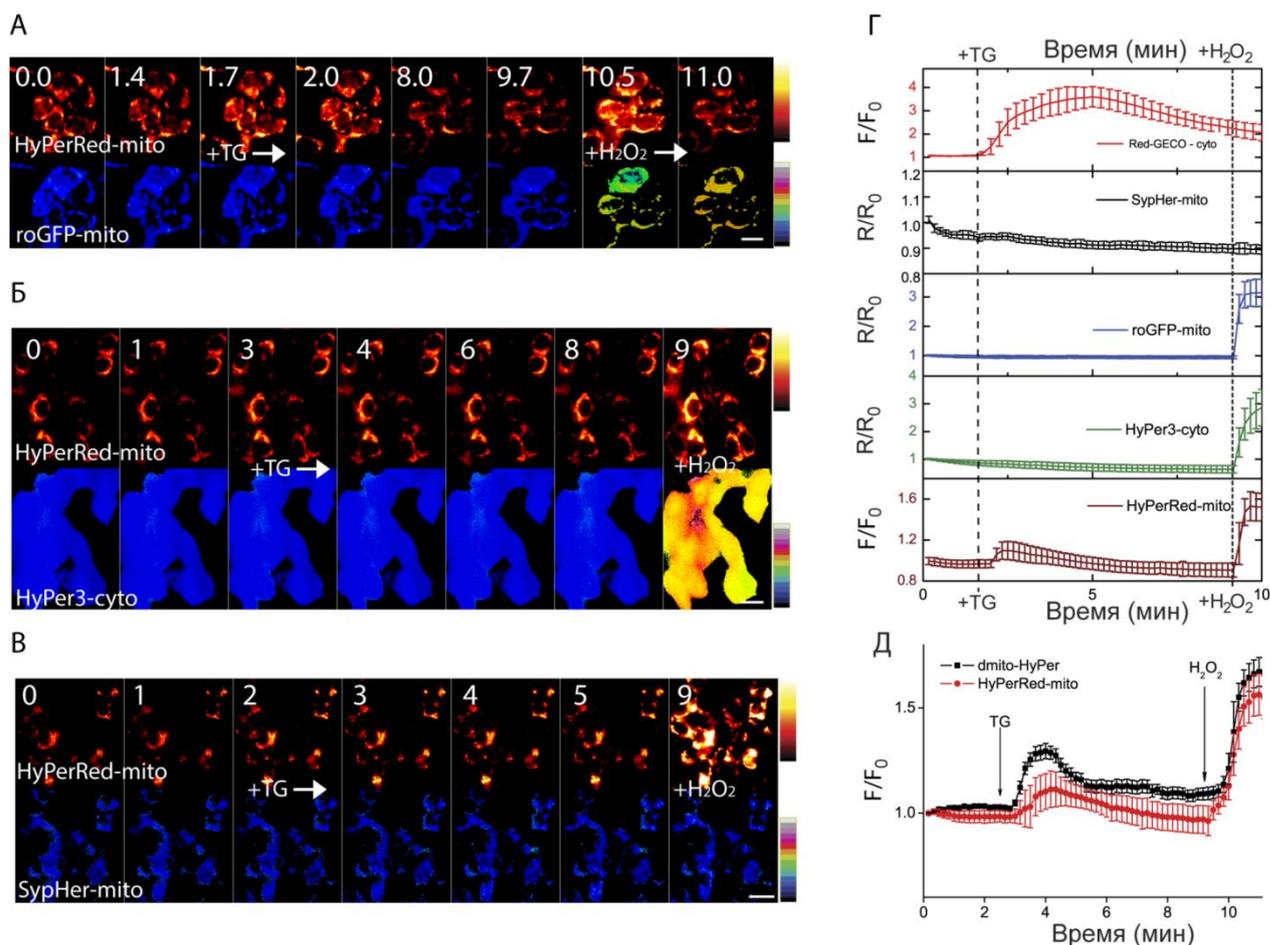


Рисунок 24. Мультипараметрическая микроскопия H_2O_2 , GSH/GSSG, Ca^{2+} и pH.

А) Ингибирование АТФазы SERCA тапсигаргином (TG) приводит к продукции пероксида водорода в митохондриальном матриксе, в то время как соотношение GSH/GSSG остается стабильным. Клетки HEK293 были котрансфецированы dmito-HyPerRed и dmito-Grx1-RoGFP2, масштаб 20 μ m. Цифры показывают время в минутах. Масштаб цветового сигнала HyPerRed (3700-25000), Grx1-RoGFP2 (0.5-4.0). **Б)** H_2O_2 не диффундирует в цитоплазму клеток. Клетки HEK293 были котрансфецированы dmito-HyPerRed и цитоплазматическим HyPer3, масштаб 30 μ m. Цифры показывают время в минутах. Масштаб цветового сигнала HyPerRed (3700-25000), HyPer3 (0.5-6.0). **В)** pH митохондриального матрикса остается стабильным в процессе стимуляции клеток тапсигаргином (TG). Клетки HEK293 были котрансфецированы dmito-HyPerRed и dmito-Grx1-RoGFP2, масштаб 40 μ m. Цифры показывают время в минутах. Масштаб цветового сигнала HyPerRed (3700-25000), dmito-SypHer(0.5-4.0). **Г)** TG вызывает продукцию H_2O_2 в митохондриальном матриксе (измерено с помощью HyPerRed-mito), и всплеск Ca^{2+} в цитоплазме (Red-GECO-cyto), в то время как цитоплазматический уровень H_2O_2 (HyPer3-cyto), митохондриальное соотношение GSH/GSSG (roGFP-mito), а также матричный уровень pH (SypHer-mito) остаются постоянными в процессе стимуляции. Более 100 клеток в 2 или более экспериментах.. В каждом эксперименте клетки HEK293 трансфецированы HyPerRed-mito или Red-GECO-cyto и еще одним сенсором (HyPer3-cyto/ roGFP-mito/SypHer-mito). Агонист добавлен на 1.7 мин. **Д)** Обе митохондриальные версии сенсоров dmito-HyPerRed (HyPerRed-mito) и dmito-HyPer демонстрируют продукцию пероксида водорода при стимуляции клеток HEK293. TG добавлен на 2.5 мин. Более 100 клеток в 2 или более экспериментах.

Продукция H_2O_2 может приводить к окислению глутатиона (GSH). В этом случае логично предположить, что с продукцией H_2O_2 в митохондриальном матриксе будет связано изменение соотношения GSH/GSSG. Для того, чтобы определить взаимосвязь TG-индуцированной продукции H_2O_2 с окислительно-восстановительным состоянием пула глутатиона, мы экспрессировали dmito-HyPerRed с dmito-Grx1-RoGFP2. Оба сенсора эффективно отвечают на добавление экзогенного пероксида водорода, что подтверждает их активность, но TG индуцирует изменения флуоресценции исключительно dmito-HyPerRed, что говорит об отсутствии изменений в соотношении GSH/GSSG в матриксе митохондрий (рисунок 24А, Г). Таким образом, продукция H_2O_2 в матриксе митохондрий, индуцированная TG, не связана с окислением GSH в матриксе митохондрий, и в данном случае для восстановления окисленных белков в наблюдаемый период времени не используется GSH в данном компартменте.

Внутренняя мембрана митохондрий клеток проницаема для экзогенно добавленного H_2O_2 , т.к. H_2O_2 индуцирует окисление dmito-HyPerRed. Это означает, что TG-индуцированная продукция H_2O_2 , регистрируемая в митохондриальном матриксе с помощью dmito-HyPerRed, может распространяться на цитоплазму клетки, или, напротив, может возникнуть в цитоплазме клеток, и распространится в митохондриальный матрикс.

Для ответа на этот вопрос мы коэкспрессировали dmito-HyPerRed с HyPer3, локализованным в цитоплазме. HyPer3 не продемонстрировал изменения сигнала в ответ на добавление TG (рисунок 24Б, Г), что говорит о том, что продукция H_2O_2 имеет митохондриальное происхождение и не распространяется в цитоплазму клетки. Так же важно отметить, что соотношение GSH/GSSG в цитоплазме остается стабильным в течение этого процесса.

Отсутствие окисления HyPer3 в цитоплазме под действием TG опровергает предположение о том, что H_2O_2 выполняет в клетках сигнальную функцию исключительно в цитоплазматическом компартменте, по крайней мере, это не так в случае стимуляции клеток с помощью TG.

Митохондриальный H_2O_2 также может выполнять роль сигнальной молекулы в матриксе митохондрий. Однако, существует вероятность «утечки» матричного H_2O_2 в трансмембранное (межмембранное) пространство митохондрий (IMS). IMS также может быть местом продукции АФК в этом случае благодаря работе Комплекса III дыхательной цепи митохондрий.

Мы поставили себе задачу определить локализацию продукции H_2O_2 в митохондриях. Для этого мы получили белок слияния HyPer2 с белком SMAC/DIABLO для локализации сенсора в IMS, и котрансфецировали эту конструкцию с dmito-HyPerRed в клетках HEK293.

Оба сенсора продемонстрировали митохондриальную локализацию, но отличить матричную и трансмембранную локализацию на эпифлуоресцентном микроскопе не представлялось возможным, а т.к. транспорт белков в трансмембранное пространство зачастую происходит в 2 стадии (изначально белки транспортируются в матрикс митохондрий, а затем уже в IMS), нам было необходимо проверить локализацию сенсоров перед экспериментом.

Т.к. митохондриальный матрикс характеризуется более высоким значением pH относительно IMS и цитоплазмы, мы можем вызвать закисление матрикса добавлением CCCP. Тогда если HyPer2 или HyPerRed локализуются в матриксе, то сигнал HyPer2 и яркость HyPerRed снизятся после добавления CCCP. IMS имеет значение pH, сравнимое с таковым для цитоплазмы за счет высокой проницаемости внешней мембраны митохондрий, или несколько ниже за счет активного транспорта протонов. Если сенсоры локализуются в IMS то при добавлении CCCP мы или не увидим никаких изменений в их сигнале/яркости, или увидим слабое повышение их сигналов за счет повышения pH в IMS (рисунок 25).

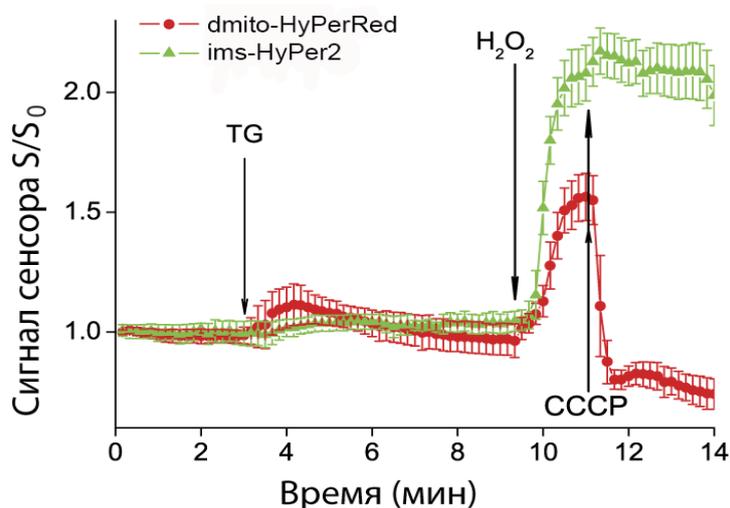


Рисунок 25. H_2O_2 не диффундирует из митохондриального матрикса (*dmito-HyPerRed*) в межмембранное пространство митохондрий (*ims-HyPer2*). TG добавлен на 3.0 мин. Более 20 клеток в 2 экспериментах.

После 12 ч с момента трансфекции *ims-HyPer2* (как минимум частично) и *dmito-HyPerRed* локализовались в митохондриальном матриксе, что подтверждается снижением *ims-HyPer2* ratio и яркости *dmito-HyPerRed* при добавлении CCCP. Оба сенсора чувствительны к добавлению TG и H_2O_2 . Однако, спустя 36 ч после трансфекции *ims-HyPer2* оказался не чувствителен к добавлению CCCP, в то время как *dmito-HyPerRed* по прежнему отвечал понижением интенсивности флуоресценции, что свидетельствует о различной локализации данных сенсоров. Оба сенсора сохраняли чувствительность к H_2O_2 , что говорит об их функциональной активности. Добавление TG индуцировало повышение сигнала *dmito-HyPerRed*, но не изменяло сигнал *ims-HyPer2* (рисунок 25). Это свидетельствует о локализации

источника АФК в митохондриальном матриксе, а также об отсутствии «утечки» АФК через внутреннюю мембрану митохондрий в результате блокировки откачки Ca^{2+} при помощи ингибирования SERCA.

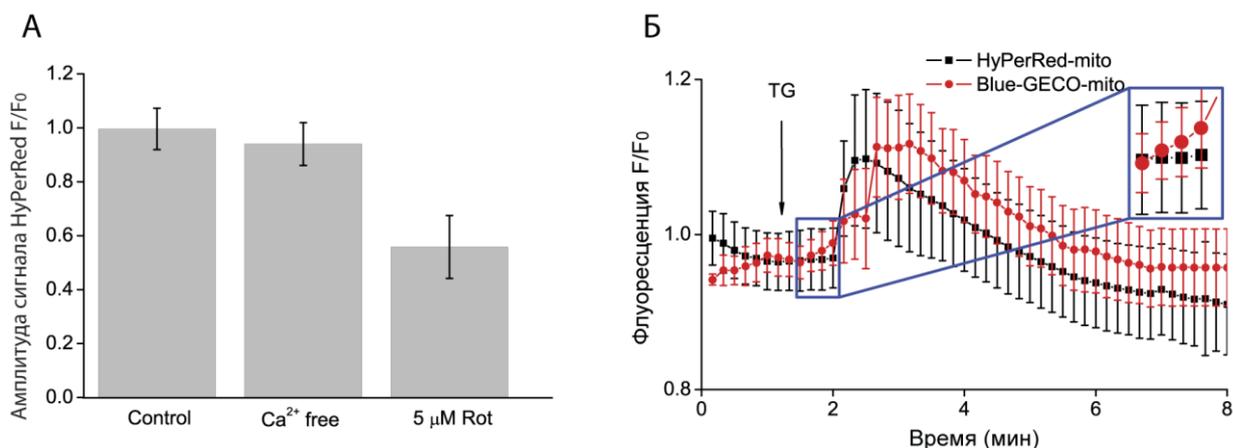


Рисунок 26. Продукция H_2O_2 при стимуляции TG обусловлена работой дыхательной цепи митохондрий. А) Эффект бескальциевой среды и ротенона на амплитуде всплеска продукции H_2O_2 , детектированной dmito-HyPerRed. Более 40 клеток в 3 экспериментах. Б) Временное соотношение всплеска кальция в митохондриальном матриксе (детектируемого Blue-GECO-mito) и продукции H_2O_2 (измерено с помощью HyPerRed-mito). TG добавлен на 1.0 мин. Более 40 клеток в 2 экспериментах.

Снижение или полное удаление кальция из среды, в которой находятся клетки в момент стимуляции клеток TG (что в итоге приводит к истощению внутриклеточных запасов кальция), снижает амплитуду продукции АФК в митохондриальном матриксе, но не приводит к полному исчезновению этого эффекта [203]. Ротенон, ингибитор Комплекса I дыхательной цепи митохондрий, сильно ослабляет матричную продукцию H_2O_2 , что указывает на дыхательную цепь митохондрий в качестве места локализации источника АФК в случае стимуляции клеток с помощью TG (рисунок 26А).

Таким образом, ингибирование откачки Ca^{2+} в ЭПР тапсигаргином индуцирует небольшую, локальную и кратковременную продукцию H_2O_2 , которая не ассоциирована с детектируемым окислением глутатиона (GSH) в матриксе митохондрий или цитоплазме. H_2O_2 не распространяется из матрикса в межмембранное пространство митохондрий (IMS) или цитоплазму.

3.2. Термогенетика

Оптогенетика представляет собой набор методов, которые позволяют локально активировать индивидуальные клетки с помощью света и светозависимых белков, и на протяжении последних 10-15 лет внесли огромный вклад в понимание механизмов функционирования мозга, периферической нервной системы и функций сердечной ткани [145, 164, 204]. Но методы оптогенетики имеют ряд недостатков, связанных в основном с ограничениями по доставке активирующего света в глубокие слои ткани и низкой проводимостью индивидуальных белков-опсинов (ChRs (*ChannelRhodopsines*)), бактериальных опсинов, являющихся главными инструментами оптогенетики. Так при оптоволоконной доставке излучения в диапазоне 350-635 нм на расстоянии 1 мм от торца оптоволоконка теряется около 90% мощности излучения [179], что приводит к использованию избыточных мощностей стимуляции, которые обладают фототоксическим эффектом и могут привести к повреждению слоев ткани, примыкающих к торцу оптоволоконка [180]. Термогенетика представляет собой альтернативный подход, сочетающий в себе описанные преимущества оптогенетики, но имеющий несколько дополнительных плюсов.

Термоактивируемые каналы (TRPs, *Transient Receptor Potential*), являющиеся инструментами термогенетики, не нуждаются в стимуляции видимым светом, который плохо проникает в оптически плотные ткани животных из-за высокого поглощения пигментов крови и кожи, и могут быть активированы с помощью инфракрасного излучения, находящегося в т.н. «оптическом окне» поглощения животных тканей (650-1100 нм), что облегчает равномерную доставку излучения ко всем клеткам образца, СВЧ излучения или высокочастотного магнитного поля [104, 106, 111, 205, 206]. Эти белки представляют собой не-селективные катионные каналы, имеющие почти на 3 порядка большую проводимость индивидуального канала относительно ChRs, и чувствительные к малейшим повышениям температуры (от 0.1°C). Различные TRPs обладают различными порогами температурной активации, обладают различной кинетикой работы и различной чувствительностью к температуре. В качестве температурных активаторов для своей работы мы выбрали термочувствительные каналы змей *caTRPA1*[104] (*Crotalus atrox*), *eoTRPA1*[104] (*Pantherophis obsoletus lindheimeri*), один из которых (*caTRPA1*) экспрессируется в щечной ветви тройничного нерва гремучей змеи и используется для ориентации по температурным профилям объектов в процессе охоты, а второй (*eoTRPA1*) выполняет роль детектора температуры тела у змеи *Pantherophis obsoletus lindheimeri*, позволяющего контролировать метаболизм пойкилотермного животного и избегать перегрева. Среди описанных на сегодняшний день термоканалов эти *caTRPA1* и *eoTRPA1* характеризуются одной из наиболее высоких термочувствительностью, а также будут эволюционно далекими белками для используемых модельных организмов, что позволит избежать вторичной регуляции с помощью клеточных

ферментов, задать с помощью специфических промоторов специфичность экспрессии, а также снизить вероятность коактивации собственных температурных рецепторов, имеющих отличные от змеиных каналов характеристики активации.

В результате междисциплинарной работы с сотрудниками лаборатории А.М. Жёлтикова (МГУ им. М.В. Ломоносова), и группы Е.С. Никитина (ИВНД РАН), нам удалось описать частотные и кинетические характеристики работы термоактивируемых каналов змей и мышей-вампиров, применить их для локальной активации нейронов млекопитающих в культуре, а также *in vivo* в личинке рыбы *Danio rerio*.

В ходе этой работы мы охарактеризовали особенности работы TRPA1 в различных типах клеток, нашими коллегами были созданы установки, позволяющие проводить локальную лазерную стимуляцию клеток, которые могут быть адаптированы для решений задач настоящего проекта.

3.2.1 Выбор флуоресцентной метки для термоактивируемых каналов TRPA1

Для использования термочувствительных каналов в экспериментальной работе необходимо подобрать оптимальные условия их визуализации в образцах. Для визуализации с помощью флуоресцентной микроскопии изначально не флуоресцирующих белков применяются два основных подхода: добавление к гену исследуемого белка флуоресцентной метки или внесение иммунохимического эпитопа для детекции белка с помощью антител к выбранному эпитопу (ICH).

Каждый вид метки имеет свои плюсы и недостатки, и зачастую сложно предсказать, как именно их внесение повлияет на целевой белок, его функциональную активность и локализацию, поэтому мы получили несколько вариантов флуоресцентных химер термочувствительных каналов змей caTRPA1[104] (*Crotalus atrox*), eo1TRPA1[104] (*Pantherophis obsoletus lindheimeri*), а также варианты каналов, несущие эпитоп 6xHis (HisTag), представляющий собой последовательность из 6-ти остатков гистидина, и провели их анализ в клетках НЕК293 и культуре эмбриональных нейронов мыши.

Мы использовали 4 метода получения флуоресцентных производных белков:

а) методом слияния метки с целевым белком без последующего расщепления химеры. В качестве линкерного пептида использовался наиболее пластичный и длинный линкер сенсора Grx-roGFP [207, 208], имеющий длину 31 аминокислотный остаток и представляющий собой полиглицин-сериновый тракт (рисунок 27 А3,4);

б) методом слияния метки с целевым белком с использованием автопротеолитического сайта P2A[209] с последующим расщеплением химеры в дистальной области P2A на два целевых белка (рисунок 27 А5);

в) методом использования полицистронных конструкций на основе IRES2 [210, 211] (рисунок 27 А2);

г) методом внесения эпитопа 6хHis в первую внеклеточную петлю TRPA1 (рисунок 27 Б).

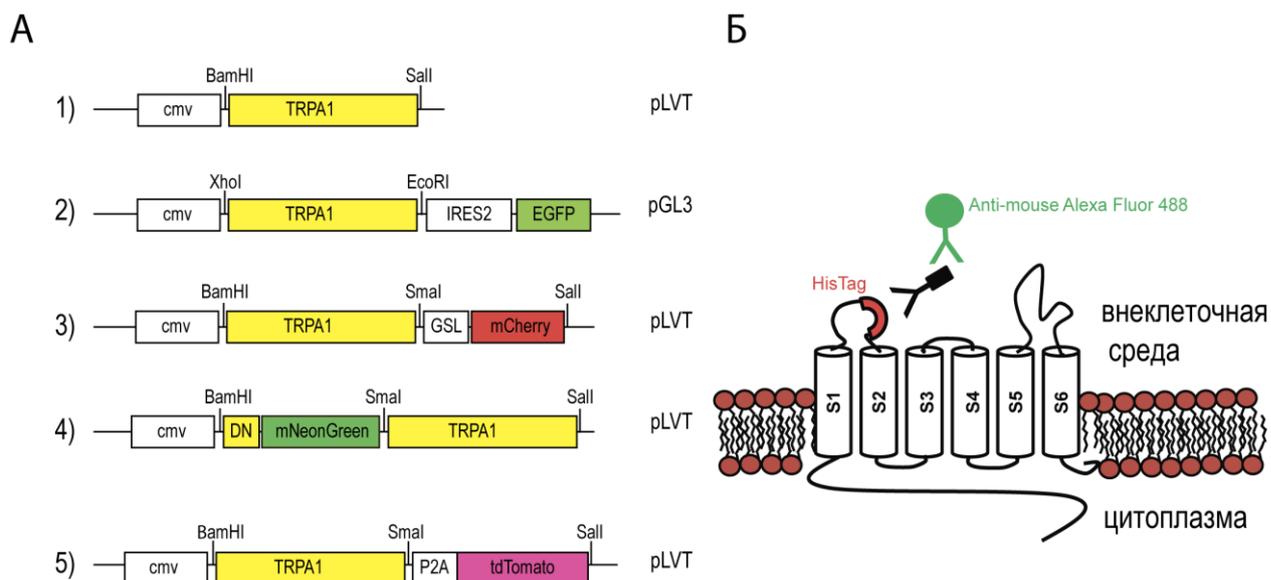


Рисунок 27. Конструкции на основе TRPA1. А) Схемы использованных в работе на HEK293 и нейронах конструкций, содержащих гены TRPA1. 1) Нефлуоресцентные версии TRPA1. Получены для *caTRPA1* и *eo1TRPA1*. 2) Полицистронные конструкции TRPA1-IRES2-EGFP. Получены для *caTRPA1* и *eo1TRPA1*. 3) Белок слияния *caTRPA1-GSL-mCherry* 4) Белок слияния *dN-mNeonGreen-caTRPA1* 5) Белок слияния с автопротеолитическим сайтом P2A TRPA1-P2A-tdTomato. Получены для *caTRPA1* и *eo1TRPA1*. Сбоку указан тип вектора, на основе которого собирали указанные конструкции. Б) Схема внесения эпитопа 6хHis (HisTag) в структуру TRPA1. Эпитоп детектирует первичные антитела (черным) anti-6хHis, а детекцию вторичных антител производят флуоресцентными антителами Anti-mouse Alexa Fluor 488.

В качестве флуоресцентной метки использовались флуоресцентные белки mCherry [212, 213], mNeonGreen [62], tdTomato [186], EGFP [214]. Все полученные конструкции, позволяющие определить локализацию TRPA1 при экспрессии в клетках HEK293 преимущественно локализовались на плазматической мембране клеток для обоих термочаналов (рисунок 28). Интенсивность флуоресценции меток mCherry и mNeonGreen в составе химер оказалась на порядок ниже уровня флуоресценции отдельных флуоресцентных белков mCherry и mNeonGreen при экспрессии с этого же (cmv) промотора в клетках HEK293, что может быть объяснено либо низким уровнем экспрессии химерных белков, либо снижением флуоресценции метки в результате слияния с термочаналом.

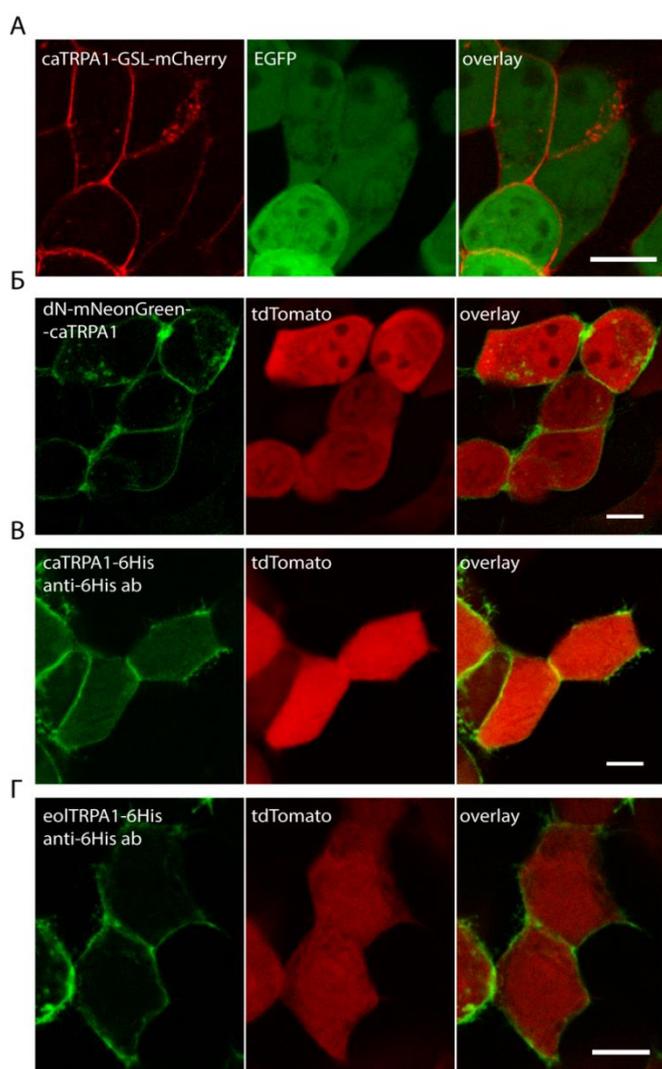


Рисунок 28. Локализация меченных производных TRPA1 в клетках HEK293. А) Белок слияния caTRPA1-GSL-mCherry в котрансфекции с EGFP. Б) Белок слияния dN-mNeonGreen-caTRPA1 в котрансфекции с tdTomato. В) Иммунофлуоресцентное окрашивание фиксированных клеток HEK293, экспрессирующих содержащую эпитоп HisTag версию канала caTRPA1_{HisTag}, окрашенную по методу ICH системой 2x антител anti-6xHis - Antimouse Alexa 488 Г) Иммунофлуоресцентное окрашивание фиксированных клеток HEK293, экспрессирующих содержащую эпитоп HisTag версию канала eoTRPA1_{HisTag}, окрашенную по методу ICH системой 2x антител anti6xHis-Antimouse Alexa 488. Масштаб 20 мкм для всех.

Метки TRPA1-IRES2-EGFP демонстрировали широкий разброс интенсивности сигнала EGFP, что может быть связано с невоспроизводимостью активности IRES2 в индивидуальных клетках, что не позволяет соотнести уровень экспрессии канала и флуоресцентного белка молярно. Конструкции на основе автопротеолитического сайта P2A TRPA1-P2A-tdTomato отличались наибольшей яркостью и равномерностью сигнала в клеточной культуре HEK293, т.к. сайт P2A обеспечивает эквимольную продукцию TRPA1 и tdTomato, что делает их перспективными кандидатами для

дальнейшей работы, что позволяет оценивать уровень экспрессии каналов в индивидуальных клетках.

Но, в свою очередь, конструкции TRPA1-P2A-tdTomato, TRPA1-IRES2-EGFP делают невозможными детекцию локализации каналов в образце на субклеточном уровне.

3.2.2. Тестирование TRPA1 в культуре эукариотических клеток HEK293

Помимо локализации и уровня флуоресценции важно оценить влияние флуоресцентной метки на функциональную активность термочаналов. Мы рассматриваем в качестве основной функции TRPA1 проведение в клетки Ca^{2+} , поэтому проводили сравнение производных каналов на основе интенсивности стимулируемого ими всплеска Ca^{2+} в одной системе на большой выборке клеток, чтобы снизить влияние различий экспрессии.

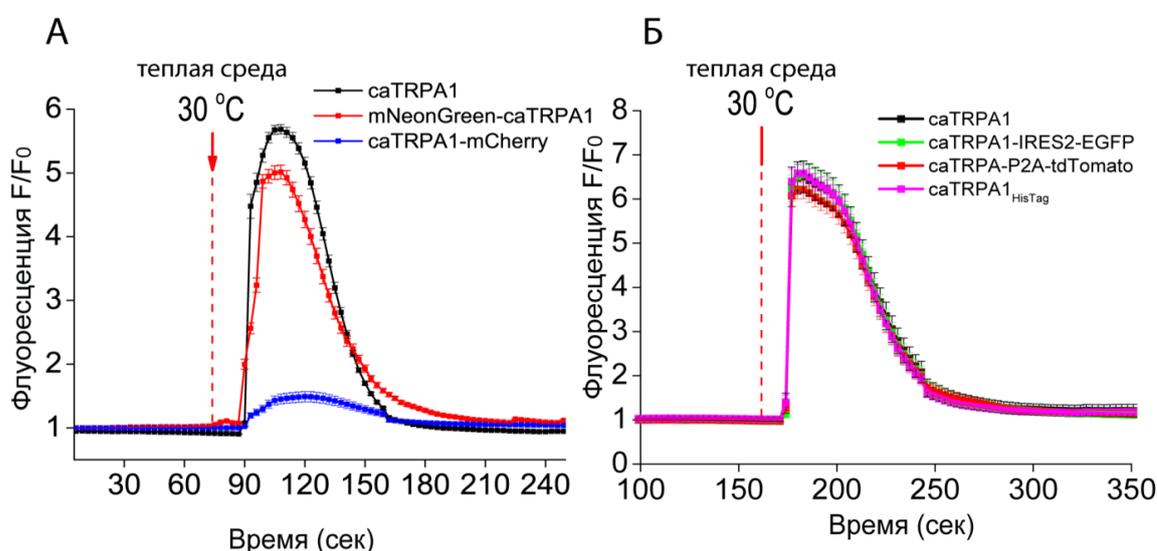


Рисунок 29. Эффективность активации производных *caTRPA1* в клетках HEK293, экспрессирующих кальциевых сенсор R-GECO1.1 и указанную конструкцию на основе *caTRPA1*. А) Сравнение нерасщепляемых белков слияния *cN-mNeonGreen-caTRPA1*, *caTRPA1-(GSL)-mCherry* с немеченым *caTRPA1*. Б) Сравнение расщепляемых и двухрамочных конструкций *TRPA1-P2A-tdTomato*, *TRPA1-IRES2-EGFP*, а также несущей эпитом конструкции *caTRPA1_{HisTag}*, с немеченым *caTRPA1*. Более 100 клеток в 3 экспериментах.

Функциональность полученных конструкций была протестирована на культуре эукариотических клеток HEK293 (рисунок 29). Для детекции изменений внутриклеточной концентрации ионов кальция Ca^{2+} был использован сенсор R-GECO1.1. Особенно важно было использовать один сенсор, вне зависимости от его спектра, т.к. разные сенсоры обла-

дают различным динамическим диапазоном, сродством и чувствительностью к Ca^{2+} . В качестве активирующего воздействия было использовано добавление к клеточной среде для микроскопии подогретой до конечной температуры 30°C аликвоты клеточной среды.

В случае нерасщепляемых С-концевых меток TRPA1 каналы снизили свою функциональную активность более чем на 80%, что делает этот вид меток неприменимым для данных каналов. Более успешным подходом оказалось создание химерной конструкции dN-mNeonGreen-caTRPA1. Её эффективность активации не отличается от немеченных версий каналов (рисунок 29А).

Обе конструкции TRPA1-P2A-tdTomato, TRPA1-IRES2-EGFP не отличаются по эффективности активации от немеченных версий канала (рисунок 29Б), т.к. по сути, содержат его в немодифицированном варианте.

3.2.3. Выбор температурных условий экспрессии TRPA1

Клетки млекопитающих является одной из наиболее удобных систем для изучения активности TRPA1. Термочувствительные TRPA1 активируются и индуцируют мощный вход в клетки катионов кальция тогда, когда температура превышает т.н. пороговую температуру активации. Также считалось, что инактивация канала и снижение концентрации Ca^{2+} , происходящее преимущественно за счет работы клеточных АТФаз ЭПР и плазматической мембраны, наступает после снижения температуры.

В процессе работы с TRPA1 нами было отмечено, что длительная инкубация клеток, экспрессирующих TRPA1 на температуре, превышающей порог их активации, указанный в литературе ($T_{\text{ON}} \approx 27.6 \pm 0.9^\circ\text{C}$ для caTRPA1)[104] и $T_{\text{ON}} \approx 37.2 \pm 0.7^\circ\text{C}$ для eo1TRPA1)[104], не приводит гибели клеток, чего можно было бы ожидать. Было решено исследовать экспрессию TRPA1 и их активность при различных температурных условиях выращивания (25, 30 и 37°C) и инкубации клеток, а также сравнить эффект температурной и химической активации TRPA1 с помощью агониста TRPA1 аллилизотионината (АИТС), (рисунок 30). Для сравнения была выбрана система клеток НЕК293, экспрессирующих TRPA1-IRES2-EGFP и R-GECO1.1, т.к. эти конструкции были получены раньше для двух видов каналов.

Клетки, выращенные при 25°C, отличались в 4-10 раз более низкой эффективностью трансфекции и более низким уровнем синтеза белков саTRPA1, R-GECO1.1, EGFP, регистрируемым по флуоресценции. Это снизило эффективность стимуляции и амплитуду кальциевого всплеска в ответ на активацию саTRPA1 в данных клетках (рисунок 30 А-Г).

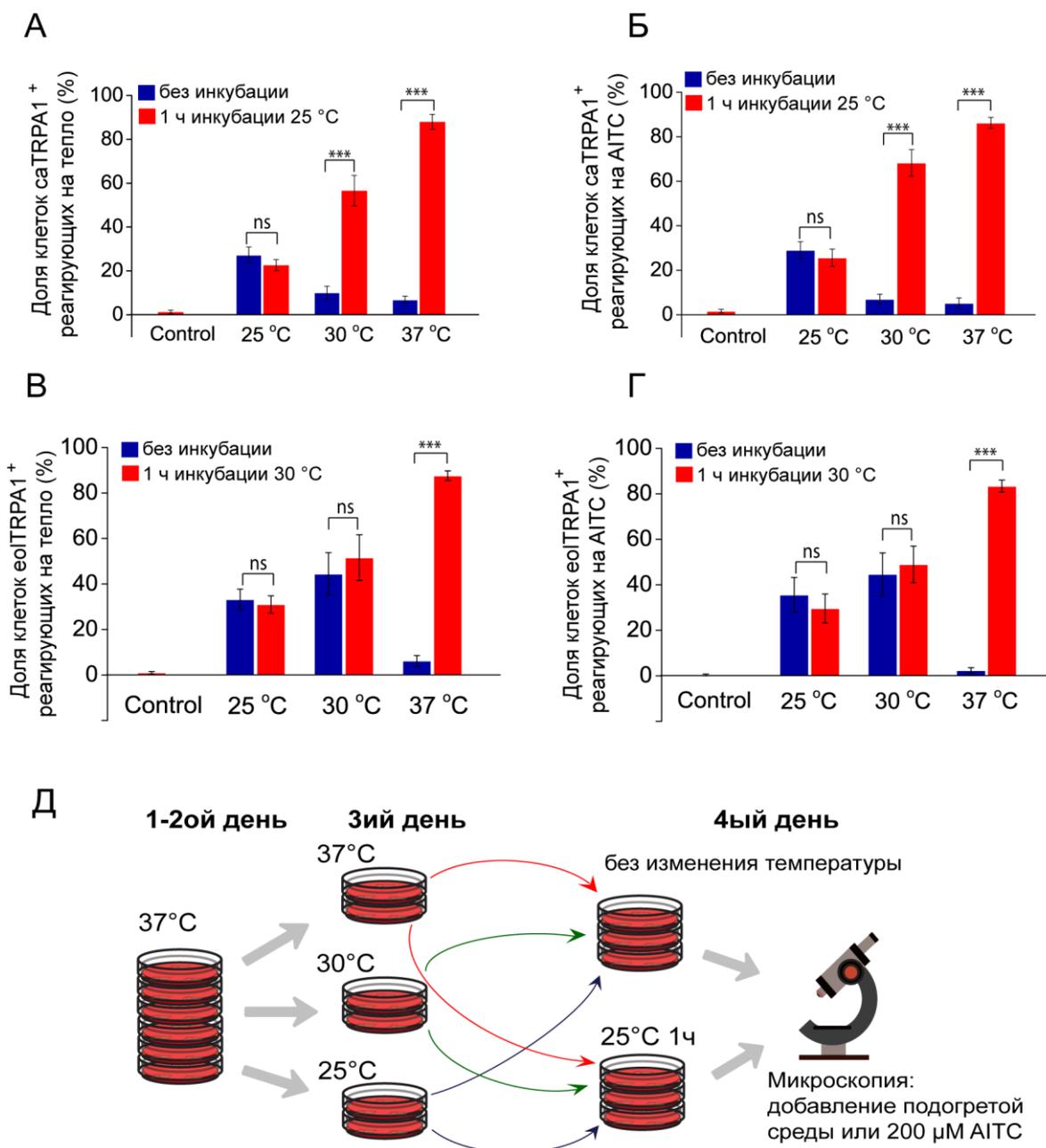


Рисунок 30. Зависимость эффективности активации TRPA1 в клетках HEK293 от температуры. А) Доля активирующихся HEK293, экспрессирующих саTRPA1 в ответ на добавление подогретой клеточной среды. Б) Доля активирующихся HEK293, экспрессирующих саTRPA1 в ответ на добавление 200 μM AITC. В) Доля активирующихся HEK293, экспрессирующих еоTRPA1 в ответ на добавление подогретой клеточной среды. Г) Доля активирующихся HEK293, экспрессирующих еоTRPA1 в ответ на добавление 200 μM AITC. Д) Схема эксперимента со сменой температур инкубации. 1-2 день все клетки росли и трансфецировали при 37°C, сразу после трансфекции клетки перенесли в CO₂-боксы на температуры 25, 30 и 37°C на сутки, а на 4ый день перед микроскопией часть клеток

проинкубировали в течение 1 ч при 25°C. Более 100 клеток в 3 экспериментах. *** $p < 0.001$, парный *t*-тест, ns-not significant (незначимо).

Примечательно, что выращивание клеток на 30 и 37°C не приводит к конститутивной активации саTRPA1. При этом клетки не отвечают на химическую или температурную стимуляцию саTRPA1 сразу после переноса их на столик микроскопа на подпороговой температуре. Но если проинкубировать их при 25 °C в течение как минимум часа, то они демонстрируют эффективную и контрастную активацию, как при повышении температуры, так и при добавлении 200 μ M АИТС (рисунок 30 А, Б). Аналогичные эффекты наблюдаются для ео1TRPA1, только с учетом того, что температура 30°C является для него подпороговой (рисунок 30 В, Г).

Всё это свидетельствует о наличии у TRPA1 собственных механизмов блокировки конститутивной активации в течение длительного времени, и о том, что для создания готовой к активации конформации TRPA1 необходима инкубация на подпороговой температуре. Это свойство TRPA1 делает их удобными для экспрессии в эукариотических культурах, выращиваемых в большинстве своем при 37°C.

3.2.4. Выбор длины волны активирующего света

Термочувствительные каналы могут быть активированы повышением температуры. Температура образца может быть повышена с помощью разных видов излучения с различной эффективностью.

Повышение температуры за счет лазерного ИК излучения представляет собой быстрый, локальный и отлично регулируемый подход к активации TRPA1. Это преимущество лазерного нагрева может иметь решающее значение в случае экспериментов *in vivo*, т.к. живые организмы сильно различаются по температурным оптимумам, предпочтениям и зачастую имеют собственные терморцепторы с определенными пороговыми температурами. Более того, экспрессия термочаналов в новых системах может приводить к изменению пороговой температуры активации [104, 113, 215]. Определяющим параметром ИК нагревания образцов является выбор длины волны ИК излучения. Для достижения максимально эффективного поглощения ИК излучения водой, мы остановились на длинах волн 1350-1440 нм для стимуляции клеток, т.к. в этой области находится максимум поглощения воды в интервале 200 – 1900 нм [205]. Коэффициент поглощения воды при 1440 нм составляет $\mu_a \approx 32 \text{ cm}^{-1}$. Более того, ИК 1440 нм слабо поглощается кварцевыми и стеклянными линзами, что облегчает манипулирование ИК для стимуляции термочаналов этой длиной волны.

Лазерная система микроскопии, дополненная *in situ* оптоволоконным зондом для термометрии клеток на основе наноалмаза с NV-центрами имеет все необходимые возможности, как для активации клеток с помощью 1440 нм ИК излучения, так и для регистрации температуры образца, что критически необходимо для определения пороговой температуры активации. Зонд содержит алмазный микрокристалл с плотностью NV центров алмаза доходящей до $10^{16} - 10^{17} \text{ см}^{-3}$, прикрепленный к концу оптического волокна с внешним диаметром 125 мкм, диаметром сердцевины 50 мкм и числовой апертурой $NA \approx 0,2$. Алмаз нагревается при помощи лазерного излучения, прошедшего через волокно, и обеспечивает локальный, хорошо контролируемый нагрев в клеточной культуре. Одновременное локальное измерение температуры осуществляется с помощью оптического детектирования магнитного резонанса, сдвиг частоты которого зависит от температуры. Магнитный резонанс вызван воздействием СВЧ поля, доставленного по двухпроводной линии СВЧ, идущей вдоль оптического волокна и состоящий из пары медных проводов с диаметром 50 мкм каждое, на дефект азотной вакансии (NV) в алмазе, который прикреплен на торце оптического волокна.

Это превращает алмаз в микроскопический быстро нагревающийся источник тепла в образце. Мы можем регулировать температуру алмаза, активируя клетки в зависимости от расстояния от алмаза, сохраняя возможность определения температуры активации клеток. В наших первых экспериментах по термогенетике мы нагревали клетки НЕК293, экспрессирующие кальциевый сенсор G-GECO1.1[91] и *caTRPA1* с помощью алмазного зонда, чтобы проверить возможность их активации и регистрации данным способом (рисунок 31).

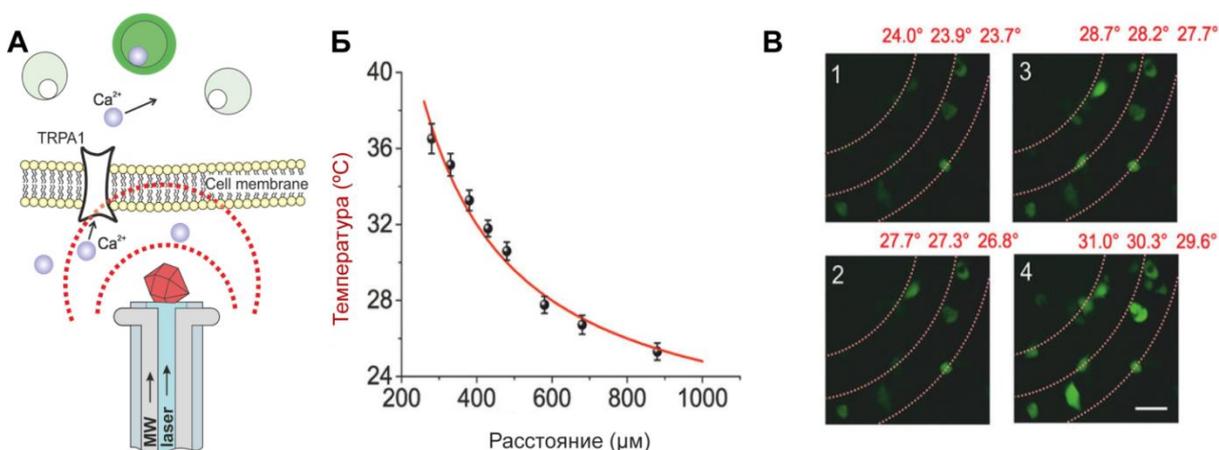


Рисунок 31. Активация клеток НЕК293, экспрессирующих G-GECO1.1 и *caTRPA1*.

А) Схема активации клеток с помощью оптоволоконного зонда на основе наноалмаза с NV-центрами. Распространение нагрева от алмаза приводит к нагреванию клеток и активации *caTRPA1*, входу в клетки катионов Ca^{2+} , при связывании с которыми растёт флуоресценция сенсора G-GECO1.1. **Б)** Зависимость распространения температуры от расстояния в образце от алмаза. **В)** Активация клеток НЕК293, вызванная различной температурой наноалмаза. Пунктирными линиями указаны радиальные уровни температуры ($^{\circ}\text{C}$). Масштаб 50 μm .

Получаемые в результате такой активации данные не предполагают больших выборок (в приведенных данных каждая точка содержит 9-10 индивидуальных измерений), т.к. на индивидуальные эксперименты может влиять толщина культуры клеток, расстояние зонда от поверхности образца, первые события активации мы наблюдали при температуре 27.3 ± 0.6 °C, а половина максимальной интенсивности сенсора G-GECO1.1 достигалась при температуре 28.0 ± 0.5 °C, что можно считать первой попыткой измерить температурный порог с помощью локальной термометрии [160].

СВЧ требует высокой мощности излучателя для нагревания крупных объектов, сравнимую с микроволновой печью, а не лабораторными источниками, а также длина волны этого излучения не позволяет проводить локальную активацию образца, поэтому для дальнейшей работы мы использовали ИК излучение, позволяющее проводить локальное и быстрое повышение температуры образца.

3.2.5. Определение параметров работы TRPA1 в клетках HEK293 при активации ИК излучением

Клетки HEK293, экспрессирующие TRPA1-IRES2-EGFP и R-GECO1.1 инкубировали при 26 °C в течение ночи в CO₂-боксе (достаточно было бы и 1 ч, но длительная инкубация вызвана издержками логистики эксперимента), а затем стимулировали фемтосекундными ИК импульсами, доставляемыми ОРО в квазинепрерывном режиме с частотой 78 МГц.

Быстрый скачок температуры приводит к её повышению с 26 °C до 30.5 °C, и, соответственно, открытию канала, и росту сигнала сенсора R-GECO1.1 в течение первой секунды с момента подачи импульса (рисунок 32А). После окончания ИК-импульса интенсивность флуоресценции R-GECO1.1 медленно спадала за счет освобождения сенсора от Ca²⁺, и, соответственно, снижения концентрации Ca²⁺ в цитоплазме HEK293.

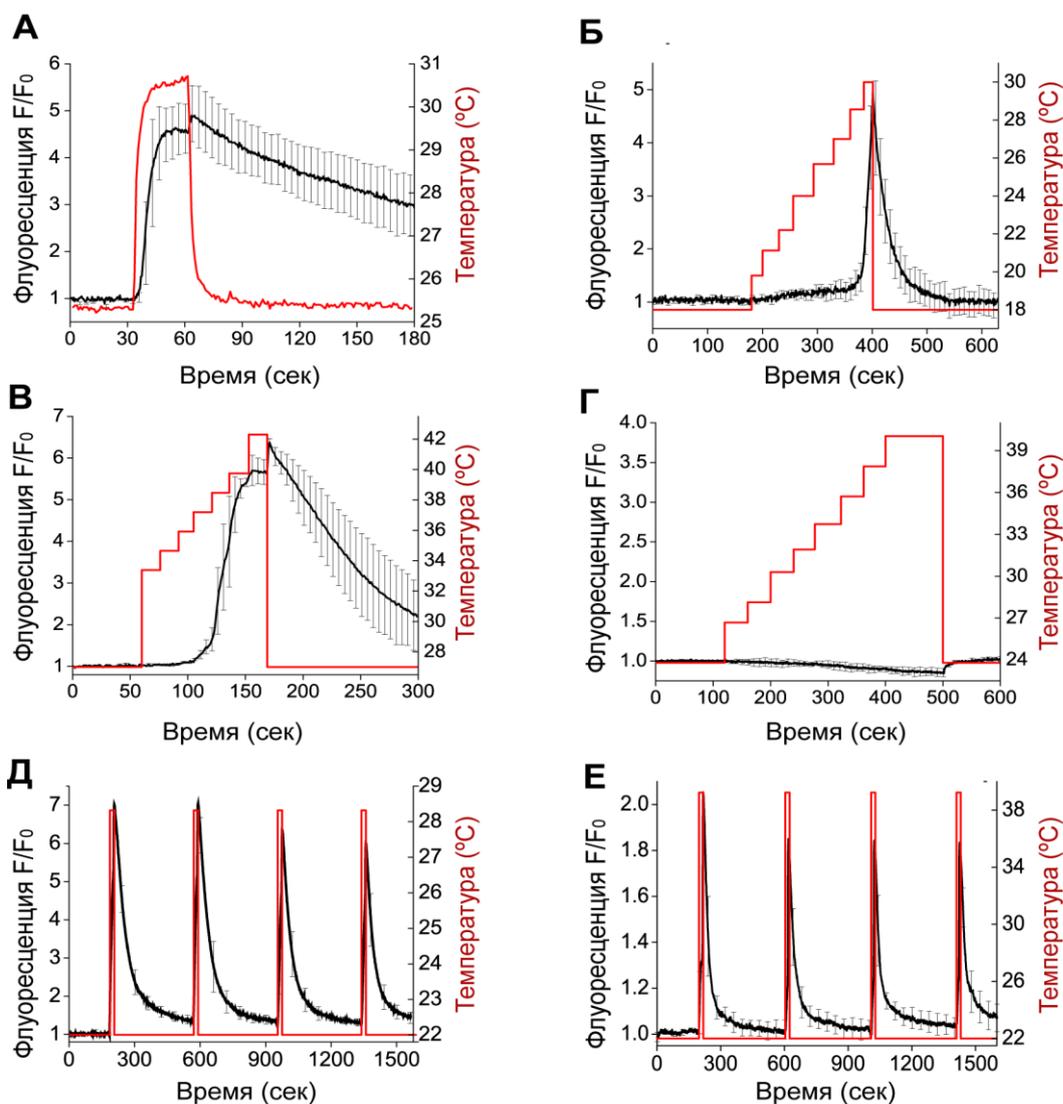


Рисунок 32. Активация TRPA1-IRES2-EGFP в клетках HEK293 с помощью ИИ излучения. **А)** Одиночный стимул клеток, экспрессирующих saTRPA1 и R-GECO1.1 (20 мВ время подачи импульса $t \approx 30$ сек и окончания $t \approx 60$ сек. **Б)** Ступенчатая стимуляция клеток, экспрессирующих saTRPA1 и R-GECO1.1. **В)** Ступенчатая стимуляция клеток, экспрессирующих eolTRPA1 и R-GECO1.1. **Г)** Ступенчатая стимуляция контрольных клеток, экспрессирующих EGFP и R-GECO1.1. **Д)** Многократная стимуляция клеток, экспрессирующих saTRPA1 и R-GECO1.1. (27 мВ). **Е)** Многократная стимуляция клеток, экспрессирующих eolTRPA1 и R-GECO1.1 (68 мВ). Более 12-15 клеток для eolTRPA1 в 2 экспериментах, более 20 клеток для saTRPA1 в 2 экспериментах.

Если путь лазерного пучка был заблокирован (нагревания не происходило), то ни активации канала, ни повышения концентрации Ca^{2+} в клетках не происходило. Если в тех же условиях стимуляции лазерный пучок направляли на клетки, экспрессирующие только R-GECO1.1, то в них также не происходило событий активации, что говорит о специфическом и нетоксическом характере активации (рисунок 32Г).

При повторении цикла активации несколько раз, каждой активации соответствовал всплеск концентрации Ca^{2+} характерной формы. Это демонстрирует воспроизводимую и многократную активацию TRPA1 в клетках НЕК293 при ИК-стимуляции (рисунок 32 Д,Е).

Мы провели поиск порога активации термоканалов, повышая температуру клеток ступенчато на $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, и наблюдая за сигналом R-GECO1.1. T_{ON} , определяемая как температура, при которой наблюдается видимый флуоресцентный ответ R-GECO1.1 на нагрев составила $27.8 \pm 0.6\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $38.5 \pm 0.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ для saTRPA1 и eo1TRPA1, соответственно (рисунок 32 Б,В).

Также было отмечено, что даже после инкубации при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение часа клетки не реагируют на медленные ($1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{мин}$) повышение температуры клеточной среды. Это может быть полезно при неточном контроле температуры, в которой находится образец перед экспериментом, например, в случае аквариумов *Danio rerio* в световой период температура медленно растет ($0.2\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{ч}$) в результате работы ламп [216].

3.2.6. Определение кинетических характеристик работы термоактивируемых каналов TRPA1

Порог активации, температура активации термочувствительных каналов – величины, зависящие от способа их определения. Порог активации может быть определен как температура, при которой возникает изменение проводимости клеточной мембраны, либо как температура, при достижении которой достигается генерация потенциала действия (ПД) у нейронов, либо как температура, при которой достигается минимальное детектируемое изменение сигнала флуоресцентного кальциевого сенсора, которую мы и выбрали в качестве начального критерия определения порога активации канала (см. 3.2.5).

Существует и другой метод определения порога активации терморцепторов по уравнению Аррениуса, которое описывает связь энергии активации реакции и константы скорости реакции, которая в данном случае представляет собой нарастание сигнала кальциевого сенсора R-GECO1.1 до 50% (T_a).

Эксперимент по определению порога активации был проведен для термочувствительных каналов saTRPA1 ($n = 34$) и eo1TRPA1 ($n = 11$) на клетках НЕК293, котрансфицированных конструкциями TRPA1-IRES2-EGFP и R-GECO1.1 (рисунок 33). Нагрев клеток осуществлялся лазерным излучением на длине волны 1440 нм. Пороговая температура T_a была определена как точка пересечения базового уровня сигнала кальциевого сенсора R-

GECO1.1 при отсутствии активации каналов (горизонтальная пунктирная прямая) и линейной аппроксимации быстро растущего участка сигнала (наклонная штрихпунктирная прямая).

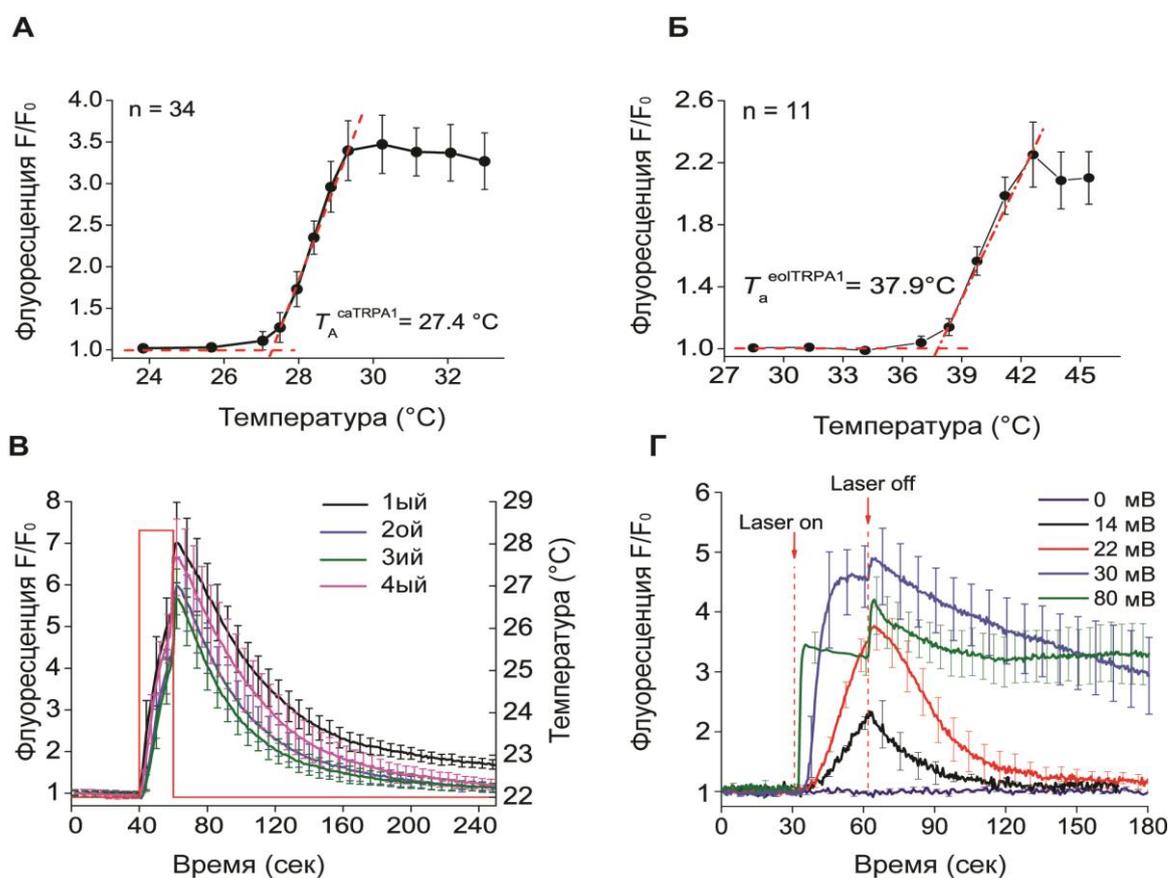


Рисунок 33. Определение порога активации термочувствительных каналов *saTRPA1* и *eo1TRPA1*. Зависимость нормализованного сигнала флуоресцентного кальциевого сенсора *R-GECO1.1* в клетках *HEK293* от температуры среды, экспрессирующих **А)** *saTRPA1* ($n = 34$) и **Б)** *eo1TRPA1* ($n = 11$) в конструкциях, содержащих метку *IRES2-EGFP*. Нагрев среды осуществлялся лазерным излучением в течение 20 с. Температура окружающей среды составляла 21°C. По данным зависимостям определялась пороговая температура активации каналов T_a методом, описанным в работах [104, 160]. **В)** Наложение профилей 4-х импульсов (1-4) с одинаковыми параметрами демонстрируют одинаковую кинетику. **Г)** Изменение кинетики активации клеток под действием квазинепрерывного ИК излучения мощностью (0, 14, 22, 30, 80 мВ), импульсы синхронизированы по времени включения лазера (отметка *Laser on*), приведены данные по 5-10 клеток для каждой кривой.

Полученная таким образом пороговая температура T_a составляет $27.4 \pm 0.4^\circ\text{C}$ и $37.9 \pm 0.8^\circ\text{C}$ для каналов *saTRPA1* и *eo1TRPA1*, соответственно, и эти данные хорошо согласуются с полученными ранее при ступенчатом нагреве значениями порога активации $T_{ON} = 27.8 \pm 0.6^\circ\text{C}$ и $38.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ для *saTRPA1* и *eo1TRPA1*, соответственно.

Также следует отметить, что при стимуляции клеток импульсами одинаковых параметров, кинетика их динамики Ca^{2+} полностью воспроизводится. При стимуляции клеток различными по мощности, но одинаковыми по длительности ИК импульсами с ростом мощности растет и скорость нарастания сигнала кальциевого сенсора, что определяет активацию терморецепторов как хорошо контролируемый по скорости процесс.

3.2.7. Термогенетическая активация нейронов мышцы в культуре.

На сегодняшний день основным полем применения термогенетики является активация возбудимых клеток, таких как нейроны и мышечные клетки [176, 217-222].

Но изучение активации неродственных терморецепторов в нейронах млекопитающих требует особого внимания, более того, многие работы по применению опто- и термогенетики описывают косвенные, обычно поведенческие эффекты *in vivo* активации ChRs и терморецепторов, без измерения характеристик работы отдельных нейронов. Существующие работы за редким исключением [159], используют активацию терморецепторов с помощью повышения температуры всего анализируемого организма или химические агонисты стимуляции работы TRPA1 [106, 217].

Чтобы заполнить эту брешь в данных, мы проанализировали динамику Ca^{2+} и электрофизиологические свойства нейронов мышцы в культуре при активации в них TRPA1 с помощью ИК излучения.

3.2.7.1. Активация TRPA1 в нейронах мышцы непрерывным ИК излучением

Конструкции TRPA1_{HisTag} для caTRPA1 и eo1TRPA1 преимущественно локализируются на плазматической мембране нейронов, что подтверждает характер локализации TRPA1 в клетках HEK293 (рисунки 28 и 34).

На нейрональной культуре было обнаружено, что экспрессия двухрамочных конструктов TRPA1-IRES2-EGFP сильно различается в индивидуальных клетках (более 500% различия по флуоресцентному сигналу EGFP), а также конструкции на основе IRES2 при экспрессии в нейронах продемонстрировали резкое снижение флуоресцентного сигнала EGFP по сравнению с культурой клеток HEK293. В то же время конструкции, несущие автопротеолитический сайт P2A TRPA1-P2A-tdTomato во всех трансфицированных нервных клетках давали высокую интенсивность сигнала (рисунок 35). Функциональная активность

каналов при таком типе метки также осталась неизменной высокой в культуре эмбриональных нейронов мыши, как и в клетках HEK293.

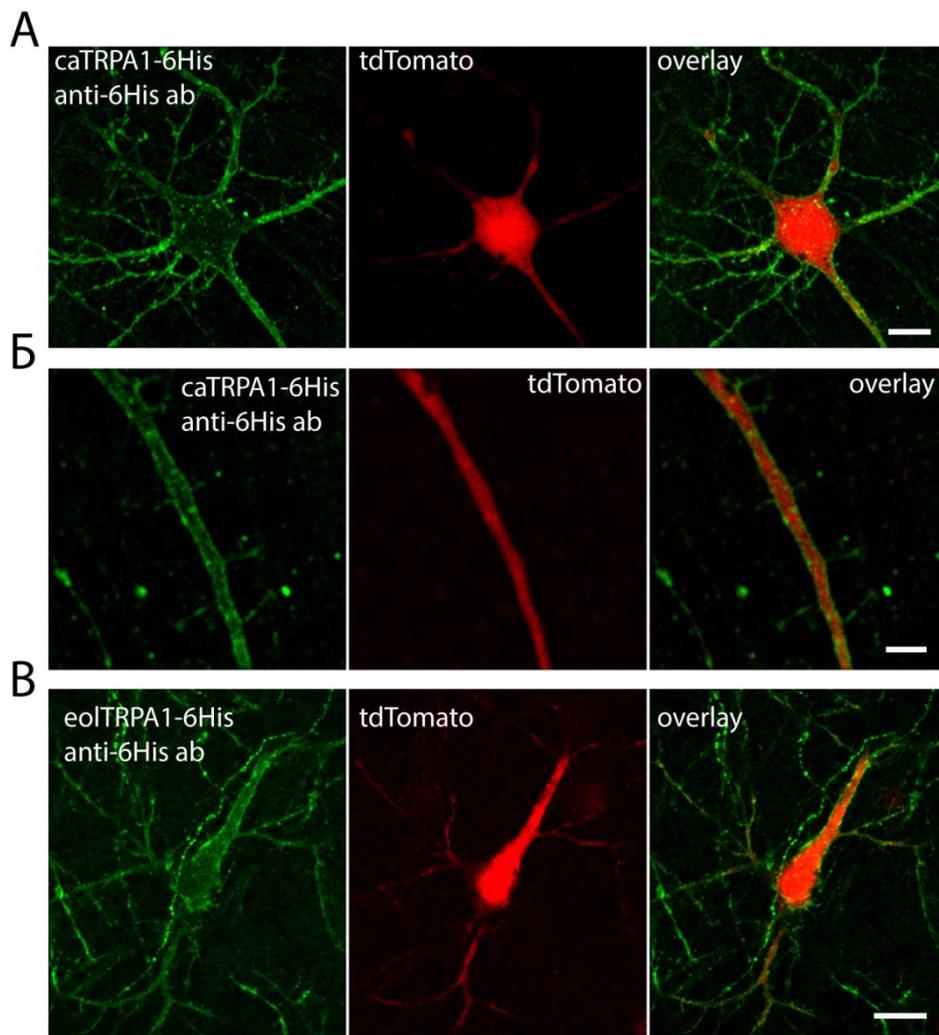


Рисунок 34. Локализация меченных производных TRPA1 в нейронах кортикальной культуры мыши.

А) Иммунофлуоресцентное окрашивание фиксированных нейронов, экспрессирующих содержащую эпитоп HisTag версию канала

caTRPA1^{HisTag}-P2A-tdTomato, окрашенную по методу ICH системой 2x антител anti6xHis -Antimouse Alexa 488. Б) Увеличенный отросток нейрона с панели А) Г) Иммунофлуоресцентное окрашивание фиксированных нейронов, экспрессирующих содержащую эпитоп HisTag версию канала

eoTRPA1^{HisTag}, окрашенную по методу ICH системой 2x антител anti6xHis-Antimouse Alexa 488 в котрансфекции с tdTomato. Масштаб 20 мкм для всех.

Таким образом, для визуализации термоактивируемых каналов была выбрана экспрессия химеры канала и флуоресцентной метки tdTomato, связанных через автопротеолитический сайт P2A, в котрансфекции с генетически-кодируемым сенсором для детекции катионов кальция GCaMP6s[86].

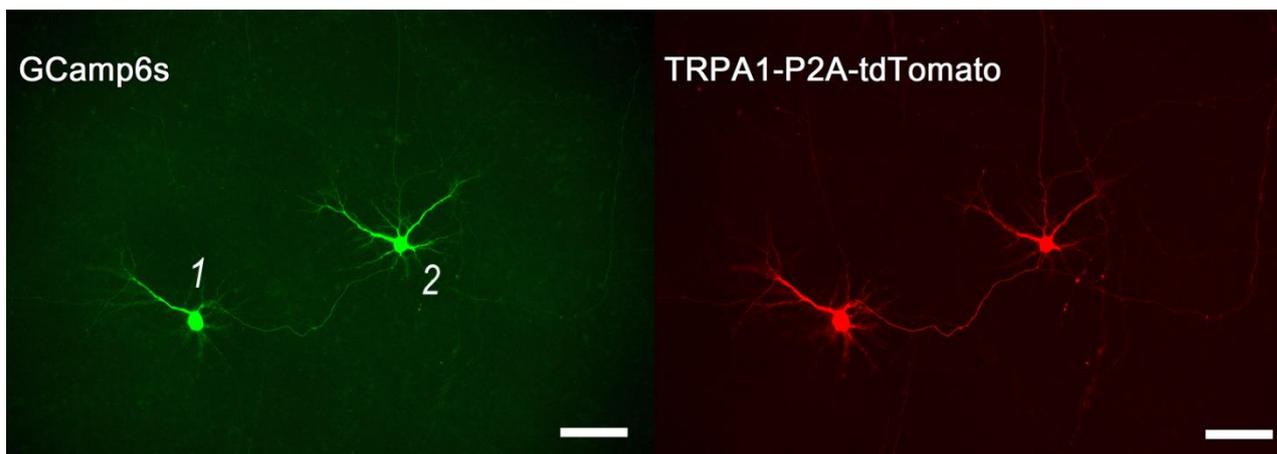


Рисунок 35. Флуоресценция эмбриональных нейронов мыши, котрансфецированных конструкцией *TRPA1-P2A-tdTomato* (красный) и кальциевым сенсором *GCaMP6s* (зеленый). Масштаб 100 мкм.

Были проведены эксперименты по активации нейронов с помощью ИК излучения. Активацию канала наблюдали по динамике флуоресцентного сигнала *GCaMP6s*.

ИК излучение может быть использовано для работы с отдельными клетками и группами клеток, т.к. лазерное ИК излучение представляет собой узкий пучок излучения, диаметр которого в приведенных экспериментах составлял 50-60 мкм, что сравнимо с диаметром индивидуальных нейронов мыши (30-50 мкм). Таким образом сфокусированное ИК излучение позволяет нагревать в основном только небольшой участок образца, находящийся в фокусе пучка излучения в пределах его диаметра (рисунок 36Г).

Как в случае стимуляции с помощью ИК излучения, так и в случае стимуляции агонистом АИТС (200 мМ), активация *TRPA1* в нейронах приводило к мощной вспышке концентрации Ca^{2+} в цитоплазме нейронов (рисунок 36 А). В случае обоих видов стимуляции амплитуда кальциевого сигнала *GCaMP6s*, стимулируемого *eoTRPA1*, была меньше, чем амплитуда сигнала, стимулируемого *saTRPA1*. Амплитуда ИК стимуляции в случае обоих каналов уступает по амплитуде и длительности химической стимуляции АИТС, что говорит о её краткосрочности по сравнению с химической активацией *TRPA1*. Контрольные клетки, трансфецированные *GCaMP6s* и *tdTomato*, не реагировали ни на ИК-стимуляцию на любых использованных комбинациях параметров, ни на химическую стимуляцию 200 мМ АИТС.

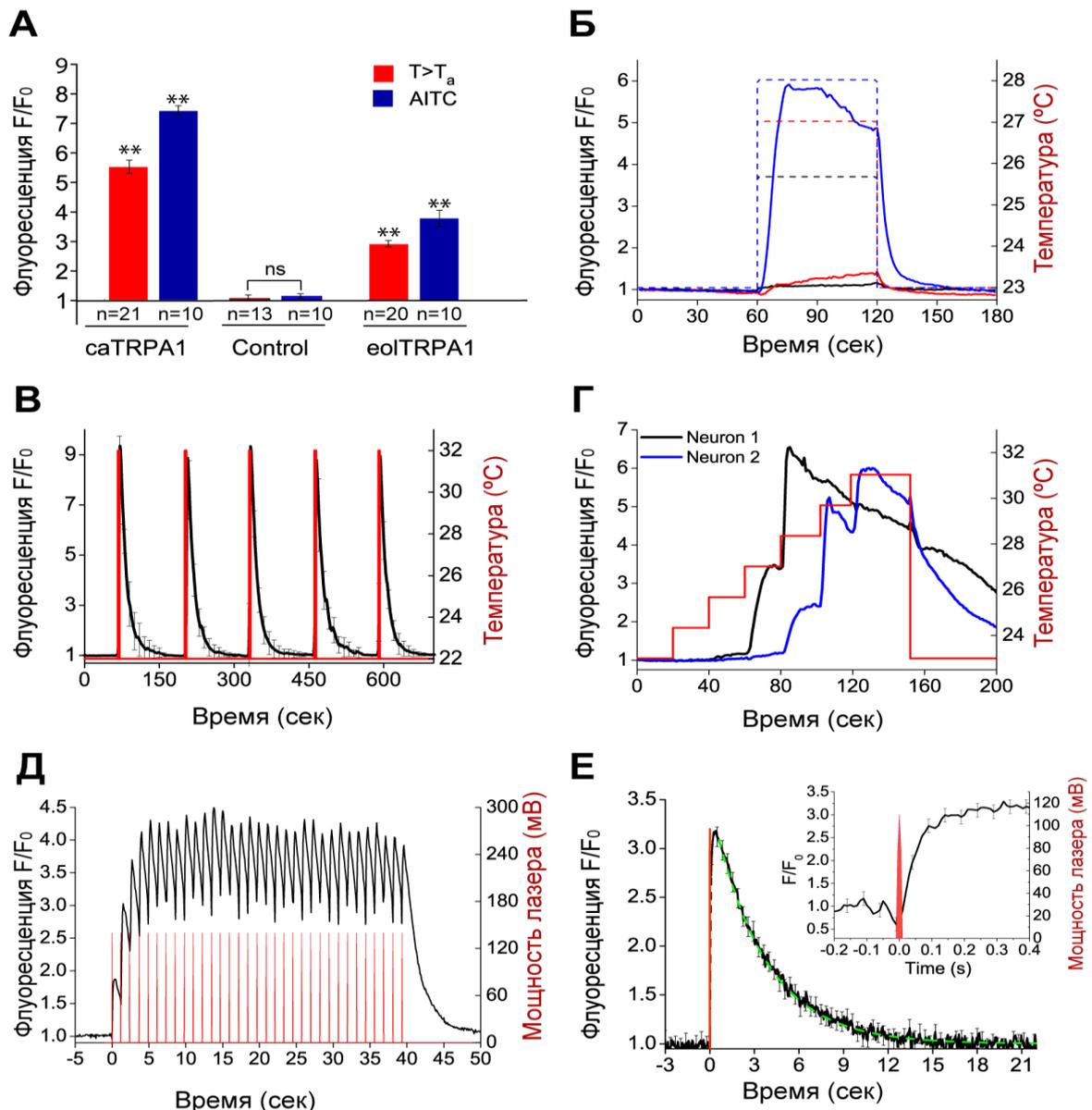


Рисунок 36. Стимуляция нейронов мыши, экспрессирующих TRPA1-P2A-tdTomato и GCaMP6s, в культуре непрерывным ИК. **А)** Стимуляция нейронов мыши в культуре, экспрессирующих TRPA1-P2A-tdTomato и GCaMP6s с помощью ИК-излучения или химического агониста AITC (200 μ M) приводит к выбросу Ca^{2+} в цитоплазме нейронов; n - число клеток в каждой группе. Для каждой группы, проводилось 3-4 стимуляции для каждой клетки в группе (10-21 клеток). ns - не имеет значения. ** $p < 0,01$, односторонний тест ANOVA с последующей коррекцией Бонферрони и тестом Дункана. **Б)** Динамика сигнала сенсора GCaMP6s нейрона при нагреве до 26.4 $^{\circ}\text{C}$ (черная линия), 28.6 $^{\circ}\text{C}$ (красная линия), 30.2 $^{\circ}\text{C}$ (фиолетовая линия). В двух последних случаях осуществлена тепловая активация нейрона ИК излучением. **В)** Многократная стимуляция клеток, экспрессирующих caTRPA1 и GCaMP6s (27 мВ). **Г)** Стимуляция соседних (1 и 2, рисунок 35) нейронов за счет распространяющегося нагрева при длительной ступенчатой стимуляции. **Д)** Импульсная стимуляция колебаний кальция в цитоплазме нейрона. Динамика сигнала сенсора GCaMP6s (черный) по частоте соответствует частоте импульсов ИК-излучения (красный). Длительность импульса 10 мс, задержка 1,23 с, частота импульсов 0,81 Гц, разрешение сигнала 100 мс. **Е)** Активация нейрона ИК импульсом длительностью 15 мс, время активации нейрона 30-40 мс.

Также мы установили, что непрерывная стимуляция ИК вызывает длительное (до 2-3 мин) повышение уровня ионов Ca^{2+} в цитоплазме нейронов (рисунок 36Е). Для активации нейрона конечная температура, создаваемая ИК стимулом, должна превышать пороговую. Повышение температуры до подпороговых значений при длительной, более 2 сек стимуляции, в некоторых случаях приводило к повышению уровня кальция в цитоплазме нейронов, но интенсивность этого ответа была в среднем меньше, чем при стимуляции надпороговыми температурами в течение более короткого времени (рисунок 36Б).

Данный вид ответа может быть вызван тем, что при температурах, близких к пороговым, часть каналов активируется, запуская слабый ответ. С ростом конечной температуры стимуляции увеличивается вероятность открытия индивидуальных каналов, что приводит к тому, что при превышении температуры увеличивается число открывающихся в единицу времени каналов, тем самым увеличивая вероятность срабатывания системы на уровне клетки.

Эту гипотезу подтверждает наблюдение, что интенсивность кальциевого всплеска в цитоплазме клетки пропорциональна интенсивности температурного скачка. При более резком возрастании конечной температуры стимуляции мы получали наиболее контрастные кальциевые ответы нейронов (рисунок 36Г).

Данная активация позволяет локально активировать отдельные нервные клетки в одной культуре, находящиеся на расстоянии от 100 мкм, что свидетельствует о высокой локальности данной системы, а также о её применимости для изучения межнейрональных связей в образцах нейронных культур (рисунок 36Г).

Также стоит отметить, что пороговая температура в нейронах мышцы может отличаться от таковой, полученной для невозбудимых клеток. Так для CaTRPA1 в нейронах мышцы T_{ON} составляет $28.5 \pm 1^\circ\text{C}$, в то время как в клетках HEK293 она равна $27.8 \pm 0.6^\circ\text{C}$. Это перекрывающиеся, но тем не менее различные значения, которые нужно учитывать в случае калибровки системы стимуляции. Дальнейшее применение канала CaTRPA1 *in vivo* планируется в нейронах холоднокровных животных, таких как рыбы *Danio rerio*, живущие при температурах в основном $26-28^\circ\text{C}$ [216, 223, 224], что позволит им развиваться при подпороговой температуре 26°C без нарушения оптимальных условий содержания.

Эта особенность *saTRPA1* дает им еще одно преимущество перед оптогенетическими инструментами, т.к. выращивание *Danio rerio*, экспрессирующих ChRs, требует полной темноты, в то время как развитие личинок *Danio rerio* светозависимо и они нуждаются в цикле смены темного и светового периодов.

Также личинки *Danio rerio* видят свет (455-620 нм), используемый для стимуляции различных ChRs, что приводит к дополнительному стрессу животного и активации нейронных ответов на зрительную стимуляцию, а не на оптогенетический стимул, но не видят 1350-1440 нм, использованные нами в термогенетической стимуляции.

3.2.7.2. Импульсная активация нейронов с помощью ИК излучения

Далее мы перешли к изучению импульсной ИК-активации нейронов. Данный вид активации проводился как одиночными импульсами 10-30 мс, а также сериями подобных импульсов с задержкой от 15 до 250 мс (рисунок 36Д).

Импульсы длительностью 15 мс формировались путем прореживания квазинепрерывного излучения ОРО на длине волны 1450 нм. Без прореживания общая мощность излучения на образце составляла бы 140 мВт, следовательно, один импульс имел энергию около 2.1 мДж. Излучение было сфокусировано в пятно диаметром 50 мкм, что определяет плотность энергии в эксперименте на уровне 100 Дж/см² на временном масштабе импульса 15 мс. Разрешение по времени в эксперименте составляло в большинстве случаев 10 мс, иногда 20 мс, и 45 мс.

Также стоит отметить, что повторные импульсы вызывали более интенсивный кальциевый ответ нейрона, чем первый импульс (рисунок 36Д). Данный эффект может быть вызван накоплением температуры, т.е. первый импульс может приводить к подпороговой стимуляции, затем образец не успевает полностью рассеять тепло от первого ИК-импульса, и последующие импульсы суммарно дают более высокую конечную температуру, чем первый, и, следовательно, более контрастный ответ канала. Другой причиной может быть следовая деполяризация нейрона после первой активации канала, которая облегчает активацию нейрона последующими импульсами.

В пользу этой гипотезы говорит то, что активация серией коротких импульсов (более 10-ти) с частотой 0,8 – 1,8 Гц не приводит к изменению интенсивности амплитуды откликов после первого импульса.

Сигнал GCaMP6s при наиболее быстрой активации нарастал до половины максимального в течение 30-40 мс, что свидетельствует об крайне быстрой для подсемейств TRPA-TRPV активации TRPA1 змей.

Затухание кальциевого ответа происходит в среднем в течение 3-3,5 сек после окончания последнего импульса (рисунок 36Е). Такое длительное затухание ответа связано не столько с работой канала, сколько с высокой аффинностью кальциевого сенсора GCaMP6s к ионам Ca^{2+} , что приводит к низкой скорости освобождения индикатора от связанных ионов Ca^{2+} , а также медленной работой откачивающих ионы Ca^{2+} АТФаз.

3.2.7.3. Электрофизиологические характеристики работы TRPA1 в нейронах мыши

Для тестирования возможности индуцировать потенциалы действия (ПД) с помощью саTRPA1 и еоTRPA1 мы проэкспрессировали эти каналы в составе конструкций TRPA1-P2A-tdTomato в кортикальной и гиппокампальной культурах нейронов мыши. Для регистрации активности нейронов использовали технику пэтч-кламп (patch-clamp), активацию саTRPA1 и еоTRPA1 проводили с помощью изолированных миллисекундных ИК импульсов, сфокусированных на соме исследуемых нейронов, а также на проксимальных частях аксонов и дендритов. Лазерные импульсы длины волны 1050 нм или 1342 нм, генерируемые ОРО на основе иттербиевого лазера были сфокусированы с помощью оптоволоконной системы с диаметром волокна 50 μ м и апертурой 0.22.

Термоактивируемые каналы нуждаются в инкубации на подпороговой температуре перед активацией, поэтому перед измерением культуры в течение часа инкубировали в проточной системе. Для саTRPA1 базовая температура измерений, при которой прединкубировали культуру нейронов в проточной камере, составляла 27 °С для саTRPA1 и для еоTRPA1 35.5 °С. После проведения калибровки мощности ИК импульсов совместно с детекцией разницы межмембранного потенциала по протоколу [168] и с учетом ранних измерений, были установлены сочетания энергий и длительностей импульсов, вызывающие подпороговое и надпороговое повышение температуры образца в области фокусировки.

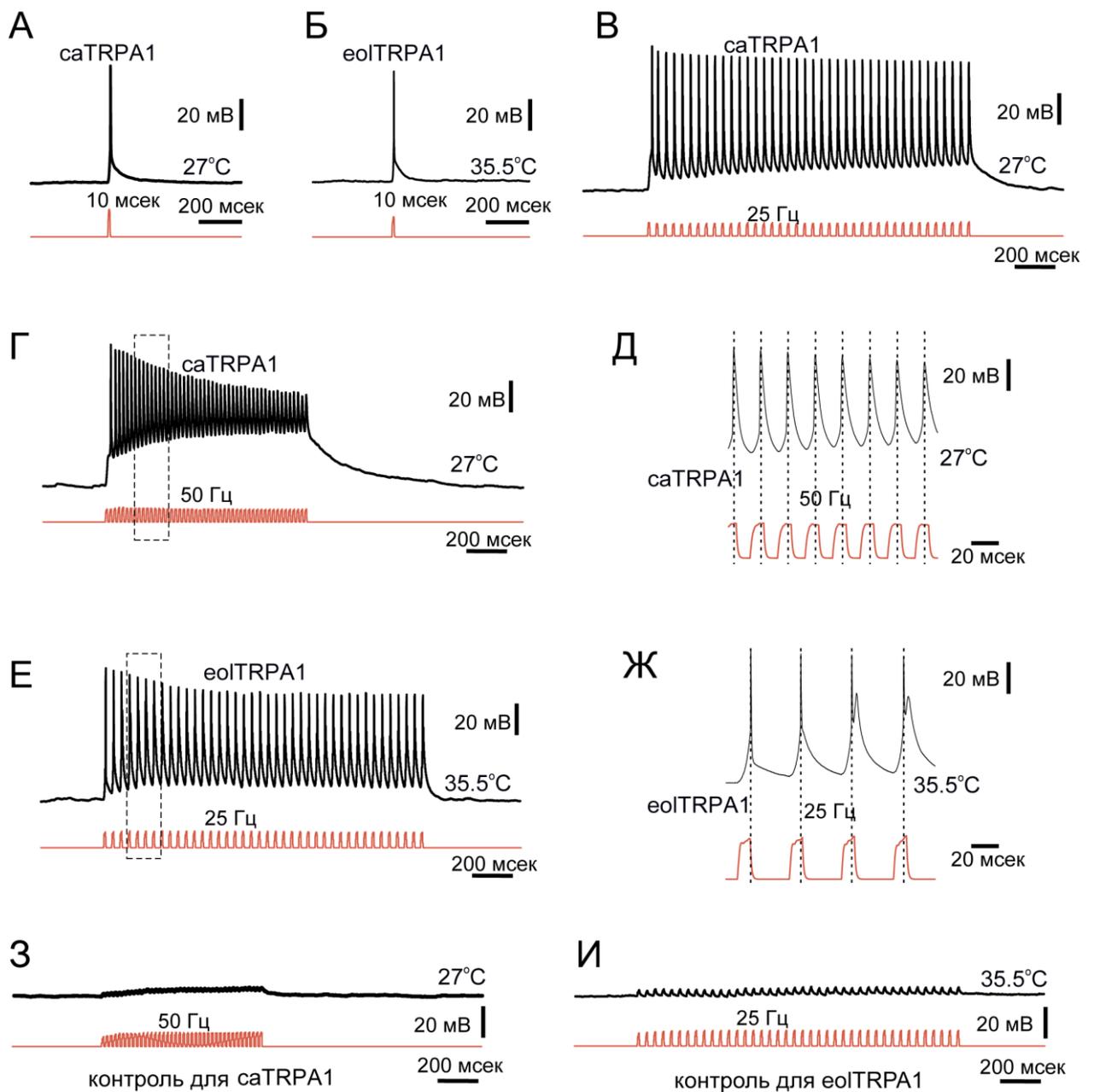


Рисунок 37. Темперогенетическая активация нейронов мышцы в культуре, экспрессирующих TRPA1-P2A-tdTomato. **А)** Индивидуальный ПД, вызванный 10-мс лазерным импульсом с длиной волны 1342 нм ($E = 1,0$ мДж) в caTRPA1⁺ нейроне на базовой температуре 27 °С. **Б)** Индивидуальный ПД, вызванный 10-мс лазерным импульсом с длиной волны 1342 нм ($E = 1,7$ мДж) в eoITRPA1⁺ нейроне на базовой температуре 35.5 °С. **В)** Пример фазовой автоподстройки отклика caTRPA1⁺ нейронов на частоте стимуляции 25 Гц (**В**) и 50 (**Г**, врезка **Д**) Гц. Индивидуальный импульс 10 мс, 1342 нм, $E = 1$ мДж. **Е)** Пример фазовой автоподстройки отклика caTRPA1⁺ нейронов на частоте стимуляции 25 Гц (врезка **Ж**) Гц. Индивидуальный импульс 10 мс, 1342 нм, $E = 1$ мДж. **З)** Стимуляция с частотой 50 Гц нейрона, экспрессирующего tdTomato с базовой температуры 27 °С. Индивидуальный импульс 10 мс, 1342 нм, $E = 4.8$ мДж. **И)** Стимуляция с частотой 25 Гц нейрона, экспрессирующего tdTomato с базовой температуры 35.5 °С. Индивидуальный импульс 10 мс, 1342 нм, $E = 4.8$ мДж.

Импульсы длительность 10 мсек (1342 нм) с энергией E индуцировали одиночные ПД в нейронах, экспрессирующих как caTRPA1 ($E = 1.0$ мДж), так и eoITRPA1 ($E = 1.7$

мДж) с базовой температуры (рисунок 37 А, Б). Аналогичный результат был получен для импульсов длиной 30 мсек с длиной волны 1050 нм, как для саTRPA1 ($E = 27$ мДж), так и для ео1TRPA1 ($E = 47$ мДж). При увеличении длины импульса до 50-100 мсек один стимул вызвал генерацию нескольких ПД (рисунок 38 В, Г). При использовании описанных параметров стимуляции в контрольных нейронах, экспрессирующих только tdTomato, генерации ПД в ответ на стимуляцию мы не наблюдали, но при увеличении мощности стимуляции до 4.8 мДж (в 4.8-2.8 раз больше необходимой стимуляции) наблюдалось небольшое повышение разности потенциалов (рисунки 37 З, И и 38А).

Лазерные импульсы меньшей энергии вызывали подпороговые изменения разности потенциалов, как саTRPA1 ($E = 9$ мДж, 9.8 ± 1.3 мВ), так и ео1TRPA1 ($E = 27$ мДж, 12 ± 3.4 мВ). Эти повышения разности потенциалов выше, чем те, которые наблюдались у контрольных нейронов, проинкубированных при соответствующих базовых температурах каналов (27 °С, 2.4 ± 0.5 мВ для саTRPA1 и 35.5 °С, 2.5 ± 0.7 мВ для ео1TRPA1). Эти данные исключают неспецифическую генерацию ПД в эксперименте, что можно было ожидать в силу литературных данных о неспецифической активации нейронов и культур эукариотических клеток с помощью ИК [176, 225, 226]. Была проведена регистрация ионного тока (тока компенсации) (voltage-clamp) нейронов, собственный потенциал которых был установлен на отметке -90 мВ. При стимуляции нейронов, экспрессирующих как саTRPA1, так и ео1TRPA1 ионный ток возникал менее, чем за 1 мсек с момента начала стимуляции, и исчезал в течение 1-2 мсек с момента окончания стимуляции (рисунок 38Д), что говорит о практически моментальной активации TRPA1 при температурной стимуляции, сравнимой по кинетике с бактериальными опсинами ChRs [227]. В среднем активация саTRPA1 одиночным импульсом вызывает деполяризацию на $+15$ мВ, входящий ток $0,4$ нА, для ео1TRPA1 эти цифры составили $+20$ мВ, входящий ток 0.5 нА.

Одним из важнейших свойств инструментов для стимуляции клеточной активности являются частотные характеристики работы инструментов и их воспроизводимость. Импульсная стимуляция нейронов сериями 10 мсек импульсов по 20 или 50 импульсов (1342 нм, $E = 1.0$ мДж) и частотой 15, 25 или 50 Гц приводило к стимуляции нейронов, экспрессирующих саTRPA1 с воспроизводимой частотой стимуляции, каждый ПД точно соответствует одному импульсу стимуляции (рисунок 37 В, Г, Д). Многие типы нейронов пойкилотермных животных, например, кожные нейроны *Danio rerio*, работают на частотах меньших, чем 50 Гц [228], что делает саTRPA1 оптимальным и достаточным молекулярным инструментом для стимуляции таких объектов.

Для eolTRPA1 нам удалось воспроизвести частоты 15 и 25 Гц (1342 нм, $E = 1.7$ мДж) с полным соответствием частоты стимуляции и генерации ПД, а в случае частоты 50 Гц в 1/3 экспериментов часть импульсов вызывала сдвоенные ПД (рисунок 37 Е, Ж).

Ни saTRPA1, ни eolTRPA1-экспрессирующим нейронам не удалось воспроизвести частоту 75 Гц во всех экспериментах, хотя 4/6 нейронов, экспрессирующих saTRPA1 удалось сделать фазовую подстройку на 40-ка импульсах частоты 75 Гц, а остальным 2-м – на 20 импульсах частоты 75 Гц. Надо отметить, что наиболее быстрые оптогенетические инструменты воспроизводят частоты до 100-200 Гц, так что в нашем случае TRPA1 с ними сравнимы. Контрольные нейроны для обеих групп не вызывали генерации ПД (рисунок 37 З, И).

Такие различия в частотных характеристиках saTRPA1 и eolTRPA1 могут быть объяснены их биологической ролью: saTRPA1 экспрессируются в ветви блуждающего нерва, иннервирующую обонятельную ямку (pit organ) и используются для охоты. eolTRPA1 взят из змей, не использующих терморезение при охоте, и их каналы экспрессируются в среднем мозге змей и используются для детекции собственной температуры тела змеи [104]. Активация eolTRPA1 скорее всего является признаком перегрева животного, поэтому eolTRPA1 может иметь менее тонкое частотное разрешение, чем saTRPA1. Этим также может объясняться более высокий порог активации eolTRPA1 относительно saTRPA1, такое распределение ролей аналогичных рецепторов (более «горячий» - детектор перегрева, более «холодный» - для поиска добычи и ориентации) встречается также у мышей-вампилов в случае разных сплайс-форм TRPV1 [113].

Далее мы провели совместную флуоресцентную микроскопию, регистрацию электрофизиологической активности и ИК стимуляцию нейронов мыши, экспрессирующих saTRPA1-P2A-tdTomato и GCaMP6s, чтобы сравнить динамику кальция и скорость активации канала (рисунок 38).

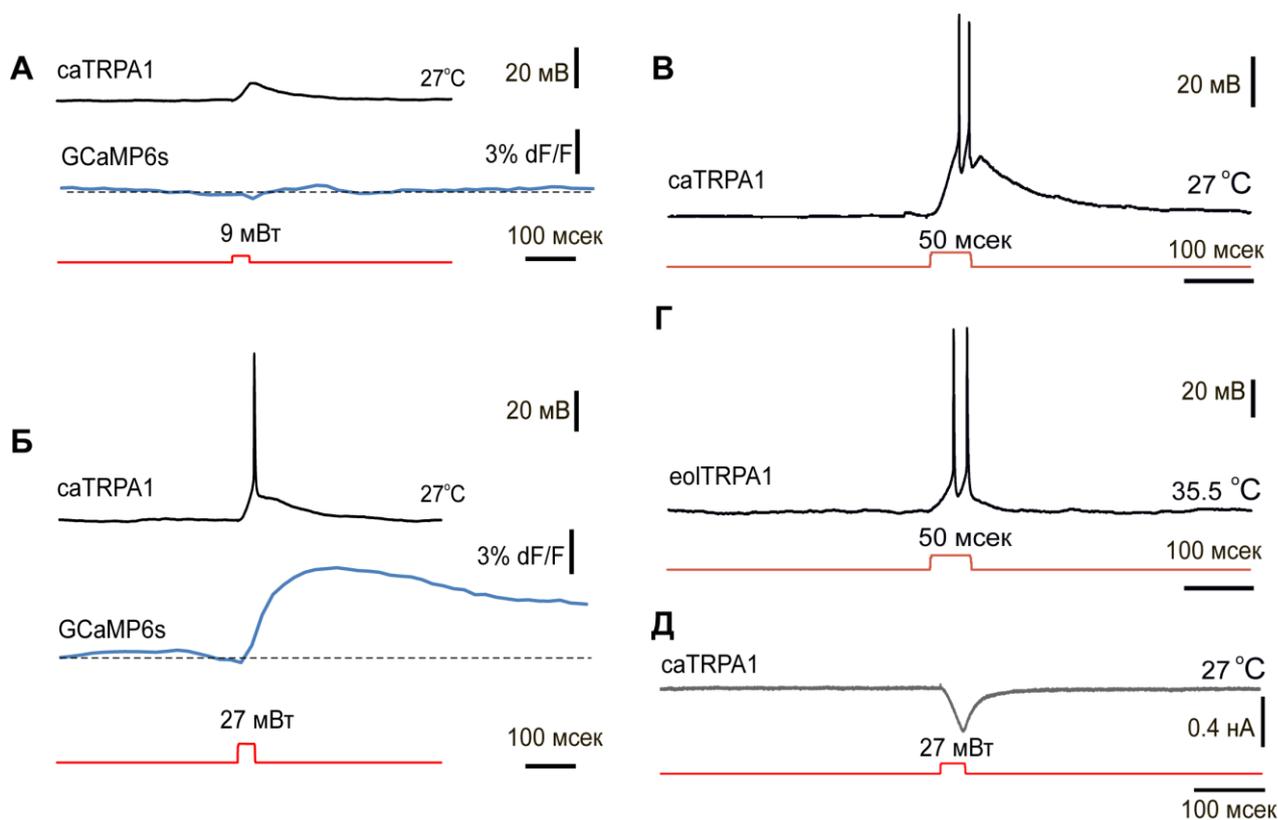


Рисунок 38. Стимуляция нейронов, экспрессирующих TRPA1-P2A-tdTomato ИК импульсам. **А)** Сравнение динамики разности мембранного потенциала и кальциевого сигнала GCaMP6s при стимуляции термоактивируемых каналов на примере caTRPA1 на культуре эмбриональных нейронов мыши, трансфицированной конструкцией caTRPA1-P2A-tdTomato и сенсором GCaMP6s. Динамика разности мембранных потенциалов при подпороговой (9 мВт). **Б)** надпороговой стимуляции (27 мВт). **В)** Стимуляция нейронов, экспрессирующих caTRPA1-P2A-tdTomato импульсом 50 мсек и мощностью 1.0 мДж приводит к генерации сдвоенного ПД. **Г)** Стимуляция нейронов, экспрессирующих eoTRPA1-P2A-tdTomato импульсом 50 мсек и мощностью 1.7 мДж приводит к генерации сдвоенного ПД. **Д)** Стимуляция нейронов, экспрессирующих caTRPA1-P2A-tdTomato импульсом 30 мсек и мощностью 1.0 мДж приводит к активации caTRPA1 и возникновению входящего катионного тока в течение 1 мсек с момента стимуляции. Регистрация ионного тока (тока компенсации) в режиме voltage-clamp.

Ответ каналов на стимуляцию (10 мсек, 1.0 мДж, 1342 нм) в виде деполяризации и входящий ток возникает в течение 1 мс с начала стимуляции, ПД возникает после 30-35 мс стимуляции, рост сигнала GCaMP6s наблюдается в течение первых мсек с момента стимуляции и достигает 50% интенсивности за 30-40 мсек, что подтверждает данные, полученные на флуоресцентной микроскопии (рисунок 38Б). При подпороговой стимуляции изменений в кальциевом сигнале не наблюдается, как и генерации ПД (рисунок 38А).

Что характерно, после генерации ПД в клетках, экспрессирующих caTRPA1, наблюдается длительная следовая деполяризация клетки на 2-3.5 мВ (рисунок 38 В), которая может

быть вызвана как медленной инактивацией канала, так и работой других, потенциал-зависимых каналов клетки, т.к. длительность этой деполяризации была индивидуальна в случае каждой клетки и варьировала от 250 мс до 2 с, а в случае фиксации входящих ионных токов она практически не обнаруживалась. В случае eolTRPA1 следовая деполяризация практически не наблюдалась, что позволяет отнести её эффект к различиям в поведении нейронов при инкубации 27 °С или 37°С, но также может быть следствием индивидуальных особенностей нейронов в культуре и их реакции на стимул.

Стабильное возникновение ПД при активации канала надпороговой мощностью ИК-лазера, воспроизводимость частот активации вплоть до 50 Гц, высокий уровень деполяризации клеток, быстрая кинетика работы канала позволяет сделать вывод о возможности использования TRPA1 змей для стимуляции животных *in vivo*.

3.2.8. Термогенетическая стимуляция личинок *Danio rerio in vivo*

Для экспрессии в нейронах *Danio rerio* был выбран канал caTRPA1. Нами было протестировано две смеси генетических конструкций на основе системы зависимой экспрессии дрожжевой двугибридной LexA-LexAoperator, в которых транскрипция белка активатора находится под контролем соматосенсорного энхансера z-crest3 гена islet-1.

Ген канала caTRPA1 [104] был клонирован под соматосенсорный энхансер z-crest3 гена islet-1 под контролем дрожжевой двугибридной системы регуляции экспрессии LexA-LexAoperator (рисунок 39) [229]. Активация транскрипции на энхансере z-crest3 активирует синтез белка-активатора транскрипции LexA. LexA связывается с кассетой из четырех тандемных повторов LexAoperator, индуцируя синтез термочувствительного канала caTRPA1. Канал синтезируется без дополнительных меток, что, согласно нашей предыдущим исследованиям, является наиболее эффективной для стимуляции версией канала. Для визуализации трансфецированных нейронов личинке *Danio rerio* совместно с этой конструкцией проводили коинъекцию вектора на базе pC1, собственный промотор которого был заменен на вторичный активатор транскрипции LexAoperator. Под контролем тандемных повторов LexAoperator был клонирован ген флуоресцентного белка tdTomato, одного из наиболее ярких красных белков. Транскрипция с подобного вектора возможна только в том случае, когда в клетке присутствует активатор LexA, таким образом, синтез tdTomato в клетках возможен только тогда, когда в клетке одновременно находятся два вектора, вектор визуализации и вектор, содержащий caTRPA1 (рисунок 39). Эта система удобна для визуализации

различных немеченных белков без внесения в них дополнительных модификаций, таких как создание флуоресцентных белков слияния, так и избежать клонирования протяженных генетических конструкций (длина гена термоактивируемого канала составляет ок. 3300 а.о., в случае клонирования автопротеолитической химеры с caTRPA1-P2A-tdTomato длина кодирующей последовательности увеличивается до 4800 а.о.) с риском внесения случайных мутаций, а также позволяет избежать создания дополнительных векторов, т.к. вектора визуализации универсальны для всех систем. В качестве контрольной конструкции был приготовлен вектор pC1, содержащий соматосенсорный энхансер z-crest3, активатор LexA, сайт посадки активатора LexAoperator и серию из 6 стоп-кодонов (6xTAA). Коинъекция данного вектора совместно с вектором визуализации приводит к синтезу только флуоресцентного белка tdTomato в соматосенсорных нейронах, контрастированных двумя векторами, но в них отсутствует термочувствительный канал.

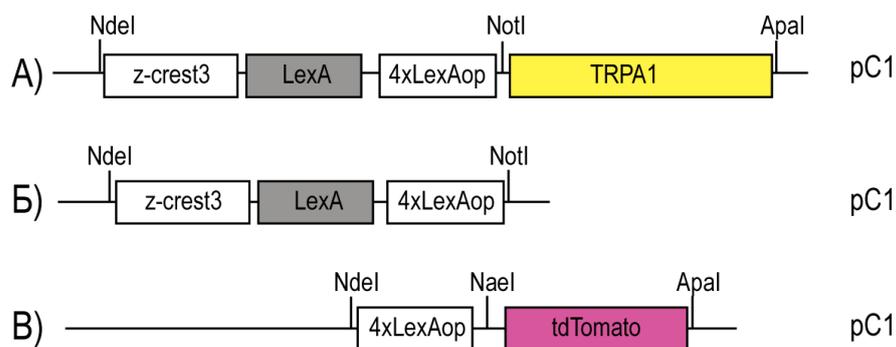


Рисунок 39. Схемы конструкций для экспрессии белков в личинках *Danio rerio*. А) конструкция, несущая ген канала caTRPA1 и белка активатора LexA, а также его сайт связания, состоящий из 4х тандемных повторов 4xLexAop (LexAoperator). Инъекция данной конструкции автономно запускает синтез канала в соматосенсорных и рохановских нейронах личинки. Б) Контрольная конструкция, инъекция которой позволяет синтезировать только активатор LexA. В) Репортерная конструкция, с которой синтезируется флуоресцентный белок tdTomato, но только в том случае, если она окажется в той же клетке, что и конструкции А и/или Б, т.к. у конструкции В нет продукции собственного белка активатора LexA, связывание которого с 4xLexAop индуцирует синтез.

Описанные конструкции были введены в ооциты с помощью микроинъекции на стадии одного бластомера в виде смеси плазмид. Полученные в результате микроинъекции личинки *Danio rerio* были проанализированы с помощью флуоресцентной микроскопии.

Экспрессия термоактивируемых каналов в нейронах личинок при их культивации при $26.5 \pm 1^\circ\text{C}$ не повлияла на их морфологию и общую смертность (проанализировано более 300 личинок в каждой группе, включая контрольные, экспрессирующие только

флуоресцентные метки), что говорит об отсутствии видимого токсического эффекта конститутивной экспрессии *caTRPA1 in vivo* при выращивании личинок в физиологических условиях. Это является одним из преимуществ термоактивируемых рецепторов перед оптогенетическими инструментами, такими как фотоактивируемые опсины (ChR2, ChEF, ReaChR), экспрессия которых в личинках *Danio rerio* требует выращивания личинок в темноте, в то время как личинки имеют светозависимое развитие и нуждаются в смене периодов освещения и темноты [216].

Конструкции на основе соматосенсорного энхансера *z-crest3* были использованы для экспериментов по активации у личинок *Danio rerio* поведенческой реакции избегания (рисунок 40). Данная модель основана на стимуляции соматосенсорных нейронов, в норме определяющих тактильную чувствительность личинки. При активации нейронов данной группы личинки делают несколько взмахов хвостом с высокой амплитудой, инстинктивно стремясь избежать механического контакта или опасности.

Использование соматосенсорного энхансера *z-crest3* гена *islet-1* позволяет локализовать экспрессию *caTRPA* в соматосенсорных нейронах, а также нейронах рохоновского типа (Rohon-Beard), наиболее крупных представителей подкожных чувствительных нейронов (рисунок 40 А, Б). Данный энхансер среди 4-х известных соматосенсорных энхансеров рыб обладает наиболее высокой специфичностью экспрессии и увеличивает долю трансфекции именно рохоновских нейронов, выполняющих роль основных чувствительных нейронов кожи рыб. Стимуляция рохоновских нейронов наиболее эффективна для модели поведения избегания, кроме того их легче обнаружить с помощью флуоресцентной микроскопии, т.к. диаметр сомы нейронов этой группы может достигать 50-70 мкм, что почти в 2 раза больше диаметра тел нейронов тройничного нерва [184].

Данный способ трансфекции отличается сравнительно низкой эффективностью (в среднем на личинку приходится 10-15 трансфицированных общих соматосенсорных и рохоновских нейронов), но это позволяет проводить высоколокальную стимуляцию личинок за счет активации индивидуальных нейронов, т.к. расстояние между экспрессирующими термочувствительными каналами клетками много больше диаметра пучка инфракрасного лазера (60 мкм), использованного в дальнейшем для стимуляции личинок.

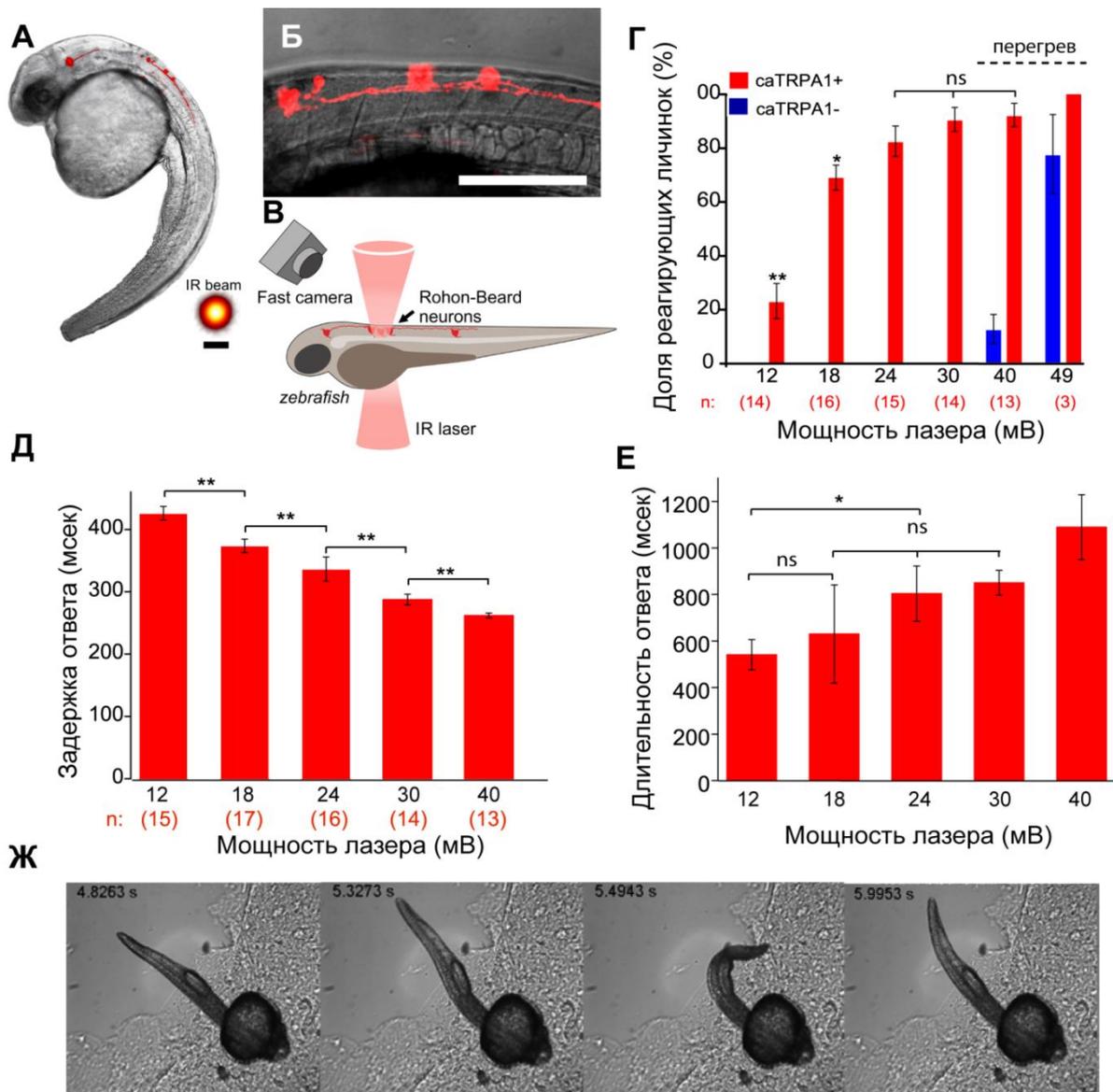


Рисунок 40. Термогенетическая стимуляция поведения избегания у 2х дневных личинок *Danio rerio*.

А) Схема экспрессии *caTRPA1* в соматосенсорных нейронах *Danio rerio*. **Б)** Флуоресцентное изображение соматосенсорных нейронов, экспрессирующих *caTRPA1* и *tdTomato* под кожей личинки. Масштаб 250 μm **В)** Схема системы регистрации и активации двигательной активности личинки. **Г)** Эффективность активации личинок при различной мощности лазерного излучения (1350 нм). **Д)** Зависимость времени задержки ответа от мощности лазерного излучения. **Е)** Зависимость длительности ответа от мощности лазера. **Ж)** Покадровое представление поведения избегания у личинки с очищенным из агарозного геля хвостом при стимуляции ИК излучением. *n* – число животных в группе, не менее 3х стимуляций на одной мощности для каждого животного. *ns* (not significant) – незначимые статистически отличия между группами. Для статистической обработки результатов был использован алгоритм *one-way ANOVA*. * соответствует $p < 0.05$, ** соответствует $p < 0.01$.

Личинки в возрасте 2х дней после оплодотворения извлекали из хориона, и помещали в 1% агарозный гель (32-35 °С), после чего инкубировали в геле при температуре 25 °С в течение 10-15 мин для стабилизации двигательной активности (нагревание при полимеризации вызывало мощный всплеск двигательной активности у личинок, экспрессирующих термочувствительный канал $caTRPA1$ ($caTRPA1^+$), а также спонтанные всплески активности у контрольных личинок). Для общих измерений эффективности, скорости и длительности ответа личинки оставляли полимеризованными в гель целиком, и регистрировали двигательную активность по сокращениям миомеров, которые отчетливо видны при световой микроскопии.

Для демонстрации поведения избегания хвост личинки освобождали из агарозы, оставляя голову полимеризованной в агарозу, чтобы личинка не могла смещаться в поле зрения (рисунок 40Ж). Эффективность стимуляции зависела от мощности ИК-излучения: на мощности 12 мВт мы индуцировали мышечные сокращения только у 23% исследуемых эмбрионов, увеличение мощности стимуляции до 18 и 30 мВт приводило к увеличению процента реагирующих личинок до 72% и 93%, соответственно, без видимой реакции у контрольных животных (рисунок 40Г). Повышение мощности лазера до 40 мВт приводило к демонстрации поведения избегания у 11% контрольных животных, что может быть объяснено неспецифической стимуляцией собственных терморецепторов личинок TRPV1, также экспрессирующихся в группе соматосенсорных нейронов.

Время задержки поведенческого ответа строго зависит от мощности стимуляции, т.к. определяет динамику повышения температуры. Минимальное время специфического ответа мы наблюдали при мощности 30 мВт и оно составило 288 ± 8 мс до момента начала движения (рисунок 40Д). Это время включает в себя как время нагревания образца до пороговой температуры, активацию канала, генерацию потенциала действия в соматосенсорном нейроне, а также проведение сигнала к миомерам хвоста личинки, что делает его сравнимым с таковым для различных фотоактивируемых опсинов (100-150 мс до возникновения реакции при фотоактивации).

В ответ на стимуляцию личинка производит в среднем 1-3 взмаха хвостом с высокой амплитудой. Суммарная длительность ответа в среднем составляет 800 мс и слабо зависит от мощности стимуляции (значимо отличаются группы, разница между которыми составляет более 10 мВт, рисунок 40Е).

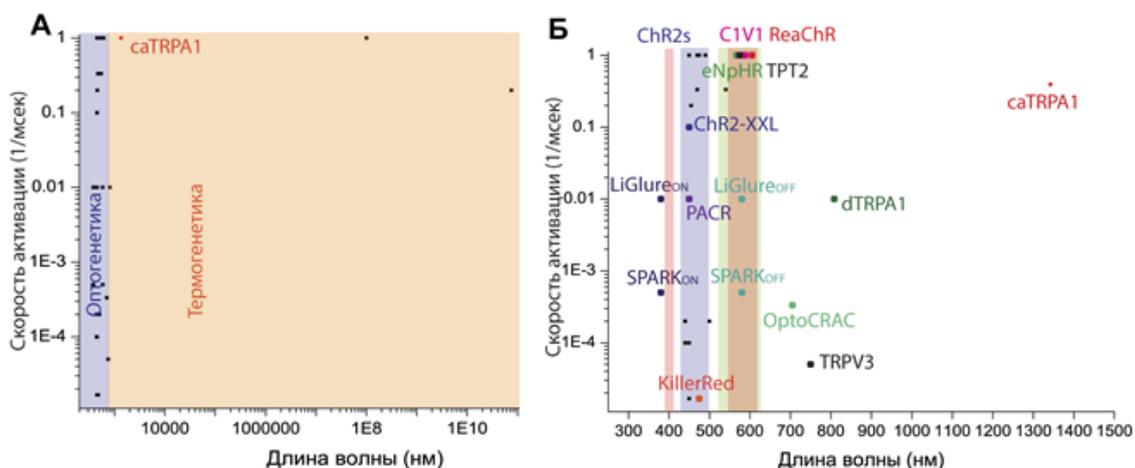


Рисунок 41. Распределение оптогенетических и термогенетических инструментов по их спектральным и кинетическим характеристикам, измеренным в культурах нейронов мыши.

А) Логарифмическое представление по длине волны активации и скорости активации. **Б)** Логарифмическое представление по оси скорости активации и линейное по длине волны. Использованы данные Приложения 1.

Таким образом, во второй части работы нам удалось описать параметры активации термочувствительных каналов змей caTRPA1 и eoTRPA1.

Активация светом длины волны 1342 нм на базе современной оптоволоконной системы активации позволило провести активацию клеток, сравнимую по скорости с активацией наиболее быстрыми инструментами оптогенетики - бактериальными опсинами, но с использованием ИК излучения, менее фототоксического, легче проникающего в ткани за счет сниженного поглощения органических молекул в области ИК (1100-1450 нм), и поставить новую отметку на графике распределения свойств генетических инструментов (рисунок 41).

На сегодняшний день панель инструментов оптогенетики включает множество инструментов, имеющих практически весь набор соотношений спектральных и кинетических характеристик, а также способных как индуцировать, так и подавлять клеточную активность. Но проблема в том, что спектры активации многих инструментов оптогенетики сильно перекрываются, так спектр активации «красных» активирующих родопсинов C1V1 и ReaChR полностью входит в спектр активации «желтых» ингибиторных опсинов eNpHR,

TRP1-2, что делает практически сложным их раздельное возбуждение в одном образце, особенно если в эксперименте ведется параллельная детекция флуоресцентного сигнала. Также незрелые формы C1V1 и ReaChR имеет короткую полосу возбуждения в области 400 нм, которая несколько осложняет их работу совместно с «синими» классическими опсинами-производными ChR2. Поэтому потребность в развитии и модификации молекулярных инструментов стимуляции и ингибирования клеточной активности до сих пор остается, и использование TRPA1 змей, продемонстрированное в данной работе, способно решить эту проблему в ряде задач. Например, в дальнейшем возможна модификация ионной селективности TRPA1 змей, которая, позволит получить из них каналы, специфичные к Cl^- , Na^+ , K^+ , расширив панель инструментов термогенетики.

В ходе данной работы термогенетика впервые была приведена к клеточному разрешению, а временные характеристики метода оказались сравнимыми с таковыми в классической оптогенетической стимуляции. Термогенетика не претендует на полное замещение оптогенетики в арсенале методов регуляции активности клеток, но, как минимум, она является теперь полноценным альтернативным подходом, имеющим свои плюсы и минусы, способным дополнять классические методы оптогенетики.

ВЫВОДЫ

1. Получен красный генетически кодируемый сенсор для детекции пероксида водорода HyPerRed. Основой сенсора являются бактериальный пероксид-чувствительный домен белка OxyR, ранее использованный при создании сенсора HyPer, и красный флуоресцентный белок mApple, подвергнутый круговой пермутации.
2. Спектральные и кинетические характеристики сенсора HyPerRed исследованы в условиях *in vitro* и *in situ*. HyPerRed аналогичен сенсору HyPer по чувствительности и скорости реакции с пероксидом водорода, и в 5.2-раза превосходит его по яркости, и может быть использован для детекции низких концентраций пероксида водорода.
3. Сенсор HyPerRed был использован в условиях физиологической стимуляции продукции пероксида водорода в клетках с помощью эпидермального ростового фактора. Кроме того, с помощью сенсора обнаружен локальный, кратковременный всплеск продукции пероксида водорода в матриксе митохондрий при ингибировании захвата кальция эндоплазматическим ретикуломом. При этом пероксид водорода не распространяется из матрикса в межмембранное пространство митохондрий и цитоплазму клетки.
4. Проведена работа по оптимизации флуоресцентных производных термоактивируемых каналов змей caTRPA1, eo1TRPA1. Наилучшим видом флуоресцентной метки признана автопротеолитическая конструкция TRPA1-P2A-tdTomato. Меченные таким образом каналы имеют локализацию и эффективность стимуляции, не отличающиеся от wtTRPA1. Обнаружен эффект ингибирования активности TRPA1 в клетках HEK293 и нейронах мыши в культуре при выращивании их на температуре выше пороговой температуры активации каналов, который снимается инкубацией клеток в течение 1 ч на подпороговой температуре. Описаны кинетические и частотные параметры работы TRPA1 змей, и разработана методика стимуляции TRPA1 с помощью инфракрасного излучения для клеток HEK293, нейронов мыши в культуре и личинок *Danio rerio in vivo*.
5. Проведена *in vivo* стимуляция поведения избегания у 2х-дневных личинок *Danio rerio* с помощью активации термочувствительного канала caTRPA1 и инфракрасного излучения.

Была показана высокая эффективность (до 93%) и специфичность стимуляции. Таким образом, термогенетика может быть использована в широком круге приложений в качестве альтернативы оптогенетике.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время наиболее значимые открытия в биологии клетки совершаются на стыке научных дисциплин, когда новые инструменты и технологии помогают найти ответы на старые вопросы, ранее недоступные для изучения существующими методами.

Развитие новых молекулярных инструментов для визуализации, активации и подавления клеточной активности позволяет получить новые данные о работе внутриклеточных механизмов передачи сигнала и развитии паталогических состояний клеток и тканей.

В данной работе мы провели разработку и оптимизацию двух молекулярных инструментов для стимуляции и регистрации клеточной активности.

В первой части данной работы описано создание на основе сенсора HyPer генетически-кодируемого сенсора HyPerRed, обладающий спектром красного флуоресцентного белка mApple. Мы охарактеризовали данный сенсор *in situ* и *in vitro*, установив, что HyPerRed не уступает по чувствительности и кинетическим характеристикам исходному сенсору HyPer, а значит быть использован для детекции физиологических концентраций пероксида водорода в живых клетках, например при стимуляции клеток ростовым фактором EGF.

HyPerRed расширяет панель сенсоров для детекции пероксида водорода и может быть использован в сочетании с большинством существующих сенсоров, основанных на желтых и зеленых флуоресцентных белках. С помощью HyPerRed мы обнаружили локальный, кратковременный всплеск продукции пероксида водорода в матриксе митохондрий, при котором не происходит распространения пероксида водорода в межмембранное пространство или цитоплазму клетки при стимуляции клеток тапсигаргином. Этот эксперимент продемонстрировал совместное применение спектрально различных сенсоров для детекции пероксида водорода (HyPer/HyPer2 и HyPerRed) в различных локализациях, что позволяет детектировать распространение пероксида водорода одновременно в нескольких компартаментах клеток.

Вторая часть работы была посвящена оптимизации применения термоактивируемых каналов змей TRPA1 (caTRPA1, eolTRPA1). TRPA1 змей были выбраны как инструменты термогенетики, т.к. эти каналы обладают высокой чувствительностью к температуре, т.к.

в природе змеи используют их для ориентации в процессе охоты в ночное время, что позволяло предположить высокую скорость активации этих белков в образцах.

В качестве метода локального повышения температуры было выбрано освещение образца с помощью инфракрасного лазерного излучения (1040-1450 нм), т.к. оно позволяет локально быстро повышать температуру образца, а также инфракрасное излучение невидимо для большинства организмов, используемых в качестве биологических моделей, что позволяет избежать влияния стресса на результаты эксперимента.

Было установлено, что при экспрессии в клетках HEK293 и нейронах мыши TRPA1 наблюдается эффект ингибирования активности TRPA1, который снимается инкубацией клеток в течение часа на подпорогой температуре. Данный эффект позволяет использовать TRPA1 для большого количества объектов, не нарушая их физиологических условий выращивания.

Была описана кинетика активации TRPA1, установлено, что при одинаковых параметрах длительности и мощности импульса кинетика развития кальциевого ответа клеток в точности воспроизводится, а сама кинетика стимуляции описывается температурной константой порога, индивидуальной для каждого канала. При изучении электрофизиологических характеристик работы TRPA1 на нейронах мыши было установлено, что TRPA1 змей активируются в течение первой мсек с момента начала стимуляции, а также способны воспроизводить частоту стимулирующего импульса, что открывает новые возможности для использования TRPA1 для регулируемого управления деполяризацией и кальциевым метаболизмом клеток, а так же для декодирования сигналов в клетках.

В качестве примера *in vivo* стимуляции с помощью TRPA1 была проведена поведения избегания у 2х-дневных личинок *Danio rerio* с помощью активации термочувствительного канала saTRPA1 и инфракрасного излучения. Была показана высокая эффективность и специфичность данной стимуляции, а также отсутствие токсического эффекта экспрессии saTRPA1 в личинках *Danio rerio* без нарушения стандартных условий их выращивания. Полученные данные представляют собой детальное описание процесса активации TRPA1 в различных биологических моделях, а разработанные методы их активации позволяют расширить применение термогенетики в современной науке.

Данная работа объединяет в себе два больших раздела развития технологий: создание новых генетически-кодируемых сенсоров и разработку способов активации клеток. Главными результатами данной работы является создание нового красного генетически-кодируемого сенсора для детекции пероксида водорода HyPerRed, а также разработка, оптимизация и применение *in vivo* метода термогенетики для стимуляции клеток с помощью термоактивируемых каналов TRPA1 змей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ATCC - Американская коллекция клеточных культур
- CamKII - кальмодулин-зависимая киназа 2
- cAMP - циклический аденозинмонофосфат
- CCCP - карбонил цианид м-хлорфенил гидразон
- cGMP - циклический гуанозинмонофосфат
- ChRs – channelrhodopsins, бактериальные опсины
- cpYFP - циклически пермутированный YFP
- DCFH – (2,7-dichlorodihydrofluorescein), 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин DCFH-DA – (2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate), 2,7-дихлордигидрофлуоресцеин ацетат
- DCFH-DA - дихлорофлуоресцеин диацетат
- DMEM - модифицированная Дульбекко среда Игла
- DHR – (dihydrorhodamine 123), дигидрородамин 123
- dNTP (deoxyribonucleoyide triphosphate) – дезоксирибонуклеотидтрифосфа
- DREADDs - Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs, семейство синтетических рецепторов
- Duox - двойная оксидаза
- EGF - эпидермальный фактор роста
- ER (ЭПР) -эндоплазматический ретикулум
- ERK - киназа, регулируемая экстраклеточными сигналами
- FAD - флавинадениндинуклеотид
- FBS - бычья эмбриональная сыворотка
- FLIM – (fluorescence lifetime imaging microscopy), микроскопия с режимом регистрации времени жизни флуоресценции
- FRET – (Forster (fluorescent) resonance energy transfer), Ферстеровский (флуоресцентный) резонансный перенос энергии
- Fos - транскрипционный фактор
- GFP - зелёный флуоресцентный белок
- GLT - переносчик глутамата
- GPX - глутатионпероксидаза
- GR - глутатионредуктаза
- Grx - глутаредоксин
- GSH/GSSG - глутатион восстановленная/окисленная формы

HBSS - раствор солей Хэнкса

HEK293 – (human embryonic kidney 293), линия человеческих эмбриональных клетки почк

HeLa - линия клеток раковой опухоли шейки матки пациентки по имени Henrietta Lacks

HEPES (Хепес) - 2-[4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин]-этансульфоновая кислота

IP3 – (inositol 1,4,5-trisphosphate), инозитол-1,4,5-трифосфат

MAO - моноаминоксидаза

MAPK - митоген-активируемая протеинкиназа

MES - 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота

NAD/NADH - никотинамидадениндинуклеотид окисленная/восстановленная формы

NADP/NADPH - никотинамидадениндинуклеотидфосфат окисленная/восстановленная формы

NGF - фактор роста нервов

NMDA - N-метиласпартат

NOS - NO-синтаза

NOX - NADPH оксидаза

OptiMEM – Reduced serum medium, обедненная клеточная среда, используемая для трансфекции клеток.

ORP1 - глутатионпероксидаза дрожжей

ОхуR - бактериальный транскрипционный фактор, сенсор пероксида водорода

PDGF - тромбоцитарный фактор роста

pKa - обратный десятичный логарифм константы диссоциации кислоты

PKA - протеинкиназа А

PKC - протеинкиназа С

PLC - фосфолипаза С

PTP - тирозинфосфатаза

PI3K - фосфоинозитид 3-киназа

roGFP - редокс-активный GFP

SERCA - Ca²⁺-АТРаза сарко/эндоплазматического ретикулума

Rac – (Ras-related C3 botulinum toxin substrate), семейство малых ГТФазRyR - рианодиновые рецепторы

SNARF-1 - карбокси-семинафтородафлюор-1, химический флуоресцентный рН-индикатор

SOD - супероксид дисмутаза

Src - нерцепторная тирозинкиназа

TRPs – Transient Potential Receptor, семейство рецепторов.

Tx - тиоредоксин

Tris - трис(гидроксиметил)аминометан

XO- ксантиноксидаза

АДФ – аденозиндифосфат

АФК – активные формы кислорода

АМФ – аденозинмонофосфат

АТФ – аденозинтрифосфат ГТФ – гуанозинтрифосфа

НАД+ – никотинамидадениндинуклеотид (окисленная форма)

НАДН – никотинамидадениндинуклеотид (восстановленная форма)

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (общий пул)

НАДФ+ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (окисленная форма)

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат (восстановленная форма)

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] J.D. Scott, T. Pawson, Cell signaling in space and time: where proteins come together and when they're apart, *Science*, 326 (2009) 1220-1224.
- [2] C.C. Winterbourn, Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, *Nat Chem Biol*, 4 (2008) 278-286.
- [3] M.K. Raarup, A.W. Fjorback, S.M. Jensen, H.K. Muller, M.M. Kjaergaard, H. Poulsen, O. Wiborg, J.R. Nyengaard, Enhanced yellow fluorescent protein photoconversion to a cyan fluorescent protein-like species is sensitive to thermal and diffusion conditions, *J Biomed Opt*, 14 (2009) 034039.
- [4] S.G. Rhee, Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling, *Science*, 312 (2006) 1882-1883.
- [5] W. Droge, Free radicals in the physiological control of cell function, *Physiol Rev*, 82 (2002) 47-95.
- [6] S.O. Kim, K. Merchant, R. Nudelman, W.F. Beyer, Jr., T. Keng, J. DeAngelo, A. Hausladen, J.S. Stamler, OxyR: a molecular code for redox-related signaling, *Cell*, 109 (2002) 383-396.
- [7] H. Sumimoto, Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species, *FEBS J*, 275 (2008) 3249-3277.
- [8] M. Faurischou, N. Borregaard, Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation, *Microbes Infect*, 5 (2003) 1317-1327.
- [9] A.J. Sbarra, M.L. Karnovsky, The biochemical basis of phagocytosis. I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes, *J Biol Chem*, 234 (1959) 1355-1362.
- [10] I. Fridovich, The biology of oxygen radicals, *Science*, 201 (1978) 875-880.
- [11] K. Bedard, B. Lardy, K.H. Krause, NOX family NADPH oxidases: not just in mammals, *Biochimie*, 89 (2007) 1107-1112.
- [12] D.I. Brown, K.K. Griendling, Nox proteins in signal transduction, *Free Radic Biol Med*, 47 (2009) 1239-1253.
- [13] S.G. Rhee, Y.S. Bae, S.R. Lee, J. Kwon, Hydrogen peroxide: a key messenger that modulates protein phosphorylation through cysteine oxidation, *Sci STKE*, 2000 (2000) pe1.
- [14] M. Sundaresan, Z.X. Yu, V.J. Ferrans, K. Irani, T. Finkel, Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction, *Science*, 270 (1995) 296-299.
- [15] L. Pase, J.E. Layton, C. Wittmann, F. Ellett, C.J. Nowell, C.C. Reyes-Aldasoro, S. Varma, K.L. Rogers, C.J. Hall, M.C. Keightley, P.S. Crosier, C. Grabher, J.K. Heath, S.A. Renshaw, G.J. Lieschke, Neutrophil-Delivered Myeloperoxidase Dampens the Hydrogen Peroxide Burst after Tissue Wounding in Zebrafish, *Curr Biol*.

- [16] P. Niethammer, C. Grabher, A.T. Look, T.J. Mitchison, A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish, *Nature*, 459 (2009) 996-999.
- [17] S.K. Yoo, T.W. Starnes, Q. Deng, A. Huttenlocher, Lyn is a redox sensor that mediates leukocyte wound attraction in vivo, *Nature*, 480 109-112.
- [18] E. Cadenas, K.J. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, *Free radical biology & medicine*, 29 (2000) 222-230.
- [19] F.M. Yakes, B. Van Houten, Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997) 514-519.
- [20] M.V. Accardi, B.A. Daniels, P.M. Brown, J.M. Fritschy, S.K. Tyagarajan, D. Bowie, Mitochondrial reactive oxygen species regulate the strength of inhibitory GABA-mediated synaptic transmission, *Nature communications*, 5 (2014) 3168.
- [21] C.C. Wang, A. Borchert, A. Ugun-Klusek, L.Y. Tang, W.T. Lui, C.Y. Chu, E. Billett, H. Kuhn, C. Ufer, Monoamine oxidase a expression is vital for embryonic brain development by modulating developmental apoptosis, *The Journal of biological chemistry*, 286 (2011) 28322-28330.
- [22] A. Nicotra, F. Pierucci, H. Parvez, O. Senatori, Monoamine oxidase expression during development and aging, *Neurotoxicology*, 25 (2004) 155-165.
- [23] J.R. Stone, T. Collins, The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses, *Endothelium*, 9 (2002) 231-238.
- [24] P.R. Gardner, I. Fridovich, Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase, *J Biol Chem*, 266 (1991) 19328-19333.
- [25] P.R. Gardner, G. Costantino, C. Szabo, A.L. Salzman, Nitric oxide sensitivity of the aconitases, *J Biol Chem*, 272 (1997) 25071-25076.
- [26] A. Daiber, M. August, S. Baldus, M. Wendt, M. Oelze, K. Sydow, A.L. Kleschyov, T. Munzel, Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012, *Free Radic Biol Med*, 36 (2004) 101-111.
- [27] K.J. Reszka, B.A. Wagner, C.P. Burns, B.E. Britigan, Effects of peroxidase substrates on the Amplex red/peroxidase assay: antioxidant properties of anthracyclines, *Anal Biochem*, 342 (2005) 327-337.
- [28] E.W. Miller, O. Tulyathan, E.Y. Isacoff, C.J. Chang, Molecular imaging of hydrogen peroxide produced for cell signaling, *Nat Chem Biol*, 3 (2007) 263-267.
- [29] D. Srikun, A.E. Albers, C.I. Nam, A.T. Iavarone, C.J. Chang, Organelle-targetable fluorescent probes for imaging hydrogen peroxide in living cells via SNAP-Tag protein labeling, *J Am Chem Soc*, 132 (2010) 4455-4465.
- [30] B.C. Dickinson, D. Srikun, C.J. Chang, Mitochondrial-targeted fluorescent probes for reactive oxygen species, *Curr Opin Chem Biol*, 14 (2010) 50-56.

- [31] V.V. Belousov, A.F. Fradkov, K.A. Lukyanov, D.B. Staroverov, K.S. Shakhbazov, A.V. Terskikh, S. Lukyanov, Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide, *Nature methods*, 3 (2006) 281-286.
- [32] K.N. Markvicheva, E.A. Bogdanova, D.B. Staroverov, S. Lukyanov, V.V. Belousov, Imaging of intracellular hydrogen peroxide production with HyPer upon stimulation of HeLa cells with epidermal growth factor, *Methods Mol Biol*, 476 (2009) 76-83.
- [33] A.J. Meyer, T.P. Dick, Fluorescent protein-based redox probes, *Antioxid Redox Signal*, 13 (2010) 621-650.
- [34] S.R. Lee, K.S. Yang, J. Kwon, C. Lee, W. Jeong, S.G. Rhee, Reversible inactivation of the tumor suppressor PTEN by H₂O₂, *J Biol Chem*, 277 (2002) 20336-20342.
- [35] O. Shimomura, F.H. Johnson, Y. Saiga, Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *J Cell Comp Physiol*, 59 (1962) 223-239.
- [36] F.G. Prendergast, K.G. Mann, Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*, *Biochemistry*, 17 (1978) 3448-3453.
- [37] G. Jung, J. Wiehler, W. Göhde, J. Tittel, T. Basché, B. Steipe, C. Bräuchle, Confocal microscopy of single molecules of the green fluorescent protein, *Bioimaging*, 6 (1998) 54-61.
- [38] M. Ormo, A.B. Cubitt, K. Kallio, L.A. Gross, R.Y. Tsien, S.J. Remington, Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science*, 273 (1996) 1392-1395.
- [39] T. Ohashi, S.D. Galiacy, G. Briscoe, H.P. Erickson, An experimental study of GFP-based FRET, with application to intrinsically unstructured proteins, *Protein Sci*, 16 (2007) 1429-1438.
- [40] V.V. Verkhusha, K.A. Lukyanov, The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins, *Nat Biotechnol*, 22 (2004) 289-296.
- [41] D.M. Chudakov, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov, Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging, *Trends Biotechnol*, 23 (2005) 605-613.
- [42] D.D. Deheyn, K. Kubokawa, J.K. McCarthy, A. Murakami, M. Porrachia, G.W. Rouse, N.D. Holland, Endogenous green fluorescent protein (GFP) in amphioxus, *Biol Bull*, 213 (2007) 95-100.
- [43] A.G. Evdokimov, M.E. Pokross, N.S. Egorov, A.G. Zaraisky, I.V. Yampolsky, E.M. Merzlyak, A.N. Shkoporov, I. Sander, K.A. Lukyanov, D.M. Chudakov, Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein, *EMBO Rep*, 7 (2006) 1006-1012.
- [44] A.B. Cubitt, L.A. Woollenweber, R. Heim, Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Methods Cell Biol*, 58 (1999) 19-30.
- [45] R. Heim, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien, Improved green fluorescence, *Nature*, 373 (1995) 663-664.
- [46] R. Heim, D.C. Prasher, R.Y. Tsien, Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (1994) 12501-12504.

- [47] R. Heim, R.Y. Tsien, Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, *Curr Biol*, 6 (1996) 178-182.
- [48] A.M. Loening, T.D. Fenn, S.S. Gambhir, Crystal structures of the luciferase and green fluorescent protein from *Renilla reniformis*, *J Mol Biol*, 374 (2007) 1017-1028.
- [49] B. Peelle, T.L. Gururaja, D.G. Payan, D.C. Anderson, Characterization and use of green fluorescent proteins from *Renilla mulleri* and *Ptilosarcus guernyi* for the human cell display of functional peptides, *J Protein Chem*, 20 (2001) 507-519.
- [50] W.W. Ward, Biochemical and physical properties of green fluorescent protein, *Methods Biochem Anal*, 47 (2006) 39-65.
- [51] D.M. Chudakov, M.V. Matz, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov, Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues, *Physiol Rev*, 90 1103-1163.
- [52] M.A. Wall, M. Socolich, R. Ranganathan, The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed, *Nat Struct Biol*, 7 (2000) 1133-1138.
- [53] D. Yarbrough, R.M. Wachter, K. Kallio, M.V. Matz, S.J. Remington, Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001) 462-467.
- [54] K. Nienhaus, B. Vallone, F. Renzi, J. Wiedenmann, G.U. Nienhaus, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the red fluorescent protein eqFP611, *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 59 (2003) 1253-1255.
- [55] N.V. Pletneva, S.V. Pletnev, D.M. Chudakov, T.V. Tikhonova, V.O. Popov, V.I. Martynov, A. Wlodawer, Z. Dauter, V.Z. Pletnev, [Three-dimensional structure of yellow fluorescent protein zYFP538 from *Zoanthus* sp. at the resolution 1.8 Å], *Bioorg Khim*, 33 (2007) 421-430.
- [56] M.L. Quillin, D.M. Anstrom, X. Shu, S. O'Leary, K. Kallio, D.M. Chudakov, S.J. Remington, Kindling fluorescent protein from *Anemonia sulcata*: dark-state structure at 1.38 Å resolution, *Biochemistry*, 44 (2005) 5774-5787.
- [57] L. Baratto, P.G. Morasso, C. Re, G. Spada, A new look at posturographic analysis in the clinical context: sway-density versus other parameterization techniques, *Motor Control*, 6 (2002) 246-270.
- [58] P.G. Morasso, C. Re, M. Casadio, Spot check and recalibration of stabilometric platforms, *Technol Health Care*, 12 (2004) 293-304.
- [59] Shemiakina, II, G.V. Ermakova, P.J. Cranfill, M.A. Baird, R.A. Evans, E.A. Souslova, D.B. Staroverov, A.Y. Gorokhovatsky, E.V. Putintseva, T.V. Gorodnicheva, T.V. Chepurnykh, L. Strukova, S. Lukyanov, A.G. Zaraisky, M.W. Davidson, D.M. Chudakov, D. Shcherbo, A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity, *Nature communications*, 3 (2012) 1204.
- [60] D.S. Bindels, L. Haarbosch, L. van Weeren, M. Postma, K.E. Wiese, M. Mastop, S. Aumonier, G. Gotthard, A. Royant, M.A. Hink, T.W. Gadella, Jr., mScarlet: a bright monomeric red fluorescent protein for cellular imaging, *Nature methods*, 14 (2017) 53-56.

- [61] B.T. Bajar, E.S. Wang, A.J. Lam, B.B. Kim, C.L. Jacobs, E.S. Howe, M.W. Davidson, M.Z. Lin, J. Chu, Improving brightness and photostability of green and red fluorescent proteins for live cell imaging and FRET reporting, *Sci Rep*, 6 (2016) 20889.
- [62] N.C. Shaner, G.G. Lambert, A. Chammas, Y. Ni, P.J. Cranfill, M.A. Baird, B.R. Sell, J.R. Allen, R.N. Day, M. Israelsson, M.W. Davidson, J. Wang, A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*, *Nature methods*, 10 (2013) 407-409.
- [63] R.Y. Tsien, The green fluorescent protein, *Annu Rev Biochem*, 67 (1998) 509-544.
- [64] S.H. Bokman, W.W. Ward, Renaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein, *Biochem Biophys Res Commun*, 101 (1981) 1372-1380.
- [65] V. Voliani, R. Bizzarri, R. Nifosi, S. Abbruzzetti, E. Grandi, C. Viappiani, F. Beltram, Cis-trans photoisomerization of fluorescent-protein chromophores, *J Phys Chem B*, 112 (2008) 10714-10722.
- [66] U. Lauf, P. Lopez, M.M. Falk, Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins, *FEBS Lett*, 498 (2001) 11-15.
- [67] K. Brejc, T.K. Sixma, P.A. Kitts, S.R. Kain, R.Y. Tsien, M. Ormo, S.J. Remington, Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997) 2306-2311.
- [68] O. Zapata-Hommer, O. Griesbeck, Efficiently folding and circularly permuted variants of the Sapphire mutant of GFP, *BMC Biotechnol*, 3 (2003) 5.
- [69] A.M. Bogdanov, E.A. Bogdanova, D.M. Chudakov, T.V. Gorodnicheva, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov, Cell culture medium affects GFP photostability: a solution, *Nature methods*, 6 (2009) 859-860.
- [70] A.M. Bogdanov, A.S. Mishin, I.V. Yampolsky, V.V. Belousov, D.M. Chudakov, F.V. Subach, V.V. Verkhusha, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov, Green fluorescent proteins are light-induced electron donors, *Nature chemical biology*, 5 (2009) 459-461.
- [71] G.J. Kremers, J. Goedhart, E.B. van Munster, T.W. Gadella, Jr., Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Forster radius, *Biochemistry*, 45 (2006) 6570-6580.
- [72] F.V. Subach, V.N. Malashkevich, W.D. Zencheck, H. Xiao, G.S. Filonov, S.C. Almo, V.V. Verkhusha, Photoactivation mechanism of PAmCherry based on crystal structures of the protein in the dark and fluorescent states, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (2009) 21097-21102.
- [73] O.M. Subach, V.N. Malashkevich, W.D. Zencheck, K.S. Morozova, K.D. Piatkevich, S.C. Almo, V.V. Verkhusha, Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mTagBFP and TagRFP fluorescent proteins, *Chem Biol*, 17 (2010) 333-341.
- [74] O.M. Subach, P.J. Cranfill, M.W. Davidson, V.V. Verkhusha, An enhanced monomeric blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore, *PLoS one*, 6 (2011) e28674.

- [75] F.V. Subach, O.M. Subach, I.S. Gundorov, K.S. Morozova, K.D. Piatkevich, A.M. Cuervo, V.V. Verkhusha, Monomeric fluorescent timers that change color from blue to red report on cellular trafficking, *Nat Chem Biol*, 5 (2009) 118-126.
- [76] F. Aslund, M. Zheng, J. Beckwith, G. Storz, Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol-disulfide status, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (1999) 6161-6165.
- [77] G. Storz, L.A. Tartaglia, OxyR: a regulator of antioxidant genes, *The Journal of nutrition*, 122 (1992) 627-630.
- [78] Y. Zhao, S. Araki, J. Wu, T. Teramoto, Y.F. Chang, M. Nakano, A.S. Abdelfattah, M. Fujiwara, T. Ishihara, T. Nagai, R.E. Campbell, An expanded palette of genetically encoded Ca²⁺ indicators, *Science*, 333 1888-1891.
- [79] T. Nagai, A. Sawano, E.S. Park, A. Miyawaki, Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca²⁺, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001) 3197-3202.
- [80] J. Nakai, M. Ohkura, K. Imoto, A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein, *Nat Biotechnol*, 19 (2001) 137-141.
- [81] M. Ohkura, M. Matsuzaki, H. Kasai, K. Imoto, J. Nakai, Genetically encoded bright Ca²⁺ probe applicable for dynamic Ca²⁺ imaging of dendritic spines, *Anal Chem*, 77 (2005) 5861-5869.
- [82] Y.N. Tallini, M. Ohkura, B.R. Choi, G. Ji, K. Imoto, R. Doran, J. Lee, P. Plan, J. Wilson, H.B. Xin, A. Sanbe, J. Gulick, J. Mathai, J. Robbins, G. Salama, J. Nakai, M.I. Kotlikoff, Imaging cellular signals in the heart in vivo: Cardiac expression of the high-signal Ca²⁺ indicator GCaMP2, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (2006) 4753-4758.
- [83] J. Akerboom, J.D. Rivera, M.M. Guilbe, E.C. Malave, H.H. Hernandez, L. Tian, S.A. Hires, J.S. Marvin, L.L. Looger, E.R. Schreiter, Crystal structures of the GCaMP calcium sensor reveal the mechanism of fluorescence signal change and aid rational design, *J Biol Chem*, 284 (2009) 6455-6464.
- [84] J. Akerboom, T.W. Chen, T.J. Wardill, L. Tian, J.S. Marvin, S. Mutlu, N.C. Calderon, F. Esposti, B.G. Borghuis, X.R. Sun, A. Gordus, M.B. Orger, R. Portugues, F. Engert, J.J. Macklin, A. Filosa, A. Aggarwal, R.A. Kerr, R. Takagi, S. Kracun, E. Shigetomi, B.S. Khakh, H. Baier, L. Lagnado, S.S. Wang, C.I. Bargmann, B.E. Kimmel, V. Jayaraman, K. Svoboda, D.S. Kim, E.R. Schreiter, L.L. Looger, Optimization of a GCaMP calcium indicator for neural activity imaging, *J Neurosci*, 32 (2013) 13819-13840.
- [85] L. Tian, S.A. Hires, T. Mao, D. Huber, M.E. Chiappe, S.H. Chalasani, L. Petreanu, J. Akerboom, S.A. McKinney, E.R. Schreiter, C.I. Bargmann, V. Jayaraman, K. Svoboda, L.L. Looger, Imaging neural activity in worms, flies and mice with improved GCaMP calcium indicators, *Nature methods*, 6 (2009) 875-881.
- [86] T.W. Chen, T.J. Wardill, Y. Sun, S.R. Pulver, S.L. Renninger, A. Baohan, E.R. Schreiter, R.A. Kerr, M.B. Orger, V. Jayaraman, L.L. Looger, K. Svoboda, D.S. Kim, Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity, *Nature*, 499 (2013) 295-300.

- [87] M.J. Berridge, Calcium microdomains: organization and function, *Cell calcium*, 40 (2006) 405-412.
- [88] H. Cheng, W.J. Lederer, Calcium sparks, *Physiol Rev*, 88 (2008) 1491-1545.
- [89] E. Dreosti, B. Odermatt, M.M. Dorostkar, L. Lagnado, A genetically encoded reporter of synaptic activity in vivo, *Nature methods*, 6 (2009) 883-889.
- [90] L.H. Tay, I.E. Dick, W. Yang, M. Mank, O. Griesbeck, D.T. Yue, Nanodomain Ca(2)(+) of Ca(2)(+) channels detected by a tethered genetically encoded Ca(2)(+) sensor, *Nat Commun*, 3 (2012) 778.
- [91] Y. Zhao, S. Araki, J. Wu, T. Teramoto, Y.F. Chang, M. Nakano, A.S. Abdelfattah, M. Fujiwara, T. Ishihara, T. Nagai, R.E. Campbell, An expanded palette of genetically encoded Ca(2)(+) indicators, *Science*, 333 (2011) 1888-1891.
- [92] I. Kullik, J. Stevens, M.B. Toledano, G. Storz, Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization, *J Bacteriol*, 177 (1995) 1285-1291.
- [93] B. Gonzalez-Flecha, B. Demple, Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 179 (1997) 382-388.
- [94] H. Choi, S. Kim, P. Mukhopadhyay, S. Cho, J. Woo, G. Storz, S.E. Ryu, Structural basis of the redox switch in the OxyR transcription factor, *Cell*, 105 (2001) 103-113.
- [95] C. Lee, S.M. Lee, P. Mukhopadhyay, S.J. Kim, S.C. Lee, W.S. Ahn, M.H. Yu, G. Storz, S.E. Ryu, Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path, *Nature structural & molecular biology*, 11 (2004) 1179-1185.
- [96] S. Topell, R. Glockshuber, Circular permutation of the green fluorescent protein, *Methods Mol Biol*, 183 (2002) 31-48.
- [97] V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. Collin, A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, 74 (2007) 324-329.
- [98] Hepatitis A vaccination, *Nurs Times*, 101 (2005) 27.
- [99] J. Zhang, R.E. Campbell, A.Y. Ting, R.Y. Tsien, Creating new fluorescent probes for cell biology, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 (2002) 906-918.
- [100] M. Drobizhev, S. Tillo, N.S. Makarov, T.E. Hughes, A. Rebane, Absolute two-photon absorption spectra and two-photon brightness of orange and red fluorescent proteins, *J Phys Chem B*, 113 (2009) 855-859.
- [101] R.S. Scotland, S. Chauhan, C. Davis, C. De Felipe, S. Hunt, J. Kabir, P. Kotsonis, U. Oh, A. Ahluwalia, Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction, *Circulation research*, 95 (2004) 1027-1034.
- [102] M.J. Caterina, T.A. Rosen, M. Tominaga, A.J. Brake, D. Julius, A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat, *Nature*, 398 (1999) 436-441.

- [103] D.P. Corey, J. Garcia-Anoveros, J.R. Holt, K.Y. Kwan, S.Y. Lin, M.A. Vollrath, A. Amalfitano, E.L. Cheung, B.H. Derfler, A. Duggan, G.S. Geleoc, P.A. Gray, M.P. Hoffman, H.L. Rehm, D. Tamasauskas, D.S. Zhang, TRPA1 is a candidate for the mechanosensitive transduction channel of vertebrate hair cells, *Nature*, 432 (2004) 723-730.
- [104] E.O. Gracheva, N.T. Ingolia, Y.M. Kelly, J.F. Cordero-Morales, G. Hollopeter, A.T. Chesler, E.E. Sanchez, J.C. Perez, J.S. Weissman, D. Julius, Molecular basis of infrared detection by snakes, *Nature*, 464 (2010) 1006-1011.
- [105] M. Tominaga, M.J. Caterina, Thermosensation and pain, *Journal of neurobiology*, 61 (2004) 3-12.
- [106] S. Chen, C.N. Chiu, K.L. McArthur, J.R. Fetcho, D.A. Prober, TRP channel mediated neuronal activation and ablation in freely behaving zebrafish, *Nature methods*, 13 (2016) 147-150.
- [107] N. Takahashi, Y. Mori, TRP Channels as Sensors and Signal Integrators of Redox Status Changes, *Frontiers in pharmacology*, 2 (2011) 58.
- [108] D. Vasmer, A. Pooryasin, T. Riemensperger, A. Fiala, Induction of aversive learning through thermogenetic activation of Kenyon cell ensembles in *Drosophila*, *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8 (2014) 174.
- [109] X. Long, J. Ye, D. Zhao, S.J. Zhang, Magnetogenetics: remote non-invasive magnetic activation of neuronal activity with a magnetoreceptor, *Sci Bull (Beijing)*, 60 (2015) 2107-2119.
- [110] M. Meister, Physical limits to magnetogenetics, *eLife*, 5 (2016).
- [111] R. Chen, G. Romero, M.G. Christiansen, A. Mohr, P. Anikeeva, Wireless magnetothermal deep brain stimulation, *Science*, 347 (2015) 1477-1480.
- [112] P. Gau, J. Poon, C. Ufret-Vincenty, C.D. Snelson, S.E. Gordon, D.W. Raible, A. Dhaka, The zebrafish ortholog of TRPV1 is required for heat-induced locomotion, *J Neurosci*, 33 (2013) 5249-5260.
- [113] E.O. Gracheva, J.F. Cordero-Morales, J.A. Gonzalez-Carcacia, N.T. Ingolia, C. Manno, C.I. Aranguren, J.S. Weissman, D. Julius, Ganglion-specific splicing of TRPV1 underlies infrared sensation in vampire bats, *Nature*, 476 (2011) 88-91.
- [114] A.D. Guler, A. Rainwater, J.G. Parker, G.L. Jones, E. Argilli, B.R. Arenkiel, M.D. Ehlers, A. Bonci, L.S. Zweifel, R.D. Palmiter, Transient activation of specific neurons in mice by selective expression of the capsaicin receptor, *Nat Commun*, 3 (2012) 746.
- [115] S.M. Sternson, B.L. Roth, Chemogenetic tools to interrogate brain functions, *Annual review of neuroscience*, 37 (2014) 387-407.
- [116] T. Tsukamoto, W.H. Haile, J.J. McGuire, J.K. Coward, Mechanism-based inhibition of human folsylpolyglutamate synthetase: design, synthesis, and biochemical characterization of a phosphapeptide mimic of the tetrahedral intermediate, *Archives of biochemistry and biophysics*, 355 (1998) 109-118.

- [117] C.H. Redfern, P. Coward, M.Y. Degtyarev, E.K. Lee, A.T. Kwa, L. Hennighausen, H. Bujard, G.I. Fishman, B.R. Conklin, Conditional expression and signaling of a specifically designed Gi-coupled receptor in transgenic mice, *Nature biotechnology*, 17 (1999) 165-169.
- [118] B. Kettenmann, C. Mueller, C. Wille, G. Kobal, Odor and taste interaction on brain responses in humans, *Chemical senses*, 30 Suppl 1 (2005) i234-235.
- [119] A. Mueller, N.D. Abolmaali, A.R. Hakimi, T. Gloeckler, B. Herting, H. Reichmann, T. Hummel, Olfactory bulb volumes in patients with idiopathic Parkinson's disease a pilot study, *J Neural Transm (Vienna)*, 112 (2005) 1363-1370.
- [120] B.N. Armbruster, X. Li, M.H. Pausch, S. Herlitze, B.L. Roth, Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104 (2007) 5163-5168.
- [121] D. Atasoy, J.N. Betley, H.H. Su, S.M. Sternson, Deconstruction of a neural circuit for hunger, *Nature*, 488 (2012) 172-177.
- [122] A.R. Garner, D.C. Rowland, S.Y. Hwang, K. Baumgaertel, B.L. Roth, C. Kentros, M. Mayford, Generation of a synthetic memory trace, *Science*, 335 (2012) 1513-1516.
- [123] S. Loffler, J. Korber, U. Nubbemeyer, K. Fehsel, Comment on "Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition", *Science*, 337 (2012) 646; author reply 646.
- [124] R.S. Ray, A.E. Corcoran, R.D. Brust, J.C. Kim, G.B. Richerson, E. Nattie, S.M. Dymecki, Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition, *Science*, 333 (2011) 637-642.
- [125] A.J. Murray, P. Wulff, Remote Control of Neural Activity Using Chemical Genetics #, in: *T Neural Tracing Methods*, vol. 92, pp. 161-175.
- [126] W. Deng, M. Mayford, F.H. Gage, Selection of distinct populations of dentate granule cells in response to inputs as a mechanism for pattern separation in mice, *Elife*, 2 (2013) e00312.
- [127] A.M. Aravanis, L.P. Wang, F. Zhang, L.A. Meltzer, M.Z. Mogri, M.B. Schneider, K. Deisseroth, An optical neural interface: in vivo control of rodent motor cortex with integrated fiberoptic and optogenetic technology, *J Neural Eng*, 4 (2007) S143-156.
- [128] M.E. Bulina, D.M. Chudakov, O.V. Britanova, Y.G. Yanushevich, D.B. Staroverov, T.V. Chepurnykh, E.M. Merzlyak, M.A. Shkrob, S. Lukyanov, K.A. Lukyanov, A genetically encoded photosensitizer, *Nature biotechnology*, 24 (2006) 95-99.
- [129] K.S. Sarkisyan, O.A. Zlobovskaya, D.A. Gorbachev, N.G. Bozhanova, G.V. Sharonov, D.B. Staroverov, E.S. Egorov, A.V. Ryabova, K.M. Solntsev, A.S. Mishin, K.A. Lukyanov, KillerOrange, a Genetically Encoded Photosensitizer Activated by Blue and Green Light, *PLoS one*, 10 (2015) e0145287.
- [130] M. Fransen, M. Nordgren, B. Wang, O. Apanasets, Role of peroxisomes in ROS/RNS-metabolism: implications for human disease, *Biochimica et biophysica acta*, 1822 (2012) 1363-1373.

- [131] M.E. Bulina, K.A. Lukyanov, O.V. Britanova, D. Onichtchouk, S. Lukyanov, D.M. Chudakov, Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed, *Nature protocols*, 1 (2006) 947-953.
- [132] X. Shu, V. Lev-Ram, T.J. Deerinck, Y. Qi, E.B. Ramko, M.W. Davidson, Y. Jin, M.H. Ellisman, R.Y. Tsien, A genetically encoded tag for correlated light and electron microscopy of intact cells, tissues, and organisms, *PLoS biology*, 9 (2011) e1001041.
- [133] M. Banghart, K. Borges, E. Isacoff, D. Trauner, R.H. Kramer, Light-activated ion channels for remote control of neuronal firing, *Nat Neurosci*, 7 (2004) 1381-1386.
- [134] M. Volgraf, P. Gorostiza, R. Numano, R.H. Kramer, E.Y. Isacoff, D. Trauner, Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch, *Nature chemical biology*, 2 (2006) 47-52.
- [135] E. Grell, E. Lewitzki, H. Ruf, E. Bamberg, G.C. Ellis-Davies, J.H. Kaplan, P. de Weer, Caged-Ca²⁺: a new agent allowing liberation of free Ca²⁺ in biological systems by photolysis, *Cellular and molecular biology*, 35 (1989) 515-522.
- [136] G.C. Ellis-Davies, J.H. Kaplan, Nitrophenyl-EGTA, a photolabile chelator that selectively binds Ca²⁺ with high affinity and releases it rapidly upon photolysis, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91 (1994) 187-191.
- [137] N. Fukuda, T. Matsuda, T. Nagai, Optical control of the Ca²⁺ concentration in a live specimen with a genetically encoded Ca²⁺-releasing molecular tool, *ACS Chem Biol*, 9 (2014) 1197-1203.
- [138] E. Pham, E. Mills, K. Truong, A synthetic photoactivated protein to generate local or global Ca(2+) signals, *Chem Biol*, 18 (2011) 880-890.
- [139] L. He, Y. Zhang, G. Ma, P. Tan, Z. Li, S. Zang, X. Wu, J. Jing, S. Fang, L. Zhou, Y. Wang, Y. Huang, P.G. Hogan, G. Han, Y. Zhou, Near-infrared photoactivatable control of Ca(2+) signaling and optogenetic immunomodulation, *Elife*, 4 (2015).
- [140] M. Prakriya, R.S. Lewis, Store-Operated Calcium Channels, *Physiological reviews*, 95 (2015) 1383-1436.
- [141] T. Kyung, S. Lee, J.E. Kim, T. Cho, H. Park, Y.M. Jeong, D. Kim, A. Shin, S. Kim, J. Baek, J. Kim, N.Y. Kim, D. Woo, S. Chae, C.H. Kim, H.S. Shin, Y.M. Han, W.D. Heo, Optogenetic control of endogenous Ca(2+) channels in vivo, *Nat Biotechnol*, 33 (2015) 1092-1096.
- [142] N. Grossman, K. Nikolic, M.S. Grubb, J. Burrone, C. Toumazou, P. Degenaar, High-frequency limit of neural stimulation with ChR2, *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*, 2011 (2011) 4167-4170.
- [143] H.E. Kato, F. Zhang, O. Yizhar, C. Ramakrishnan, T. Nishizawa, K. Hirata, J. Ito, Y. Aita, T. Tsukazaki, S. Hayashi, P. Hegemann, A.D. Maturana, R. Ishitani, K. Deisseroth, O. Nureki, Crystal structure of the channelrhodopsin light-gated cation channel, *Nature*, 482 (2012) 369-374.

- [144] K. Feldbauer, D. Zimmermann, V. Pintschovius, J. Spitz, C. Bamann, E. Bamberg, Channelrhodopsin-2 is a leaky proton pump, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (2009) 12317-12322.
- [145] K. Deisseroth, Optogenetics: 10 years of microbial opsins in neuroscience, *Nature neuroscience*, 18 (2015) 1213-1225.
- [146] A. Berndt, P. Schoenenberger, J. Mattis, K.M. Tye, K. Deisseroth, P. Hegemann, T.G. Oertner, High-efficiency channelrhodopsins for fast neuronal stimulation at low light levels, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011) 7595-7600.
- [147] J.Y. Lin, A user's guide to channelrhodopsin variants: features, limitations and future developments, *Experimental physiology*, 96 (2011) 19-25.
- [148] S. Kleinlogel, K. Feldbauer, R.E. Dempski, H. Fotis, P.G. Wood, C. Bamann, E. Bamberg, Ultra light-sensitive and fast neuronal activation with the Ca²⁺-permeable channelrhodopsin CatCh, *Nature neuroscience*, 14 (2011) 513-518.
- [149] A. Dawydow, R. Gueta, D. Ljaschenko, S. Ullrich, M. Hermann, N. Ehmann, S. Gao, A. Fiala, T. Langenhan, G. Nagel, R.J. Kittel, Channelrhodopsin-2-XXL, a powerful optogenetic tool for low-light applications, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111 (2014) 13972-13977.
- [150] B. Schobert, J.K. Lanyi, Halorhodopsin is a light-driven chloride pump, *The Journal of biological chemistry*, 257 (1982) 10306-10313.
- [151] V. Gradinaru, K.R. Thompson, K. Deisseroth, eNpHR: a *Natronomonas halorhodopsin* enhanced for optogenetic applications, *Brain cell biology*, 36 (2008) 129-139.
- [152] J. Wietek, J.S. Wiegert, N. Adeishvili, F. Schneider, H. Watanabe, S.P. Tsunoda, A. Vogt, M. Elstner, T.G. Oertner, P. Hegemann, Conversion of channelrhodopsin into a light-gated chloride channel, *Science*, 344 (2014) 409-412.
- [153] A. Berndt, S.Y. Lee, J. Wietek, C. Ramakrishnan, E.E. Steinberg, A.J. Rashid, H. Kim, S. Park, A. Santoro, P.W. Frankland, S.M. Iyer, S. Pak, S. Ahrlund-Richter, S.L. Delp, R.C. Malenka, S.A. Josselyn, M. Carlen, P. Hegemann, K. Deisseroth, Structural foundations of optogenetics: Determinants of channelrhodopsin ion selectivity, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (2016) 822-829.
- [154] F. Zhang, M. Prigge, F. Beyriere, S.P. Tsunoda, J. Mattis, O. Yizhar, P. Hegemann, K. Deisseroth, Red-shifted optogenetic excitation: a tool for fast neural control derived from *Volvox carteri*, *Nature neuroscience*, 11 (2008) 631-633.
- [155] H.E. Kato, O. Nureki, Crystal structure of channelrhodopsin, a light-gated cation channel - all cations lead through the monomer, *Biophysics (Nagoya-shi)*, 9 (2013) 57-61.
- [156] A. Berndt, S.Y. Lee, C. Ramakrishnan, K. Deisseroth, Structure-guided transformation of channelrhodopsin into a light-activated chloride channel, *Science*, 344 (2014) 420-424.

- [157] J.Y. Lin, P.M. Knutsen, A. Muller, D. Kleinfeld, R.Y. Tsien, ReaChR: a red-shifted variant of channelrhodopsin enables deep transcranial optogenetic excitation, *Nature neuroscience*, 16 (2013) 1499-1508.
- [158] A.M. Packer, L.E. Russell, H.W. Dalglish, M. Hausser, Simultaneous all-optical manipulation and recording of neural circuit activity with cellular resolution in vivo, *Nature methods*, 12 (2015) 140-146.
- [159] D.E. Bath, J.R. Stowers, D. Hormann, A. Poehlmann, B.J. Dickson, A.D. Straw, FlyMAD: rapid thermogenetic control of neuronal activity in freely walking *Drosophila*, *Nature methods*, 11 (2014) 756-762.
- [160] I.V. Fedotov, N.A. Safronov, Y.G. Ermakova, M.E. Matlashov, D.A. Sidorov-Biryukov, A.B. Fedotov, V.V. Belousov, A.M. Zheltikov, Fiber-optic control and thermometry of single-cell thermosensation logic, *Scientific reports*, 5 (2015) 15737.
- [161] J.F. Cordero-Morales, E.O. Gracheva, D. Julius, Cytoplasmic ankyrin repeats of transient receptor potential A1 (TRPA1) dictate sensitivity to thermal and chemical stimuli, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (2011) E1184-1191.
- [162] M. Liao, E. Cao, D. Julius, Y. Cheng, Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy, *Nature*, 504 (2013) 107-112.
- [163] C.E. Paulsen, J.P. Armache, Y. Gao, Y. Cheng, D. Julius, Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms, *Nature*, 525 (2015) 552.
- [164] A.R. Adamantidis, F. Zhang, L. de Lecea, K. Deisseroth, Optogenetics: opsins and optical interfaces in neuroscience, *Cold Spring Harbor protocols*, 2014 (2014) 815-822.
- [165] M. Oda, M. Kurogi, Y. Kubo, O. Saitoh, Sensitivities of Two Zebrafish TRPA1 Paralogs to Chemical and Thermal Stimuli Analyzed in Heterologous Expression Systems, *Chemical senses*, 41 (2016) 261-272.
- [166] C.E. Paulsen, J.P. Armache, Y. Gao, Y. Cheng, D. Julius, Structure of the TRPA1 ion channel suggests regulatory mechanisms, *Nature*, 520 (2015) 511-517.
- [167] W.C. Wetsel, Sensing hot and cold with TRP channels, *Int J Hyperthermia*, 27 (2011) 388-398.
- [168] J. Yao, B. Liu, F. Qin, Rapid temperature jump by infrared diode laser irradiation for patch-clamp studies, *Biophysical journal*, 96 (2009) 3611-3619.
- [169] A.O. Chugunov, P.E. Volynsky, N.A. Krylov, D.E. Nolde, R.G. Efremov, Temperature-sensitive gating of TRPV1 channel as probed by atomistic simulations of its trans- and juxtamembrane domains, *Sci Rep*, 6 (2016) 33112.
- [170] F. Yang, J. Zheng, High temperature sensitivity is intrinsic to voltage-gated potassium channels, *Elife*, 3 (2014) e03255.
- [171] S. Ibsen, A. Tong, C. Schutt, S. Esener, S.H. Chalasani, Sonogenetics is a non-invasive approach to activating neurons in *Caenorhabditis elegans*, *Nature communications*, 6 (2015) 8264.

- [172] S.A. Stanley, J.E. Gagner, S. Damanpour, M. Yoshida, J.S. Dordick, J.M. Friedman, Radio-wave heating of iron oxide nanoparticles can regulate plasma glucose in mice, *Science*, 336 (2012) 604-608.
- [173] E.C. Theil, Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms, *Annu Rev Biochem*, 56 (1987) 289-315.
- [174] S. Kohatsu, M. Koganezawa, D. Yamamoto, Female contact activates male-specific interneurons that trigger stereotypic courtship behavior in *Drosophila*, *Neuron*, 69 (2011) 498-508.
- [175] S.R. Pulver, S.L. Pashkovski, N.J. Hornstein, P.A. Garrity, L.C. Griffith, Temporal dynamics of neuronal activation by Channelrhodopsin-2 and TRPA1 determine behavioral output in *Drosophila* larvae, *Journal of neurophysiology*, 101 (2009) 3075-3088.
- [176] V. Tseeb, M. Suzuki, K. Oyama, K. Iwai, S. Ishiwata, Highly thermosensitive Ca dynamics in a HeLa cell through IP(3) receptors, *HFSP journal*, 3 (2009) 117-123.
- [177] A.A. Voronin, A.M. Zheltikov, Ionization penalty in nonlinear optical bioimaging, *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*, 81 (2010) 051918.
- [178] Y.Y. Wang, R.B. Chang, H.N. Waters, D.D. McKemy, E.R. Liman, The nociceptor ion channel TRPA1 is potentiated and inactivated by permeating calcium ions, *The Journal of biological chemistry*, 283 (2008) 32691-32703.
- [179] O. Yizhar, L.E. Fenno, T.J. Davidson, M. Mogri, K. Deisseroth, Optogenetics in neural systems, *Neuron*, 71 (2011) 9-34.
- [180] C.P. Richter, X. Tan, Photons and neurons, *Hearing research*, 311 (2014) 72-88.
- [181] S.N. Ho, H.D. Hunt, R.M. Horton, J.K. Pullen, L.R. Pease, Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction, *Gene*, 77 (1989) 51-59.
- [182] B.J. Olson, Assays for Determination of Protein Concentration, *Current protocols in pharmacology*, 73 (2016) A 3A 1-A 3A 32.
- [183] M.L. Seibenhener, M.W. Wooten, Isolation and culture of hippocampal neurons from prenatal mice, *Journal of visualized experiments : JoVE*, (2012).
- [184] A.M. Palanca, A. Sagasti, Optogenetic activation of zebrafish somatosensory neurons using ChEF-tdTomato, *Journal of visualized experiments : JoVE*, (2013) e50184.
- [185] D. Shcherbo, E.M. Merzlyak, T.V. Chepurnykh, A.F. Fradkov, G.V. Ermakova, E.A. Solovieva, K.A. Lukyanov, E.A. Bogdanova, A.G. Zaraisky, S. Lukyanov, D.M. Chudakov, Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging, *Nature methods*, 4 (2007) 741-746.
- [186] N.C. Shaner, M.Z. Lin, M.R. McKeown, P.A. Steinbach, K.L. Hazelwood, M.W. Davidson, R.Y. Tsien, Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins, *Nature methods*, 5 (2008) 545-551.
- [187] D.S. Bilan, L. Pase, L. Joosen, A.Y. Gorokhovatsky, Y.G. Ermakova, T.W. Gadella, C. Grabher, C. Schultz, S. Lukyanov, V.V. Belousov, HyPer-3: a genetically encoded H(2)O(2) probe

with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging, *ACS chemical biology*, 8 (2013) 535-542.

[188] K.N. Markvicheva, D.S. Bilan, N.M. Mishina, A.Y. Gorokhovatsky, L.M. Vinokurov, S. Lukyanov, V.V. Belousov, A genetically encoded sensor for H₂O₂ with expanded dynamic range, *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19 (2011) 1079-1084.

[189] N.M. Mishina, P.A. Tyurin-Kuzmin, K.N. Markvicheva, A.V. Vorotnikov, V.A. Tkachuk, V. Laketa, C. Schultz, S. Lukyanov, V.V. Belousov, Does cellular hydrogen peroxide diffuse or act locally?, *Antioxidants & redox signaling*, 14 (2011) 1-7.

[190] S.C. Albrecht, A.G. Barata, J. Grosshans, A.A. Teleman, T.P. Dick, In vivo mapping of hydrogen peroxide and oxidized glutathione reveals chemical and regional specificity of redox homeostasis, *Cell metabolism*, 14 (2011) 819-829.

[191] A.P. West, G.S. Shadel, S. Ghosh, Mitochondria in innate immune responses, *Nat Rev Immunol*, 11 (2011) 389-402.

[192] A.A. Starkov, The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1147 (2008) 37-52.

[193] A. Gomes, E. Fernandes, J.L. Lima, Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species, *Journal of biochemical and biophysical methods*, 65 (2005) 45-80.

[194] B. Kalyanaraman, V. Darley-Usmar, K.J. Davies, P.A. Dennery, H.J. Forman, M.B. Grisham, G.E. Mann, K. Moore, L.J. Roberts, 2nd, H. Ischiropoulos, Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations, *Free radical biology & medicine*, 52 (2012) 1-6.

[195] V. Adam-Vizi, A.A. Starkov, Calcium and mitochondrial reactive oxygen species generation: how to read the facts, *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 20 Suppl 2 (2010) S413-426.

[196] M.J. Hansson, R. Mansson, S. Morota, H. Uchino, T. Kallur, T. Sumi, N. Ishii, M. Shimazu, M.F. Keep, A. Jegorov, E. Elmer, Calcium-induced generation of reactive oxygen species in brain mitochondria is mediated by permeability transition, *Free radical biology & medicine*, 45 (2008) 284-294.

[197] A.J. Kowaltowski, R.F. Castilho, A.E. Vercesi, Ca²⁺-induced mitochondrial membrane permeabilization: role of coenzyme Q redox state, *The American journal of physiology*, 269 (1995) C141-147.

[198] J.A. Dykens, Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration, *Journal of neurochemistry*, 63 (1994) 584-591.

[199] A.A. Starkov, B.M. Polster, G. Fiskum, Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax, *Journal of neurochemistry*, 83 (2002) 220-228.

[200] Z. Komary, L. Tretter, V. Adam-Vizi, H₂O₂ generation is decreased by calcium in isolated brain mitochondria, *Biochimica et biophysica acta*, 1777 (2008) 800-807.

- [201] V. Ralevic, G. Burnstock, Receptors for purines and pyrimidines, *Pharmacological reviews*, 50 (1998) 413-492.
- [202] M. Treiman, C. Caspersen, S.B. Christensen, A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPases, *Trends in pharmacological sciences*, 19 (1998) 131-135.
- [203] K.T. Jones, G.R. Sharpe, Thapsigargin raises intracellular free calcium levels in human keratinocytes and inhibits the coordinated expression of differentiation markers, *Experimental cell research*, 210 (1994) 71-76.
- [204] V. Emiliani, A.E. Cohen, K. Deisseroth, M. Hausser, All-Optical Interrogation of Neural Circuits, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 35 (2015) 13917-13926.
- [205] K.F. Palmer, D. Williams, Optical properties of water in the near infrared*, *J. Opt. Soc. Am.*, 64 (1974) 1107-1110.
- [206] L. Shi, L.A. Sordillo, A. Rodriguez-Contreras, R. Alfano, Transmission in near-infrared optical windows for deep brain imaging, *Journal of biophotonics*, 9 (2016) 38-43.
- [207] G.T. Hanson, R. Aggeler, D. Oglesbee, M. Cannon, R.A. Capaldi, R.Y. Tsien, S.J. Remington, Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators, *The Journal of biological chemistry*, 279 (2004) 13044-13053.
- [208] M. Schwarzlander, M.D. Fricker, C. Muller, L. Marty, T. Brach, J. Novak, L.J. Sweetlove, R. Hell, A.J. Meyer, Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells, *Journal of microscopy*, 231 (2008) 299-316.
- [209] J.H. Kim, S.R. Lee, L.H. Li, H.J. Park, J.H. Park, K.Y. Lee, M.K. Kim, B.A. Shin, S.Y. Choi, High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice, *PloS one*, 6 (2011) e18556.
- [210] M.E. Filbin, B.S. Vollmar, D. Shi, T. Gonen, J.S. Kieft, HCV IRES manipulates the ribosome to promote the switch from translation initiation to elongation, *Nature structural & molecular biology*, 20 (2013) 150-158.
- [211] Y. Zhao, W. Qin, J.P. Zhang, Z.Y. Hu, J.W. Tong, C.B. Ding, Z.G. Peng, L.X. Zhao, D.Q. Song, J.D. Jiang, HCV IRES-mediated core expression in zebrafish, *PloS one*, 8 (2013) e56985.
- [212] N.C. Shaner, R.E. Campbell, P.A. Steinbach, B.N. Giepmans, A.E. Palmer, R.Y. Tsien, Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein, *Nature biotechnology*, 22 (2004) 1567-1572.
- [213] X. Shu, N.C. Shaner, C.A. Yarbrough, R.Y. Tsien, S.J. Remington, Novel chromophores and buried charges control color in mFruits, *Biochemistry*, 45 (2006) 9639-9647.
- [214] R.A. Cinelli, A. Ferrari, V. Pellegrini, M. Tyagi, M. Giacca, F. Beltram, The enhanced green fluorescent protein as a tool for the analysis of protein dynamics and localization: local fluorescence study at the single-molecule level, *Photochemistry and photobiology*, 71 (2000) 771-776.

- [215] F.N. Hamada, M. Rosenzweig, K. Kang, S.R. Pulver, A. Ghezzi, T.J. Jegla, P.A. Garrity, An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*, *Nature*, 454 (2008) 217-220.
- [216] A. Avdesh, M. Chen, M.T. Martin-Iverson, A. Mondal, D. Ong, S. Rainey-Smith, K. Taddei, M. Lardelli, D.M. Groth, G. Verdile, R.N. Martins, Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: an introduction, *J Vis Exp*, (2012) e4196.
- [217] E.J. Peterson, D.J. Tyler, Motor neuron activation in peripheral nerves using infrared neural stimulation, *Journal of neural engineering*, 11 (2014) 016001.
- [218] G.M. Dittami, S.M. Rajguru, R.A. Lasher, R.W. Hitchcock, R.D. Rabbitt, Intracellular calcium transients evoked by pulsed infrared radiation in neonatal cardiomyocytes, *The Journal of physiology*, 589 (2011) 1295-1306.
- [219] G.V. Orsinger, J.D. Williams, M. Romanowski, Focal activation of cells by plasmon resonance assisted optical injection of signaling molecules, *ACS nano*, 8 (2014) 6151-6162.
- [220] J. Ando, N.I. Smith, K. Fujita, S. Kawata, Photogeneration of membrane potential hyperpolarization and depolarization in non-excitabile cells, *European biophysics journal : EBJ*, 38 (2009) 255-262.
- [221] H.T. Beier, G.P. Tolstykh, J.D. Musick, R.J. Thomas, B.L. Ibey, Plasma membrane nanoporation as a possible mechanism behind infrared excitation of cells, *Journal of neural engineering*, 11 (2014) 066006.
- [222] H. Itoh, K. Oyama, M. Suzuki, S. Ishiwata, Microscopic heat pulse-induced calcium dynamics in single WI-38 fibroblasts, *Biophysics (Nagoya-shi)*, 10 (2014) 109-119.
- [223] M. Matthews, B. Trevarrow, J. Matthews, A virtual tour of the Guide for zebrafish users, *Lab animal*, 31 (2002) 34-40.
- [224] M. Pavlidis, N. Digka, A. Theodoridi, A. Campo, K. Barsakis, G. Skouradakis, A. Samaras, A. Tsalafouta, Husbandry of zebrafish, *Danio rerio*, and the cortisol stress response, *Zebrafish*, 10 (2013) 524-531.
- [225] A.A. Voronin, I.V. Fedotov, L.V. Doronina-Amitonova, O.I. Ivashkina, M.A. Zots, A.B. Fedotov, K.V. Anokhin, A.M. Zheltikov, Ionization penalty in nonlinear Raman neuroimaging, *Optics letters*, 36 (2011) 508-510.
- [226] F. Zhang, L.P. Wang, M. Brauner, J.F. Liewald, K. Kay, N. Watzke, P.G. Wood, E. Bamberg, G. Nagel, A. Gottschalk, K. Deisseroth, Multimodal fast optical interrogation of neural circuitry, *Nature*, 446 (2007) 633-639.
- [227] J.G. Bernstein, P.A. Garrity, E.S. Boyden, Optogenetics and thermogenetics: technologies for controlling the activity of targeted cells within intact neural circuits, *Current opinion in neurobiology*, 22 (2012) 61-71.
- [228] E. Kastnerhuber, M. Gesemann, M. Mickoleit, S.C. Neuhauss, Phylogenetic analysis and expression of zebrafish transient receptor potential melastatin family genes, *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 242 (2013) 1236-1249.

[229] J.W. Little, D.W. Mount, C.R. Yanisch-Perron, Purified *lexA* protein is a repressor of the *recA* and *lexA* genes, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 78 (1981) 4199-4203.

Приложение 1

Таблица 1. Инструменты оптогенетики и термогенетики и их спектральные и кинетические характеристики.

Название	Максимум $\lambda^{(1)}$ нм	Интервал $\lambda^{(2)}$, нм	Время срабатывания, мс ⁽³⁾	Действие на клетки
ChR2	475	450-490	<1	вход Na^+ , H^+ , K^+ , Ca^{2+} , деполяризация
ChR2/H134R	470	450-490	<1	Деполяризация
ChR2/C128X(X T/A/S),ChR2/D156A	470	450-490	1-5	Деполяризация
ChR2/E123T (ChETA)	470	450-490	<1	Деполяризация
ChIEF	450	450-490	<1	Деполяризация
ChD	450	430-480	<1	Деполяризация
ChR2-XXL	450	450-490	10	Длительная деполяризация
CatCh	470	450-490	<1	Деполяризация, вход Ca^{2+}
ChEF	490	470-570	<1	Деполяризация
VChR1	540	400, 510-550	3	Деполяризация
C1V1	589	580-600	1-2	Деполяризация
ReaChR	605	590-630	<1	Деполяризация
ChARGe	500	400-600	5000	Деполяризация, активация G-белков
SPARK (ON)	380	370-390	2000	Гиперполяризация, вход K^+
iGLUR (ON)	380	370-390	100	Деполяризация, активация G-белков
miniSOG	440	390-450	10000	АФК
PACR	450	400-500	100	вход Ca^{2+}
LOVS1K	440	350-500	5000	вход Ca^{2+}
OptoORAI	440	390-490	10 000	вход Ca^{2+}
OptoSTIM	450	400-500	10 000	вход Ca^{2+}
OptoCRAC	705	695-730	3 000	вход Ca^{2+}

TPT1	568	550-580	1-5	Гиперполяризация, вход Cl ⁻
TPT2	588	575-600	1-5	Гиперполяризация, вход Cl ⁻
NpHR, eNpHR	575	525-630	1-5	Гиперполяризация, вход Cl ⁻
iChloC, iC++, GtACR	455	400-500	5-10	Гиперполяризация, вход Cl ⁻
TRPV1HisTag	6.6*10(11)	1*10(10)- 1*10(12)	1000	Деполаризация, вход Ca ²⁺
KillerOrange	450	450-495	60 000	АФК
KillerRed	475	540-600	60 000	АФК
dTRPA1	808	808	100	Деполаризация, вход Ca ²⁺
caTRP1, eo1TRPA1	1342	1040-2100	1	Деполаризация, вход Ca ²⁺
TRPV1	750	700-755	20000	Деполаризация, вход Ca ²⁺
TRPV1	7.5*10(10)	1*10(9)- 1*10(11)	5-50	Деполаризация, вход Ca ²⁺
caTRPA1	100000000	10000 000 – 100000000	1-35	Деполаризация, вход Ca ²⁺
SPARK (OFF)	580	490-505	2000	Гиперполяризация, вход K ⁺
iGLUR (OFF)	580	490-505	100	Деполаризация, активация G-белков

- (1) максимум поглощения для видимого света или используемая на практике длина волны для СВЧ, УЗ и ИК
- (2) Диапазон поглощения видимого света или протестированные диапазоны для СВЧ, УЗ и ИК для указанных инструментов.
- (3) Экспериментально измеренное время стимуляции, необходимое для наблюдения первых событий активации (деполяризация, минимальные детектируемые изменения флуоресценции красителей и т.д.) на клеточных культурах.