

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Кост Любовь Александровна

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

Специальность 1.5.3 – «молекулярная биология»

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Богданов Алексей Михайлович

Москва, 2021

Оглавление

Оглавление	2
Введение	4
1. Обзор литературы.....	7
1.1 Методы регистрации мембранного потенциала	7
1.2 Принцип работы и варианты дизайна ГКИМП	9
1.2.1 Однодоменные.....	10
1.2.2 Многодоменные	10
1.3 Обзор характеристик ГКИМП.....	12
1.4 Портрет идеального индикатора	20
1.5 Репертуар потенциал-чувствительных доменов.....	21
1.6 Престин.....	24
1.7 Репортерный домен генетически кодируемых индикаторов мембранного потенциала на основе GFP-подобных белков.....	27
1.7.1 Красные и дальнекрасные варианты флуоресцентных белков	28
1.7.2 Характеристики белка FusionRed.....	30
1.8 Циркулярное пермутирование.....	32
2. Материалы и методы.....	33
2.1 Молекулярное клонирование.....	33
2.1.1 Амплификация ДНК.....	33
2.1.2 Случайный ПЦР-мутагенез	33
2.1.3 ПЦР-скрининг	33
2.1.4 Электрофорез в агарозном геле.....	34
2.1.5 Выделение плазмидной ДНК	34
2.1.6 Очистка ДНК.....	35
2.1.7 Рестрикция	35
2.1.8 Лигирование.....	36
2.1.9 Метод «Golden Gate».....	36
2.1.10 Анализ нуклеотидной последовательности ДНК.....	36
2.1.11 Выделение белков из культуры <i>E. coli</i>	37
2.2 Спектроскопия	38

2.2.1. Оценка спектров поглощения	38
2.2.2. Измерения молярного коэффициента экстинкции	38
2.2.3. Расчет квантового выхода флуоресценции	38
2.3 Работа с культурами клеток.....	38
2.3.1 Трансформация прокариотических клеток.....	38
2.3.2 Ведение и трансфекция клеток НЕК293Т	39
2.3.3 Ведение клеток РС12	39
2.3.4 Трансфекция клеток РС12.....	40
2.4 Микроскопия	40
2.5 Метод локальной фиксации потенциала	41
3. Результаты и их обсуждение	44
3.1 Циркулярно пермутированные варианты белка FusionRed.....	44
3.2 Бимолекулярные варианты белка FusionRed	46
3.3 Создание новой топологической комбинации ГКИМП на основе бимолекулярного варианта белка FusionRed	48
3.4 Оптимизация междоменного линкера индикатора VSD-FR189-188	55
3.5 Оптимизация репортерного домена.....	62
3.6 Применение электроподвижного белка млекопитающих престина для разработки ГКИМП на его основе.	64
3.6.a Топология «insertion into FP» для создания Prestin-FR.....	66
3.6.б Топология «insertion into cpFP» для создания вариантов Prestin-X	69
3.6.в Топология «insertion of cpFP»	75
4. Заключение.....	84
5. Выводы	86
6. Список цитированной литературы	87
7. Приложения	98
7.1 Список сокращений.....	98
7.2 Схема двухпромоторного вектора	100

Введение

Визуализация электрической активности живых клеток представляет собой важнейшую задачу в контексте фундаментальных нейрофизиологических исследований.

В настоящее время применяется ряд подходов для регистрации электрической активности множества клеток одновременно. Это необходимо для изучения физиологии процессов, происходящих в головном мозге на уровне нейронных цепей. Флуоресцентные индикаторы мембранного потенциала являются одними из наиболее перспективных инструментов в этой области. Они представляют собой относительно небольшие белковые молекулы, кодирующие последовательности которых можно ввести в геном изучаемого организма или временно экспрессировать в интересующих клетках. Такой подход позволяет наблюдать изменения потенциала мембраны при максимальном пространственном разрешении с минимальной инвазивностью, в том числе во время длительных экспериментов. Индикаторы мембранного потенциала подлежат постоянному совершенствованию и оптимизации. «Идеальный индикатор» должен обладать высоким пространственным и временным разрешением, а также иметь высокий контраст спектрального отклика на изменения мембранного потенциала. Другими критическими характеристиками являются применимость на широком диапазоне значений потенциала, минимальное время отклика и низкая токсичность при использовании *in vivo*. Рассматривая применение индикаторов в лабораторной практике, следует также обратить внимание на такую проблему, как простота и надежность детекции. Разумно предположить, что яркий индикатор, сигнал которого регистрируется в одном спектральном канале, является наиболее предпочтительным решением для большинства экспериментальных задач. Более того, исследования *in vivo* требуют повышенной проникающей способности излучаемого света, что характерно для диапазона длин волн от красного до инфракрасного. Сигнал идеального индикатора должен надежно регистрироваться с поверхности тела интактного организма. Лучшие из доступных в настоящее время индикаторов все еще не достигли оптимального сочетания всех этих параметров.

Цель нашего исследования: разработать индикатор мембранного потенциала на основе красного флуоресцентного белка FusionRed.

Задачи исследования, необходимые для достижения поставленной цели:

1. Изучение репертуара генетически кодируемых индикаторов мембранного потенциала, применимых *in vivo*; рассмотрение разнообразия красных флуоресцентных белков, а также методов их модификации и использования при конструировании генетически кодируемых индикаторов;
2. Создание пермутированных и бимолекулярных вариантов мономерного красного флуоресцентного белка FusionRed;
3. Применение бимолекулярных вариантов FusionRed в качестве репортерной части потенциал-чувствительных индикаторов, сконструированных в соответствии с топологической моделью "insertion into cpFP". Тестирование полученных конструкций в клетках линии НЕК293Т и РС12;
4. Оптимизация функциональных характеристик полученных вариантов индикатора путём варьирования их флуоресцентного и/или чувствительного ядер, а также аминокислотных линкеров между ядрами.

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

За свою более чем двадцатилетнюю историю ГКИМП прошли много этапов оптимизации и доработки. Потенциал-чувствительные мотивы природных белков из целого ряда организмов были опробованы в качестве ПЧД и применены во множестве комбинаций с различными репортерными доменами. Тем не менее, поиск оптимального сочетания наиболее перспективных доменов продолжается, и исследование не теряет своей актуальности. Инструмент для визуализации электрической активности с низкой инвазивностью и высокой специфичностью нацеливания на выбранный тип клеток позволит исследовать физиологию

важнейших процессов, происходящих в нервной системе в норме и при патологических состояниях.

Поиск оптимальной архитектуры индикатора на данный момент так же важен для развития области, как и обогащение репертуара потенциал-чувствительных и репортерных доменов.

1. Обзор литературы

1.1 Методы регистрации мембранного потенциала

Мембранный потенциал – неотъемлемое свойство любой живой клетки и важный компонент клеточного гомеостаза. Электровозбудимые клетки способны активно управлять своим мембранным потенциалом, что лежит в основе их функционального своеобразия. Со времен открытия Гальвани электрической природы локомоции животных [1] поиск подходов к удобному и надежному мониторингу активности нервных и мышечных клеток остается задачей первостепенной важности для современной биологии. Актуальность проблемы подтверждается тем фактом, что за разработку метода регистрации электрической активности клеток были присуждены две Нобелевские премии по физиологии и медицине (1963 и 1991 годов). Первым методологическим решением была двухэлектродная техника измерения трансмембранных токов – 2-electrode voltage clamp – примененная Алан Ходжкин и Эндрю Хаксли в конце 1940-х – начале 1950-х годов [2]. Они вводили в гигантский аксон кальмара два тонких металлических электрода, один из которых использовался для измерения разности потенциалов между внутриклеточным и внеклеточным пространством, а второй для генерирования тока удержания потенциала. Эксперименты с двухэлектродной техникой дали почву для создания математической и биофизической модели генерации и передачи нервного сигнала (The Hodgkin–Huxley model), фактически предсказавшей существование трансмембранных ионных каналов и описавшей ионную природу потенциала действия. Вторая важнейшая веха связана с экспериментами Эрвина Неера и Берта Сакманна, которые в конце 1970-х – начале 1980-х годов с помощью стеклянной микропипетки, образующей т.н. гигаомный контакт с плазматической мембраной, смогли использовать один и тот же электрод и для измерения потенциала, и для его удержания – метод, известный нам сегодня как Patch-clamp [3].

Благодаря их открытию уже в 1980-х годах были проведены первые в мире записи токов молекул одиночных ионных каналов. Это углубило понимание роли трансмембранных каналов в фундаментальных клеточных процессах, таких как потенциал действия.

В настоящее время patch clamp – это одна из самых популярных техник, широко используемых в различных конфигурациях и вариациях. Основанный на нем метод мультиэлектродных матриц преодолел ограничение одновременного электрофизиологического измерения нескольких клеток [4]. Более того, разработаны автоматические patch-clamp системы для изучения активности мозга, как с использованием тонких срезов мозга, так и *in vivo* [5], [6].

Важный недостаток микроэлектродного метода – необходимость установления механического контакта с клеточной поверхностью, на практике означающая высокую инвазивность и затрудненность измерений в толще животных тканей. Этот вопрос был рассмотрен при разработке косвенных подходов к измерению потенциала мембран, опирающемуся на регистрацию флуоресцентного сигнала. **Флуоресцентные методы визуализации**, начавшие свою историю с **синтетических потенциал-чувствительных красителей**, развивались параллельно микроэлектродным техникам и в тесном взаимодействии с последними [7], [8].

Идея использования оптических методов для измерения мембранного потенциала была впервые предложена Лоуренсом Б. Коэном в 1968 году [9], а позже в том же году Тасаки и его коллеги использовали такой краситель для визуализации электрической активности в гигантском аксоне кальмара [10]. Разработки в этой области претерпели множество преобразований, количество вариантов синтетических красителей исчисляется тысячами [11], также в настоящее время создана богатая коллекция спектральных вариантов, позволяющая записывать быстрые события в срезах мозга [12] и даже в модулях мозга *in vivo* [13], [14]. Однако ограничения метода продиктованы самой природой этих соединений. Данные липофильные красители окрашивают все доступные мембраны, будь то нейроны, глиальные клетки и т.д. Плотная упаковка клеточных отростков в окрашиваемой области нервной ткани не позволяет оптически разрешить отдельные структуры. Как результат, мы можем регистрировать лишь усредненное значение изменения мембранного потенциала. Это приводит к уменьшению отношения сигнал/шум и снижает общую разрешающую способность метода. Также характерные для потенциал-чувствительных красителей фотообесцвечивание, фототоксичность и инвазивность процедуры окрашивания все еще не соответствуют требованиям, предъявляемым к продолжительным экспериментам *in vivo*.

Более того, для ряда красителей показано, что они могут оказывать влияние непосредственно на свойства окрашиваемой мембраны [15], [16], что ведет к некорректной интерпретации результатов.

Еще одним важным моментом в практическом использовании потенциал-чувствительных красителей является степень интернализации. Так, клетки могут интернализировать краситель в свою цитоплазму [17] и хорошим показателем длительности эксперимента с потенциал-чувствительными индикаторами (т.е. время от окраски мембран до интернализации) считается 2-3 часа. Например, краситель JPW-6003 обеспечивает время эксперимента 80–210 минут, что в 5–7 раз больше, чем с di-4-ANEPPS [18]. Такая кинетика интернализации сильно ограничивает время эксперимента, исследователи вынуждены прибегать ко множеству уловок и ухищрений в условиях ограниченного времени.

Нельзя отрицать огромный вклад метода в развитие функциональной визуализации в нейробиологии, но, несмотря на явные преимущества в виде быстрой кинетики и большого динамического диапазона таких красителей, их фактическое использование в экспериментальной практике сопряжено с рядом существенных трудностей и ограничений.

Наконец, самый молодой и быстро развивающийся подход к мониторингу электрической активности – это оптогенетика. Главными героями здесь являются **Генетически Кодированные Индикаторы Мембранного Потенциала**. Такие индикаторы (также их называют сенсоры, биосенсоры или зонды) обычно представлены относительно небольшими белками, кодирующая последовательность которых может быть введена в геном организма или временно экспрессирована в интересующих клетках [19]. Этот подход имеет относительно низкую инвазивность и высокую физиологическую совместимость, что особенно важно для продолжительных (хронических) экспериментов. Генетически кодируемые индикаторы могут быть нацелены на определенные области мозга [20], типы клеток [21],[22] и субклеточные компартменты [23],[24],[25],[16].

1.2 Принцип работы и варианты дизайна ГКИМП

Функционирование ГКИМП можно представить как последовательность двух стадий: индикатор воспринимает изменение потенциала мембраны, меняя свою пространственную

конформацию; конформационные изменения преобразуются в изменения оптического сигнала. В некоторых ГКИМП обе эти функциональные активности объединены в одном и том же домене, но чаще они структурно распределены между чувствительным доменом и репортерным доменом (репортером), соединенными в единый химерный белок.

С точки зрения белковой архитектуры, мы можем разделить все существующие молекулы ГКИМП на два основных класса:

1.2.1 Однодоменные

Вариант с наиболее простой архитектурой, молекула индикатора состоит только из одной структурной единицы, которая может одновременно выполнять как сенсорную, так и репортерную функцию. Пример для индикаторов этого типа – зонды на основе канального родопсина Arch [26]. Все однодоменные ГКИМП происходят из белков, изначально локализованных в плазматической мембране клетки. Изменения потенциала сопровождается конформационным сдвигом внутри молекулы. Хромофор – ретиналь – под действием этих конформационных подвижек меняет интенсивность собственной флуоресценции.

1.2.2 Многодоменные

Многодоменная архитектура – более часто используемый вариант в дизайне ГКИМП. Внутри этой группы, где структурно различные белковые модули составляют единую химерную молекулу, можно дополнительно выделить группы индикаторов в соответствии с топологией их полипептидной цепи, то есть по способу соединения их структурно-функциональных модулей друг с другом. Примечательно, что разработка ГКИМП может подразумевать такие манипуляции по инженерии белков, как циклическая перестановка и/или вставка одного домена в другой. Принципы построения генетически кодируемых флуоресцентных индикаторов были подробно описаны в контексте основанных на GFP химерных конструкций [27], и их использование может быть распространено на широкий спектр гибридных белков.

Рассмотрим варианты соединения репортерного и чувствительного доменов в соответствии с несколькими топологическими схемами (рис 1).

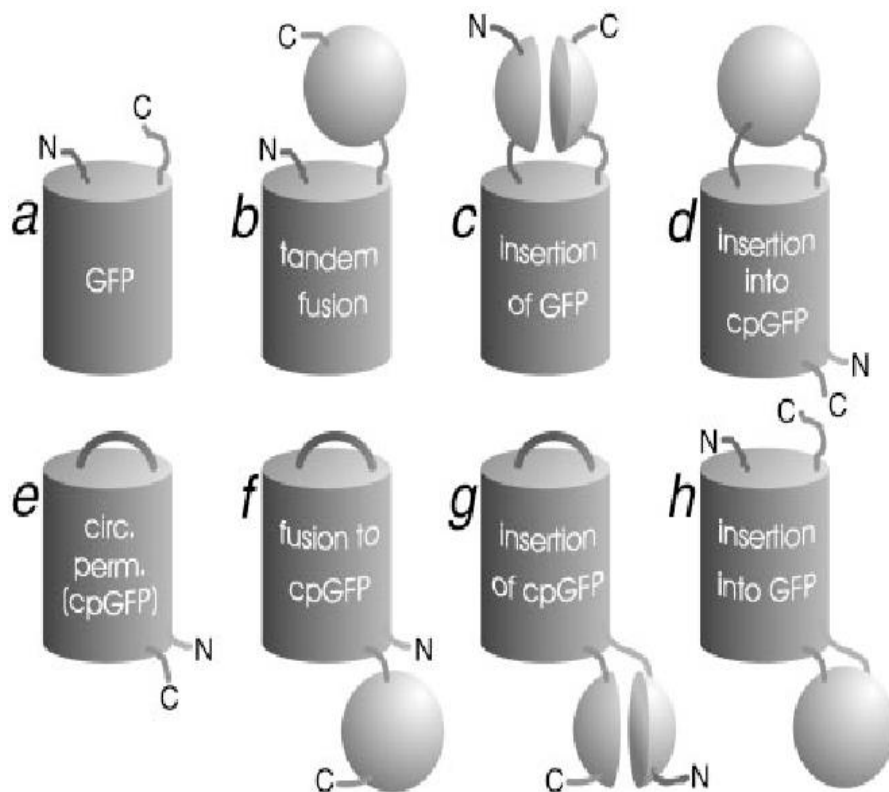


Рисунок 1. Схематическое изображение GFP, cpGFP и вариантов их химерных конструкций с чувствительными доменами в разных топологических комбинациях [27].

- a. GFP или любой другой GFP-подобный флуоресцентный белок (ФБ) с нативной первичной структурой; на схеме третичной структуры обозначены исходные N- и C-концы полипептидной цепи. GFP широко используется как биомаркер [28], [29], также существуют примеры индикаторов, представляющие собой одиночный флуоресцентный белок [30], однако среди ГКИМП таких вариантов разработано не было;
- b. “Tandem fusion” или последовательное соединение ПЧД с ФБ нативной первичной структуры за один из концов. Среди ГКИМП эта архитектура характерна для индикаторов ArcLight [22], Bongwoori [31], VSFP3.1 [32];
- c. Вставка флуоресцентного белка внутрь потенциал-чувствительного домена «insertion of FP» опробована в индикаторах FlaSh [33] и SPARC [34]. Они являются примером

топологии, в которой нарушена непрерывность полипептидной цепи одного из доменов: чувствительный домен разделен на части, фланкирующие репортер;

d. и h. Схемы «Insertion into FP» (вставка чувствительного ядра во флуоресцентный белок) и «Insertion into cpFP» (вставка чувствительного ядра в циркулярный пермутант флуоресцентного белка) ранее не применялась для ГКИМП;

e. Пермутированный флуоресцентный белок (cpGFP);

f. Последовательное соединение ПЧД с пермутированным ФБ; демонстрирует дальнейший прогресс в разработке генетически кодируемых индикаторов, использование циркулярных пермутантов флуоресцентных белков в топология «fusion to cpFP» реализуется в потенциал-чувствительных индикаторах FlicR1 [35] и ElectricPk [36];

g. Вставка пермутированного флуоресцентного белка внутрь потенциал-чувствительного домена «insertion of cpFP» применялась в сенсорах ASAP1 [37] и ASAP2f [24].

Таким образом, четыре из шести описанных топологических сочетаний белковых доменов уже использовались ранее в ГКИМП, нами же был предложен вариант реализации пятой топологии “insertion into cpFP” – на этом подходе построены описываемые в данной работе индикаторы VSD-FR189-188 [38] и Prest-5 [39].

Топология индикатора может оказывать значительное влияние на его практические характеристики, из-за сложности моделирования поведения индикатора характер этого влияния *a priori* не известен, поэтому возникает необходимость применения различных топологических вариаций для оптимизации свойств его молекулы.

1.3 Обзор характеристик ГКИМП

При разработке флуоресцентного индикатора необходимо иметь в виду весь набор характеристик, которые важны для практического применения этой молекулы. Лишь сочетание всех желаемых качеств обеспечивает применимость полученного молекулярного инструмента для решения реальных экспериментальных задач. Мы предлагаем разделить все свойства «идеального» ГКИМП на 3 группы.

1) **Минимальные требования к индикаторной молекуле.** К этой группе мы отнесли мембранную локализацию, жизнеспособность клеток при экспрессии ГКИМП и чувствительность к изменению мембранного потенциала в физиологическом диапазоне его значений. Рассмотрим их немного подробнее:

а) **Корректная локализация белка в плазматической мембране и корректный фолдинг.** С помощью ГКИМП производится измерение трансмембранного потенциала, который является неотъемлемым свойством плазматической мембраны клеток. Разработка ГКИМП существенно осложняется тем обстоятельством, что по функциональным причинам эти молекулы требуют исключительно мембранной локализации. Это сталкивает исследователей сразу с двумя сложностями: во-первых, обеспечение корректного нацеливания гетерологически экспрессируемого белка на клеточную мембрану обычно является нетривиальной задачей, во-вторых, интегральный флуоресцентный сигнал структуры с такой небольшой площадью, как плазматическая мембрана, значительно слабее такового для цитоплазматических индикаторов, а значит требования к регистрации флуоресцентного сигнала этого индикатора будут выше при прочих равных. Молекулы с некорректным фолдингом и/или траффикингом могут флуоресцировать, но быть нечувствительными к потенциалу, тем самым существенно снижая общий динамический диапазон (ДД) ответа. В идеальном случае молекула ГКИМП должна осуществлять точное нацеливание на мембрану, чтобы обеспечивать: (i) максимальное количество излучающих молекул, которые сохраняют чувствительность к потенциалу, и, таким образом, вносят максимальный вклад общей интенсивности флуоресценции в достоверный сигнал; (ii) минимальную агрегацию белка и накопление неправильно свернутых молекул в цитоплазме и особенно в компартментах, участвующих в процессинге белка (таких как аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум) при гетерологичной экспрессии. Отметим, что первое поколение ГКИМП на основе калиевых и натриевых каналов имело проблемы с мембранной локализацией [33], [40]. Для улучшения мембранной локализации в процессе создания индикатора приходится прибегать к введению сигнальных последовательностей. Так, для микробных опсинов нацеливание на мембрану может быть улучшено за счет использования экспортных мотивов эндоплазматического ретикулума или транспортных последовательностей

аппарата Гольджи из потенциал-зависимого ионного канала [41]. Современные ГКИМП, большинство из которых представлено вариантами на потенциал-зависимой фосфатазе и родопсинах (см. Глава 1.5), в основном преодолели эту проблему, но каждая попытка перехода на потенциально перспективное новое чувствительное ядро, являющееся тем или иным вариантом мембранного белка, вновь возвращает исследователей к этому вопросу [42].

б) Выживаемость клеток при экспрессии ГКИМП. Экспрессия чужеродных мембранных белков может быть чрезвычайно токсичной для целевых клеток. В предельном случае она не совместима с выживаемостью культуры в принципе. Помимо таких неспецифических причин высокой цитотоксичности, как агрегация химерного белка в цитоплазме и блокирование системы белкового трафикинга в аппарате Гольджи и эндоплазматическом ретикулуме, существуют более специфические для ГКИМП физиологические эффекты, связанные, в частности, с нарушением физико-химических свойств плазматической мембраны, в т.ч. её текучести и проводимости [43]. Хотя в публикациях ГКИМП описываются в терминах “более или менее цитотоксичный”, можно предположить, что значительное число промежуточных вариантов этих индикаторов выбраковываются как несовместимые с клеточной выживаемостью.

с) Чувствительность к изменению мембранного потенциала в физиологическом диапазоне его величин. Потенциал покоя мембраны в электровозбудимых и электронейтральных клетках обычно варьируется в широком диапазоне от -10 до -100 мВ [44]. Чаще всего для нейронов потенциал покоя составляет от -70 до -60 мВ. Но для ряда клеток, характеризующихся спонтанной и пейсмекерной активностью, потенциал покоя – малоинформативный показатель. Актуальнее рассматривать характеристики потенциала действия (ПД). Потенциал действия расширяет этот интервал, составляя примерно от -85 мВ при гиперполяризации до +20 мВ при деполяризации, при этом значения варьируются как для разных популяций нейронов, так и для разных методов измерения [45]. Отдельно можно отметить, что для регистрации подпороговой активности сенсор должен обладать особой чувствительностью в районе значений потенциала покоя. Таким образом, разработка линейки индикаторов, характеризующихся чувствительностью при разных значениях потенциала, являются перспективной с точки зрения создания

специализированных инструментов, применимых для широкого спектра отдельных экспериментальных задач.

2) **Ключевые характеристики.** Основные свойства, т.е. количественные характеристики регистрации потенциала мембраны изучаемых клеток.

а) **Динамический диапазон ($\Delta F/F$ или $\Delta R/R$),** или контраст индикатора. Динамический диапазон – это величина, показывающая максимально возможное изменение полезного сигнала [46]. В ряде современных индикаторов динамический диапазон достигает почти 100% [47], [48], но зачастую такие значения приводятся для нерелевантных модельных систем. Можно сказать, что наиболее адекватным способом представления динамического диапазона является величина $\Delta F/F$ ($\Delta R/R$) на единичный ПД. Важно осознавать, что сигнал одного и того же индикатора в разных модельных системах может отличаться по величине на порядки. Например, dF/F индикатора ArcLight-MT в системе *in vitro* составляет 20%, а *in vivo* – лишь 0,2% на 100мВ [49]. Динамический диапазон, измеренный *in vitro* (например, в клетках HEK293T), может рассматриваться как ориентировочный показатель, полезный для сравнения индикаторов в процессе их дизайна и оптимизации, однако не обязательно отражающий эффективность конкретного ГКИМП при применении в релевантной модельной системе [50].

Кинетика флуоресцентного ответа (скорость, временное разрешение индикатора) индикатора. Мембрана клетки ведет себя как электрическая цепь с конденсатором (от липидного бислоя) и сопротивлением (от ионных каналов), включенными параллельно. Подача прямоугольного импульса тока в «электрическую цепь» мембраны (как это происходит при открытии ионного канала) вызывает медленно возрастающее и убывающее изменение напряжения, как показано на нижнем графике (Рис. 2).

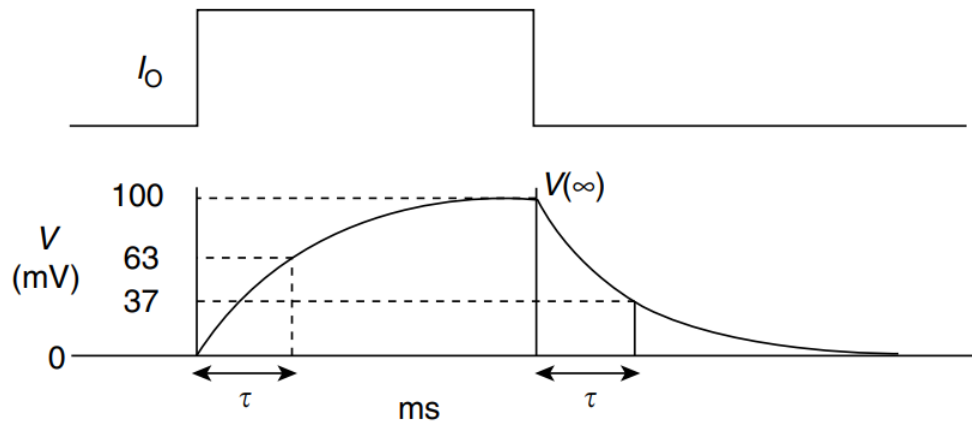


Рисунок 2. Кривая ответа индикатора при изменении потенциала мембраны. Ток возрастает до значения $V=IR$ с течением времени, зависящим от τ , постоянной времени ($=RC$, или время спада до 37% от максимума, время до достижения 63% от максимума).

Для успешного практического применения индикатора мембранного потенциала требуется временное разрешение в субмиллисекундной шкале [51], индикатор с кинетикой порядка десятков-сотен микросекунд позволяет регистрировать быстрые события в нервной системе (единичные потенциалы действия, высокочастотные колебания потенциала). Время активации флуоресцентного ответа индикатора обозначается как τ_{on} , время его инактивации τ_{off} . Время активации флуоресцентного ответа некоторых индикаторов характеризуют быстрой (τ_{on1}) и медленной (τ_{on2}) компонентами, а также относительными вкладами (амплитудами) отдельных компонент.

Введение данных параметров происходит в силу того, что кривая ответа индикатора может иметь разный характер роста и быть аппроксимирована как однокомпонентной, так и многокомпонентной экспоненциальной моделью.

3) Дополнительные функции, расширяющие применимость и надежность индикатора:

- а) **Яркость флуоресценции** (произведение квантового выхода флуоресценции на молярный коэффициент экстинкции) и связанное с ней соотношение сигнал/шум (SNR). Высокая яркость и высокое SNR – это возможность работать на более быстрых детекторах

и в более толстых образцах, а также сниженные требования к уровню экспрессии. Этот параметр наглядно демонстрирует затруднительность реального применения индикаторов на основе опсиновых ПЧД, чей низкий уровень яркости позволяет их использовать лишь в сочетании с ФБ, реализованном в FRET-опсиновых вариантах (QuasAr3 [52], Ace2N-mNeon [53], VARNAM [54]);

b) **Спектральная совместимость.** Применимость на практике для широкого круга экспериментаторов также является крайне желательным требованием, предъявляемым к данным молекулярным инструментам. В частности, возможность детектирования флуоресценции стандартными фильтрами (GFP, TexasRed, Alexa series и пр.) занимает не последнее место в данном вопросе;

c) **Спектральная адаптированность для *in vivo* экспериментов** и визуализации процессов в целом организме наилучшим образом достигается при применении красных и дальне-красных спектральных вариантов индикаторов благодаря наличию так называемого окна прозрачности животных тканей (600 – 1350 нм), где наблюдается минимальное поглощение и рассеяние сигнала;

d) **Положительное соотношение dF/dV ,** т.е. увеличение интенсивности флуоресценции индикатора в ответ на деполяризацию мембраны. Индикаторы с «разгорающимся» сигналом проще и удобнее для детектирования, а также их применение подразумевает меньшее фотообесцвечивание и фотоповреждение в процессе возбуждения хромофора, чем для индикаторов, амплитуда сигнала которых при возбуждении снижается. На данный момент у большинства ГКИМП отрицательное соотношение $-dF/dV$, существуют лишь единичные варианты, характеризующиеся увеличением интенсивности флуоресценции в ответ на деполяризацию мембраны (Marina [55], FlicR1[35]);

e) **Мономерность.** Димеры и более крупные олигомеры имеют большую склонность к образованию внутриклеточных агрегатов. Агрегаты в случае ГКИМП могут образовываться и за счёт ФБ [56], [57], и возможно, за счёт природы ПЧД, а также из-за нарушенного фолдинга/траффикинга результирующей химерной белковой молекулы. Таким образом, при конструировании ГКИМП следует избегать использования

структурных доменов, склонных к спонтанной олигомеризации (по крайней мере, гомоолигомеризации);

f) **pH-стабильность и pH-независимость** показаний является необходимым требованием для любого индикатора состояния живой клетки;

g) **простота детекции.** Этот важнейший параметр имеет под собой комплексную основу, но необходимо обратить внимание на **метод считывания сигнала индикатора.**

Все существующие в настоящее время флуоресцентные индикаторы можно разделить на две группы по типу считывания: интенсиметрические или рациометрические. Интенсиметрическое считывание означает, что флуоресцентные сигналы записываются в одном спектральном канале, изменение интенсивности флуоресценции измеряется относительно его базового (начального) значения на той же длине волны. Мы также можем назвать их монохроматическими индикаторами. Показателем сигнала здесь является dF/F , то есть изменение интенсивности флуоресценции относительно его начального значения. Главное преимущество таких индикаторов – простота считывания. Интенсиметрические измерения обычно не требуют сложной настройки оборудования и, как правило, менее требовательны к квалификации оператора. В эту группу входят такие многообещающие модели сенсоров, как ArcLight, ASAP, Bongwoori, VSFP3x и многие другие. Основным недостатком этого типа индикатора является сравнительно низкий SNR, на него может оказывать влияние фотообесцвечивание, величина сигнала зависит от уровня экспрессии генов и интенсивности освещения.

Рациометрическое измерение включает в себя регистрацию двух спектрально различных характеристик индикатора. В отличие от интенсиметрической регистрации, показания индикатора здесь определяются сдвигом отношения величин флуоресцентного сигнала в двух каналах считывания (dR/R , то есть изменением отношения флуоресценции dR на исходное отношение флуоресценции R). Рациометрический подход предъявляет более высокие требования как к настройке прибора, так и к настройке сбора сигнала, а также сложности/точности обработки данных. Задействование пары спектральных каналов часто ограничивает возможность выполнения многопараметрической визуализации сигнала ГКИМП в сочетании с другими индикаторами или оптогенетическими инструментами. Расширение

спектральной области, используемой с радиометрическими флуоресцентными индикаторами, усложняет их применимость для регистрации сигнала в глубине животных тканей и визуализации процессов в целом организме. Более того, необходимость проведения двух измерений вместо одного автоматически увеличивает длительность раунда единичного считывания сигнала, тем самым снижая временное разрешение индикатора (что особенно важно при регистрации быстрых событий, характерных для нервной системы). Наряду с указанными недостатками, радиометрическое измерение несет ряд ценных преимуществ перед интенсификационным. Такой подход дает возможность измерения независимо от уровня экспрессии индикатора и снижает остаточный гемодинамический шум во время экспериментов при визуализации в целом организме [58]. Также стоит отметить, что при экспрессии интенсификационного индикатора на основе единичного ФБ у исследователей остается возможность поместить под контроль того же промотора второй спектрально отличный ФБ, который будет играть роль внутреннего контроля, как это недавно было показано для GCaMP-R [59]. Полученная система может быть компромиссным вариантом между радиометрическим и интенсификационным измерениями.

h) **высокая биосовместимость** также является одним из требований, предъявляемых к ГКИМП. Молекула индикатора не должна нарушать свойств мембраны и сказываться на физиологии клетки в целом. Один из подходов включает применение в качестве ПЧД белков, эндогенно экспрессируемых млекопитающими (клетки и ткани которых – главный целевой объект использования ГКИМП как инструмента визуализации). Однако часто можно наблюдать, что в такой сложной системе, как молекула ГКИМП, попытка перехода на новое, потенциально более подходящее ядро, приводит к нарушению работы индикатора [42]. Даже для исходно работоспособного индикатора, после таких манипуляций исследователи часто вынуждены возвращаться к оптимизации конструкции практически с нуля.

i) **Низкая цитотоксичность** это также параметр, благодаря которому мы чаще отдаем предпочтение генетически кодируемым вариантам на основе ФБ относительно синтетических потенциал-чувствительных красителей. В целом внедрение экзогенных молекул в мембрану может сказаться на ее характеристиках, нарушить емкостные свойства и далее возбудимость клеток. Поэтому задача разработчиков заключается в

создании инструментов визуализации мембранного потенциала, обеспечивающих минимальное влияние на нормальную физиологию клеток [60].

1.4 Портрет идеального индикатора

Исходя из всего вышесказанного, идеальный ГКИМП – это интенсификационный сенсор, репортерный домен которого построен на ярком дальне-красном ФБ, мономерный, фотостабильный, рН-стабильный, разработанный на чувствительном ядре из белков млекопитающих, обладающий контрастом (dF/F) не менее 50% на ПД, и кинетикой ответа в шкале сотен микросекунд (Таблица 1).

Таблица 1. Характеристики идеального индикатора мембранного потенциала.

Характеристика	Значение
Спектральный вариант репортера	Максимум эмиссии 600-700 нм. Максимум возбуждения более 550 нм.
Кинетика флуоресцентного ответа	$\tau \leq 100$ мкс
dF/F динамический диапазон	Не менее 50% на ПД в нейронах
Локализация белка в клетке	Мембранная локализация без интернализации и образования внутриклеточных агрегатов и гранул
Чувствительность к изменению мембранного потенциала	от -85 до +20 мВ
Квантовый выход	Не менее 0.3
Молярный коэффициент экстинкции ($M^{-1}cm^{-1}$)	Не менее 50 000

Токсичность/фототоксичность	Низкая
Тип считывания сигнала	Интенсиометрический

1.5 Репертуар потенциал-чувствительных доменов

Отдельное внимание необходимо уделить вопросу разнообразия ПЧД. На данный момент можно выделить 6 основных групп ГКИМП по источнику их ПЧД.

1. Первые достижения на пути создания ГКИМП были получены на основе потенциал-чувствительного **калиевого канала** Shaker из *Drosophila melanogaster* [33], однако за прошедшие с тех пор десятилетия насчитывается менее десятка разработанных на данном чувствительном ядре вариантов индикаторов, в основном исследователи не могли преодолеть базовую проблему мембранной экспрессии в клетках эукариот.

2. Разработка индикатора SPARK на основе потенциал-зависимого μ I **натриевого канала** *rNav1.4* скелетных мышц крысы также не привела к серьезному прорыву [34].

3. Отдельного внимания заслуживает попытка рационального дизайна ГКИМП на основе **потенциал-управляемого протонного канала** *Hv* китайской двуустки *Clonorchis sinensis*. Сенсор Pado моделировался *in silico*, в результате выравнивания последовательности консервативного мотива трансмембранного сегмента S2 программой Blast был найден новый ПЧД [61], однако разработанный на нем индикатор Pado является на данный момент единственным подобным примером, и до применения *in vivo* не дошел.

Подводя промежуточный итог по вариантам ГКИМП **на основе потенциал-чувствительных ионных каналов** важно отметить, что потенциал-управляемые ионные каналы осуществляют конформационные изменения в строго ограниченном диапазоне значений мембранного потенциала, что сужает спектр задач, для которых применимы индикаторы на основе таких ПЧД [62].

4. Появившийся через 10 лет после первой попытки разработки ГКИМП индикатор VSFP2.1 [63] оказался родоначальником самой многочисленной на данный момент группы

ГКИМП (Рис. 3). Для его создания в VSFP1 потенциал-чувствительный домен из крысиного Kv2.1 калиевого канала был заменен на ПЧД потенциал-чувствительной фосфатазы асцидии *Ciona intestinalis*. ПЧД из этого морского беспозвоночного дало начало обширной группе ГКИМП. При этом, например, для индикатора ArcLight попытки разработать варианты на целом ряде гомологичных ПЧД из позвоночных не принесли ощутимого прогресса [42]. Примером успешной разработки на ортологе ПЧД из другого организма может служить ASAP1 [64], сенсором мембранного потенциала в этом семействе индикаторов служит ПЧД из цыпленка GgVSD. Мотивацией для этой разработки стал характерный для GgVSD более короткий фрагмент внеклеточной петельной области между трансмембранными сегментами канала S3 и S4, чем аналогичный в молекуле CiVSFP ПЧД. Данное структурное отличие давало надежды на то что ГКИМП, построенный на таком варианте ПЧД, будет демонстрировать более скоординированную работу чувствительного и репортерного доменов. Три поколения ASAPs внесли серьезный вклад в развитие области и позволяют проводить измерения спонтанной и подпороговой нейрональной активности при регистрации у бодрствующих животных [65].

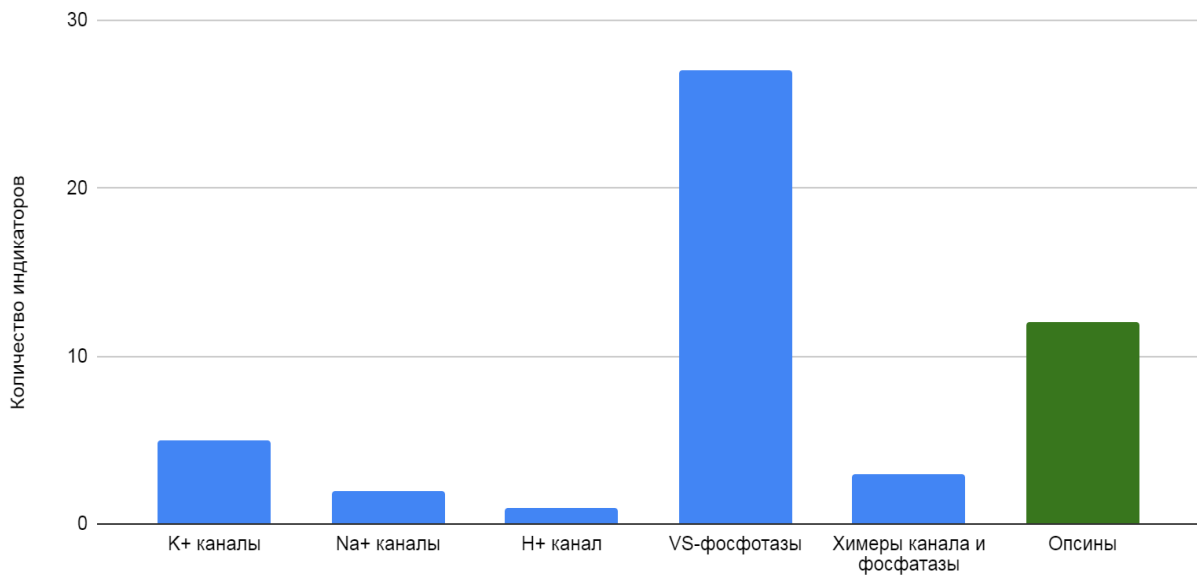


Рисунок 3. Репертуар существующих потенциал-чувствительных доменов разной природы. Синим обозначены индикаторы на основе ионных каналов и потенциал-чувствительной фосфатазы. Зеленым – на основе опсиновых вариантов (статистические данные на 2021 год).

5. Второй по численности и наиболее активно развивающейся сейчас группой ГКИМП является группа индикаторов на основе микробных опсинов. За свою десятилетнюю историю эта группа по числу вариантов ГКИМП догоняет группу на основе потенциал-чувствительной фосфатазы. Первые разработки были произведены на основе протеородопсина green-absorbing proteorhodopsin (GPR) [66], [67]. Полученный ГКИМП PROPS [68] при экспрессии в *E. coli* выявлял электрические всплески частотой до 1 Гц и продемонстрировал тем самым принципиальную работоспособность метода. На данный момент в роли источников ПЧД используются бактериородопсин Археородопсин 3 из бактерий *Halorubrum sodomense* [26], Acetabularia rhodopsin II из морской водоросли *Acetabularia acetabulum* (VARNAM [54]), а также Mac-домен из грибов *Leptosphaeria maculans* (MacQ-mCitrine [69]). Несмотря на беспрецедентную скорость данных индикаторов (менее 50 мкс [48]) и их высокий контраст флуоресцентного ответа 30-80% $\Delta F/F$ на 100 мВ [47], [48], [70], низкий квантовый выход флуоресценции опсиновых вариантов все еще остается главным недостатком индикаторов данной группы. Также это обстоятельство усугубляется быстрым фотообесцвечиванием, низкая интенсивность флуоресцентного сигнала приводит к необходимости использования более мощных

источников излучения. В итоге возможность использовать их в рутинной экспериментальной практике *in vivo* сильно ограничена.

б. Отдельное место занимают индикаторы, чувствительный домен которых представляет собой химерный вариант между несколькими классами ПЧД. Так известны примеры создания химеры калиевого канала и фосфатазы (Bongwoori [31], Chimeric VSFP-ButterflyYR [71], Chimera-Cx [72]), успешно применявшийся в том числе на срезах мозга [73] и *in vivo* на бодрствующим мышам [74].

Особо стоит отметить, что описываемые здесь ГКИМП включают в себя исключительно полностью генетически кодируемые варианты, помимо них существует также группа гибридных хомогенетических ГКИМП, сочетающих в себе генетически кодируемую и синтетическую компоненты [75].

Однако поскольку применение в экспериментальной практике даже самых перспективных из описанных вариантов в основном носят единичный характер, вопрос поиска новых источников ПЧД, расширяющих репертуар доступных модулей для конструирования индикаторов мембранного потенциала, стоит довольно остро, наравне с мутагенезом существующих и попыткой создания межгрупповых гибридных вариантов. В ходе данной работы нами был предложен белок млекопитающих престин как источник нового потенциал-чувствительного ядра для разработки индикаторов на его основе.

1.6 Престин

Престин – мембранный белок млекопитающих, впервые был обнаружен в наружных волосковых клетках внутреннего уха монгольской песчанки *Meriones unguiculatus* [76]. Престин обладает уникальным свойством электроподвижности, обеспечивающей циклические движения наружных волосковых клеток. Помимо важной роли престина как компонента слухового анализатора, недавно было установлено, что он также участвует в рабочем цикле кардиомиоцитов [77].

В наружных волосковых клетках престин располагается в боковой мембране (плотность до ~ 7000 молекул/ μm^2 [78]) и придает клетке электромеханическую активность, циклы

растяжения-сжатия престины соответствуют сигналам деполяризации-реполяризации мембраны волосковых клеток. Таким образом, претин осуществляет преобразование электрического сигнала в механический. Одновременные конформационные подвижки множества молекул престины приводят к макроскопическим изменениям длины клеток. Эти изменения длины сказываются на механических свойствах базилярной мембраны, что лежит в основе усиления звуковых колебаний.

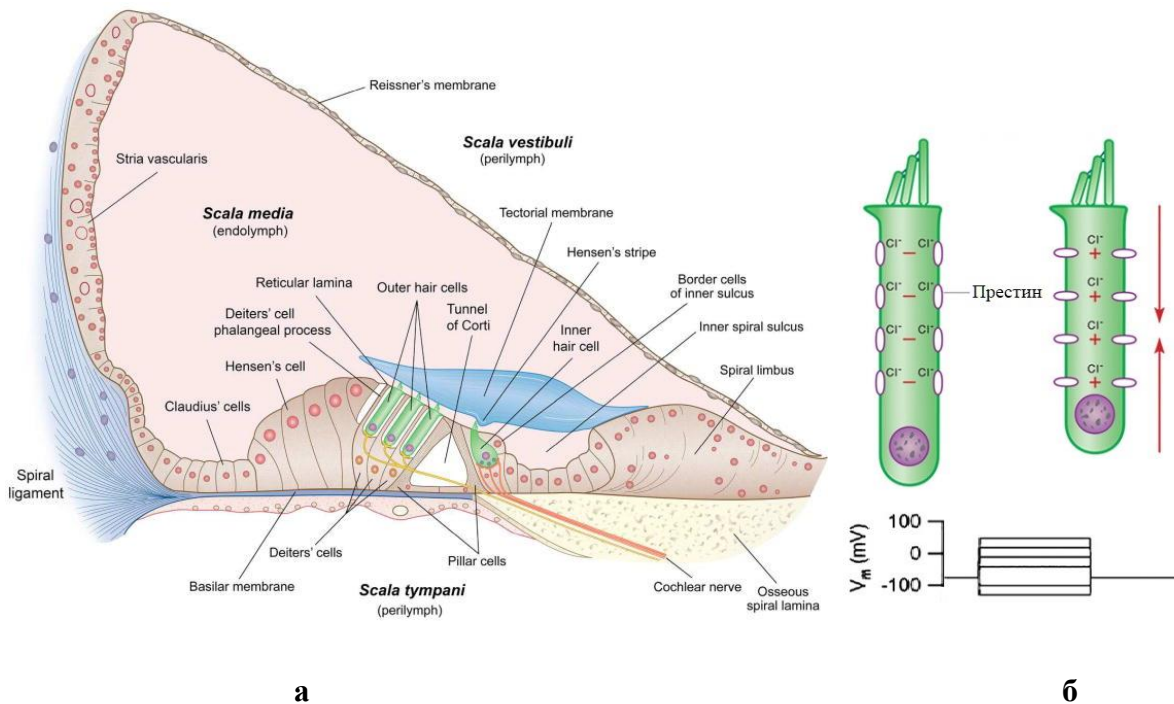


Рисунок 4. а) Кортиев орган и б) схематическое изображение укорочения наружной волосковой клетки при изменении потенциала мембраны, молекулы престины (белые овалы) располагаются в латеральной мембране [79].

Претин (SLC26A5) по структурной гомологии принадлежит к семейству SLC26 анионных транспортеров [76]. Претин млекопитающих состоит из 744 аминокислотных остатков (а.о.), для него, как большого трансмембранного белка, до недавнего времени не была получена пространственная структура. Лишь в 2021 году сразу двум научным группам удалось определить пространственную структуру престины и описать предположительный механизм, лежащий в основе явления электроподвижности [80; 81].

Структура человеческого и дельфиного претина была разрешена методом криоэлектронной микроскопии с разрешением 2.3Å и 3.3Å соответственно [80; 81]. По последним данным, в мембране претин формирует симметричный гомодимер, каждый протомер которого содержит трансмембранный домен (76-504 а.о.), N-концевой цитоплазматический домен (1-75 а.о.), а также C-концевой цитоплазматический STAS-домен (sulfate transporter and anti-sigma factor antagonist – переносчик сульфата и антагонист антисигма-фактора, 505–744 а.о.).

Трансмембранный домен претина состоит из 14 α -спиральных трансмембранных (ТМ) сегментов, организованный в структуру 7+7 с инвертированным повтором. Трансмембранный домен содержит коровую область (ТМ-сегменты 5-7 и 12-14) и гейтовую (ТМ-сегменты 1-4 и 8-11). Данные области осуществляют поступательные движения друг относительно друга, как это описано для механизма работы транспортеров элеваторного типа [82; 83].

Молекулярный механизм электроподвижности претина связан с наличием в его молекуле ряда заряженных остатков [80], которые ранее идентифицировались как влияющие на нелинейное емкостное сопротивление мембраны (NLC). NLC наружных волосковых клеток является одной из главных характеристик электроподвижности претина. Для записи NLC применяются стандартные электрофизиологические методики локальной фиксации потенциала. NLC представляет собой зависимость электрической емкости от напряжения, данная колоколообразная функция описывается с помощью распределения Больцмана [84].

Показано, что для реализации механизма электроподвижности претина необходимо присутствие анионов, особенно ионов Cl⁻. Предполагается, что ионы Cl⁻ выполняют функцию «внешнего» сенсора потенциала [85] или играют роль аллостерического модулятора [86]. При этом точное место связывания анионов молекулой претина ранее не было установлено. Мембранные белки с аналогичной структурой, например, UraA [87] и транспортеры UarA [88] несут свои субстрат-связывающие сайты между трансмембранными спиралями 3 и 10 в центральной полости, образуемой на стыке коровой и гейтовой областей молекулы. В молекуле претина, как видно из данных рентгеноструктурного анализа, эквивалентный сайт окружен положительно заряженными остатками – так называемые координирующие остатки (Q97, F101, F137, S398 и R399). Данные аминокислоты в значительной степени

консервативны внутри семейства транспортеров SLC26. Мутация любого из них в молекуле претина серьезно влияет на NLC [82; 83; 89]. Стабильное связывание анионов данной областью было подтверждено с помощью моделирования молекулярной динамики претина [81].

Явление электроподвижности и сопряженный с ним цикл растяжения-сжатия претина происходит с частотой до 80 кГц, что, в совокупности с чувствительностью этой молекулы к изменению мембранного потенциала, представляет интерес для разработки ГКИМП на его основе.

1.7 Репортерный домен генетически кодируемых индикаторов мембранного потенциала на основе GFP-подобных белков.

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) был впервые выделен из биолюминесцентной медузы *Aequorea victoria* [90]. Он проявляет ярко-зеленую флуоресценцию при возбуждении светом от ультрафиолетового до синего. GFP-подобные флуоресцентные белки были обнаружены и у других организмов, включая кораллы, актинии, веслоногих рачков и ланцетников [91]. Использование GFP-подобных белков в качестве биомаркеров произвело революцию в биологических исследованиях; широкое распространение в качестве инструмента молекулярной биологии GFP получил благодаря автокаталитическому процессу формирования хромофора, не требующего каких-либо дополнительных кофакторов или ферментов/субстратов, помимо молекулярного кислорода. GFP-подобные белки часто применяются в роли репортера экспрессии [28], а разнообразные модифицированные формы GFP являются основой для создания генетически-кодируемых индикаторов. Ген флуоресцентного белка можно ввести в организм транзистентно для временной экспрессии, а также он может быть сохранен в геноме для стабильной трансфекции.

Богатая палитра доступных исследователям вариантов флуоресцентных белков позволяет осуществлять многоцветное мечение и, как следствие, мультипараметрическую детекцию сигналов индикаторов, а также подбирать наиболее подходящие спектральные варианты под каждую экспериментальную задачу в отдельности [91]. Для исследований, предполагающих регистрацию сигнала в толще животных тканей, вариантом выбора оказываются главным

образом красные и дальнекрасные варианты ФБ. Длинноволновый свет меньше рассеивается и легче проникает в животные ткани, наибольшим поглощением в которых обладает меланин (200-600 нм), гемоглобин (450-600 нм) и вода (более 1100 нм). Таким образом, существует так называемое «окно прозрачности» животных тканей, в диапазоне от 600 до 1100 нм [92], спектральные варианты флуоресцентных белков из этого диапазона оптимальны для использования в качестве репортерных доменов генетически-кодируемых индикаторов.

1.7.1 Красные и дальнекрасные варианты флуоресцентных белков

Первым открытым красным флуоресцентным белком (RFP) является DsRed из актинии *Discosoma striata* [93],[94]. Механизм образования хромофорной группы для красных флуоресцентных белков отличается большей сложностью относительно хромофоров типа GFP, это происходит благодаря наличию в их химической структуре 1-3 дополнительных двойных связей. Многие RFP имеют DsRed-подобный хромофор, однако непосредственное прикладное применение DsRed было затруднено из-за низкой скорости созревания хромофора и его повышенной склонности к олигомеризации [93]. DsRed-подобный хромофор отличается от классического GFP-подобного дополнительной N-ацилиминной группой, которая образуется при окислении молекулярным кислородом связи C α -N остатка хромофора в 65 положении (Рис. 6). Было сделано предположение о нескольких возможных вариантах механизма автокаталитического формирования DsRed-подобных хромофоров. Наиболее вероятной, по существующим на текущий момент данным, является «модель разветвленного пути», но единого мнения по данному вопросу до сих пор нет [95],[96].

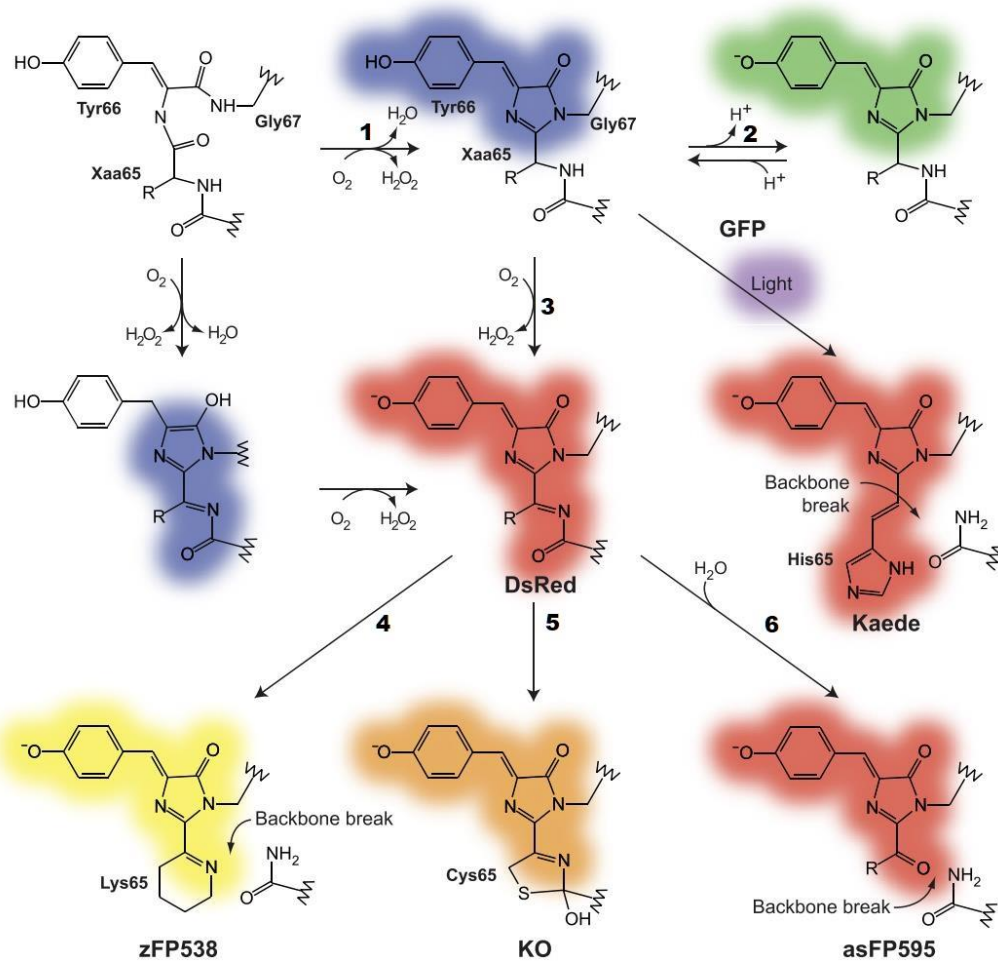


Рисунок 6. Структура и пути созревания хромофоров GFP-подобных белков [адаптация из [97]].

Все RFP в соответствии с максимумом эмиссии флуоресценции можно разделить на три группы: оранжевые ($\lambda_{em\ max} = 550 - 590$ нм), красные ($\lambda_{em\ max} = 590 - 630$ нм) и дальнекрасные ($\lambda_{em\ max} \geq 630$ нм).

Белок mRFP1 – мономерный вариант DsRed – направленный мутагенез которого позволил получить группу новых мономерных RFP с максимумом эмиссии флуоресценции в диапазоне 540-610 нм. Данная группа белков была названа «mFruits» (mBanana, mOrange, mHoneydew, mCherry, mTangerine и др.), по параметрам яркости и фотостабильности наиболее перспективными являются варианты mStrawberry, mOrang и mCherry – кандидаты на активное использование в качестве маркеров для изучения локализации белка, транспортировки и взаимодействий с другими клеточными структурами. [98]. Дальнекрасные

RFP начали активно разрабатываться начиная с открытия ФБ eqFP578 из анемона *Entacmaea quadricolor* [99]. Именно на основе eqFP578 был получен ФБ mKate (максимум поглощения 588 нм, эмиссии флуоресценции 635 нм). Высокая фотостабильность и яркость mKate, сходная с таковыми для mCherry, делают его надежным инструментом для визуализации *in vivo*. Полученный на его основе mKate2 (максимум поглощения 588 нм, эмиссии флуоресценции 633 нм), с яркостью в три раза больше чем у исходного mKate при схожих спектральных характеристиках, представляет, по нашему мнению, наибольший интерес для разработки молекулярных инструментов [100].

1.7.2 Характеристики белка FusionRed

Красный флуоресцентный белок FusionRed ($\lambda_{ex} = 580$ нм, $\lambda_{em} = 608$ нм) – супермономерный вариант mKate2, обладающий низкой токсичностью при экспрессии в клетках млекопитающих. FusionRed особенно хорошо показал себя в случае экспрессии с белками слияния (рис 7) [101].

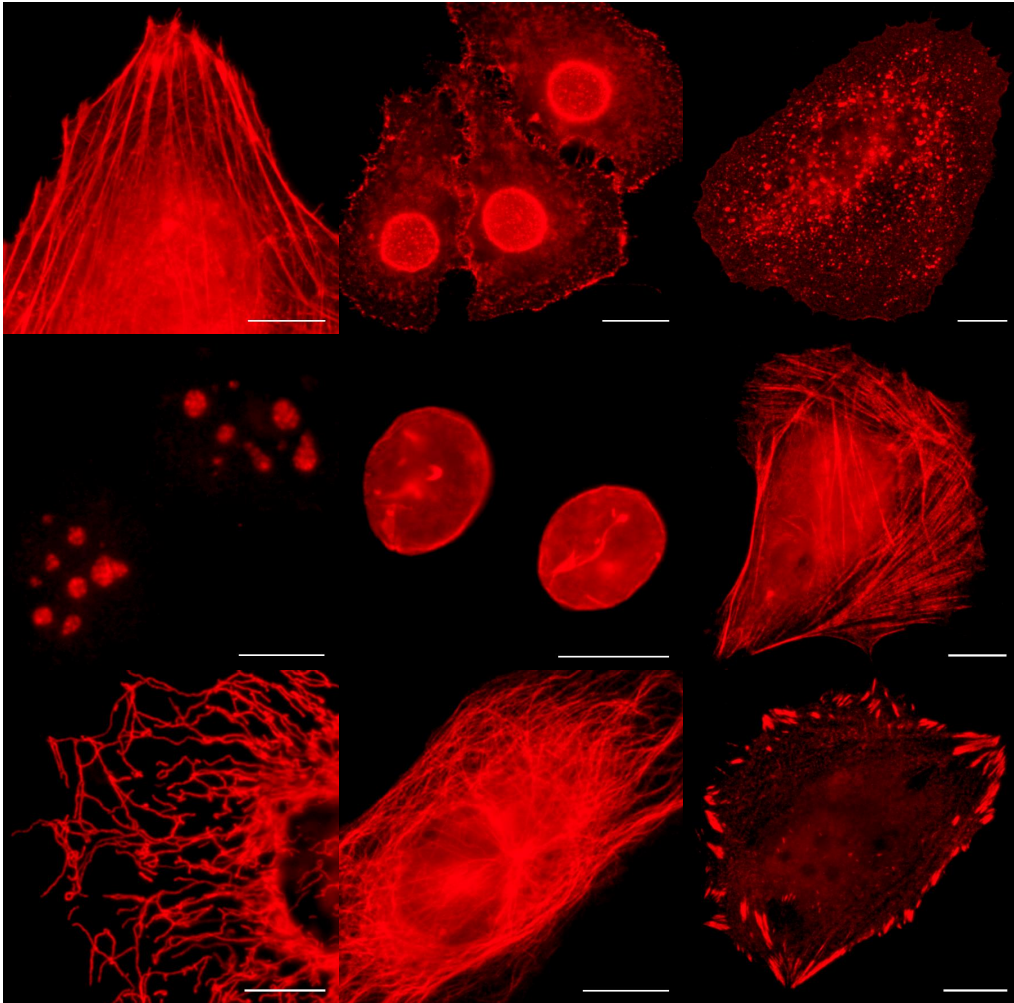


Рисунок 7. FusionRed используется для мечения белков в клетках млекопитающих (слева направо сверху вниз микрофотографии в конструкциях с белками бета-актином, аннексином, эндосомами, фибрилларинном, ламинином, миозином, PDHA1, альфа-тубулином и зиксином). Масштабные линейки 10 мкм [101].

Клетки млекопитающих, временно трансфицированные экспрессионными векторами FusionRed, демонстрируют яркую флуоресценцию через 10-12 часов после трансфекции. FusionRed не обладает остаточной тенденцией других мономерных RFP к димеризации при высокой концентрации и, по данным HPLC, ведет себя как чистый мономер при концентрациях до 10 мг/мл.

1.8 Циркулярное пермутирование

Для придания репортеру большей чувствительности к конформационным подвижкам связанного с ним чувствительного домена прибегают к подходу циркулярного пермутирования [27; 102]. При этом нативные N- и C- концы ФБ соединяются полипептидным линкером, а новые N'- и C'- концы создаются в непосредственной близости от хромофора (Рис.8). При такой оптимизации молекула становится более чувствительной к конформационным подвижкам слитых с ней доменов. Таким образом, сигнал индикатора на основе пермутированного варианта ФБ должен обладать большим контрастом, чем таковой у аналогичной конструкции с нативным ФБ в роли репортера.

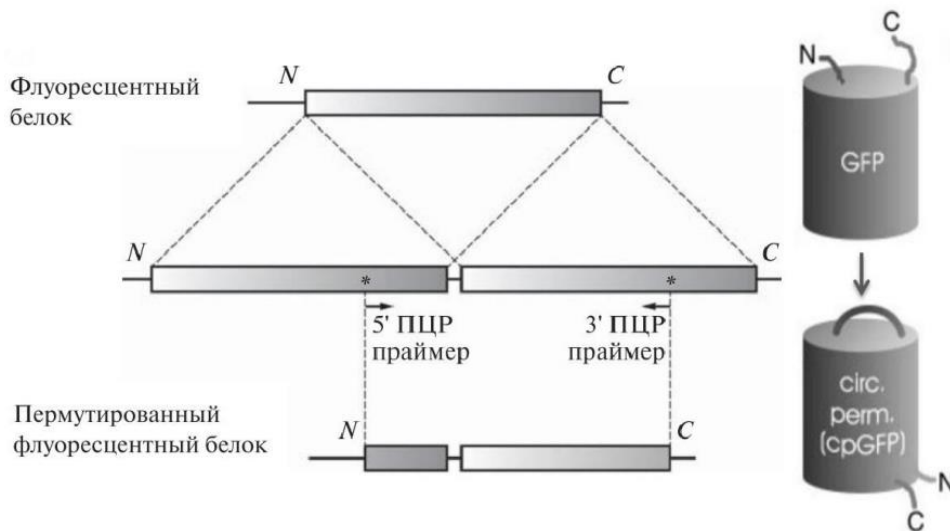


Рисунок 8. Схематическое изображение принципа циркулярной пермутации. Адаптировано из [103], [104], с изменениями.

Циркулярно пермутированные флуоресцентные белки, в силу удобства и эффективности их использования, активно применяются в составе индикаторов, что подтверждается наличием ряда широко используемых молекулярных инструментов, среди которых индикатор ионов кальция GCaMP [105], [106], [107], пероксида водорода HyPer [108], соотношения [NADH]:[NAD⁺] SoNar [109] и др.

2. Материалы и методы

2.1 Молекулярное клонирование

2.1.1 Амплификация ДНК

Амплификация ДНК-фрагментов проводилась в термоциклерах PTC-200 DNA Engine (MJ Research) и Thermal Cycler 2820 (Applied Biosystems). «Encyclo Plus PCR kit» и «Tersus Plus PCR kit» (Евроген) использовали в соответствии с протоколом производителя. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала смесь термостабильных ДНК-полимераз, праймеры (0,2 мкМ), dNTP (0,5 мкМ), H₂O mQ и матричную ДНК (не менее 5 нг). Для амплификации большинства матриц проводилась предварительная денатурация ДНК при 95°C, гибридизация праймеров при 60°C.

2.1.2 Случайный ПЦР-мутагенез

Случайный ПЦР-мутагенез для улучшения яркости и скорости созревания пермутированных вариантов проводился в специализированном буферном растворе, в котором прогнозируемо снижается точность работы ДНК-полимеразы. Использовали Diversity PCR Random Mutagenesis набор (Clontech) для случайного ПЦР-мутагенеза. Амплифицировали Taq-полимеразой (оптимальные условия для возникновения 7 мутаций / 1000 п.о.). Полученная библиотека вариантов проходила скрининг при экспрессии в *E.Coli*, наиболее быстро созревающие и яркие варианты далее анализировались на наличие оптимизирующих мутаций.

2.1.3 ПЦР-скрининг

Для скрининга бактериальных колоний методом ПЦР использовали реакционную смесь «ScreenMix» (Евроген). Реакционная смесь готовилась в соответствии с протоколами производителя, в нее добавлялись специфические праймеры (0,2 мкМ) и биомасса клеток анализируемых колоний. Пары праймеров подбирались таким образом, чтобы один был комплементарен последовательности гена, а другой – вектора.

Для скрининга вариантов конструкции Prestin-5 с различными составами N-концевого аминокислотного линкера использовали полимеразу SNP-detect (Евроген). SNP-detect является модифицированной Taq-полимеразой, используемой для детекции аллельных полиморфизмов и аллель-специфичной амплификации фрагментов ДНК. Специфичность амплификации обеспечивается благодаря тому, что присоединение нуклеотидов полимеразой к 3'-концу праймера происходит только при полном связывании праймера на 3'-конце. Необходимость использования полимеразы SNP-detect для скрининга на данном этапе работы обусловлена различием вариантов конструкции Prestin-5 на 1-2 аминокислоты. Оптимизацию условий проведения амплификации выполняли по протоколу производителя.

2.1.4 Электрофорез в агарозном геле

Контроль чистоты ПЦР-продукта и анализ длины фрагментов проводился с помощью электрофореза в 1,2% агарозном геле в камерах для горизонтального электрофореза Bio-Rad и Helicon, для заливки геля использовали 1% TAE-буфер (40мМ трис-ацетат pH 7,6, 1мМ EDTA) с бромистым этидием (конечная концентрация 0,5 мкг/мл), ток 100 – 170 мА. Образцы ДНК (0,5 – 2 мкл) вносились в лунку вместе с буфером для нанесения 6х Orange DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific). В качестве маркера длины использовали 100bp и 1kb DNA Ladder (Евроген). Визуализация результатов электрофореза осуществлялась с использованием прибора G:BOX F3 (Syngene).

2.1.5 Выделение плазмидной ДНК

Выделение проводилось наборами «Plasmid Miniprep» и «Plasmid Midiprep 2.0» (Евроген). Клетки *E. coli*, содержащие плазмидную ДНК, вносили в аликвоту (5 мл) среды LB (1% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 0,1% NaCl; 0,01 мМ Трис-НСl pH 8,0) с антибиотиком, ген устойчивости к которому заложен в векторе. Инкубация клеток в течение 16–20 часов при температуре 37°C происходила при активном перемешивании (200 об/мин) в шейкер-инкубаторе New Brunswick Excella E25 (Eppendorf). Выделение ДНК осуществляли по протоколу производителя, центрифугировали в настольной центрифуге MiniSpin (Eppendorf). Концентрация полученной плазмидной ДНК определялась с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Набор «Plasmid Midiprep 2.0»

использовался для выделения высокоочищенной плазмидной ДНК из культуры клеток *E. coli* в количестве до 500 мкг. Данный вид очистки позволяет получить образцы ДНК, демонстрирующие большую эффективность трансфекции в клетки эукариот. Для выделения данным набором клетки *E. coli* выращивали 16–20 часов при 37°C и активном перемешивании 200 об/мин в шейкер-инкубаторе New Brunswick Excella E25 (Eppendorf) в жидкой среде LB объемом 200 мл, содержащей специфический для данного вектора антибиотик. Выделение проводилось в соответствии с рекомендациями производителя. Центрифугирование осуществлялось в охлаждаемой центрифуге Heraeus Multifuge 3 S-R при температуре 4°C (Thermo Fisher Scientific). После элюции плазмидной ДНК с колонки проводили преципитацию ДНК этанолом. К образцу добавляли 3М ацетата натрия pH 5.2 до конечной концентрации 0,3М и 3 объема этанола (96 %). Центрифугирование в течение 10 мин при 13 000 об/мин проходило в настольной центрифуге MiniSpin. Удаляли супернатант, результирующий осадок дважды промывали 0.5 мл 70% этанола. Далее осадок высушивали и повторно растворяли в необходимом объеме воды (mQ). Концентрацию полученной плазмидной ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000.

2.1.6 Очистка ДНК

Продукты ПЦР и фрагменты полученные при рестрикции ДНК очищали, используя набор Cleanup Mini (Евроген), в соответствии с протоколом производителя. Также использовали метод преципитации этанолом, описанный выше.

2.1.7 Рестрикция

Рестрикция в большинстве случаев проводилась эндонуклеазами рестрикции серии FastDigest (Thermo Fisher Scientific). Реакционная смесь содержала эндонуклеазы рестрикции FastDigest, фирменный буфер 10x FastDigest Green Buffer, ДНК (200 нг – 1 мкг), воду степени очистки milliQ. Реакционную смесь инкубировали 15-30 мин при 37°C. ДНК-фрагменты разделялись методом электрофореза в агарозном геле, далее происходила очистка целевых фрагментов ДНК.

Также в реакциях использовались буферы и эндонуклеазы рестрикции производства New England BioLabs и SibEnzyme. В объеме 50 мкл смешивали очищенный на колонке фрагмент

ДНК (150-300 нг), 5 мкл рестриктоного буфера, 100xBSA (если этого требует выбранная рестриктаза) и H₂O mQ. Пробы инкубировали 1,5 часа при 37°C. Инкубация при 37°C проводилась в термостате «Термит» (ДНК-технология).

2.1.8 Лигирование

В реакции лигирования использовались ДНК-лигаза фага T4 (Evrogen или Promega). В объеме 10 мкл смешивали линейризованный рестриктазами вектор и обработанную соответствующими рестриктазами вставку в соотношении 1:3 – 1:10 избыток вставки варьировался в зависимости от длин фрагментов. Лигазную смесь инкубировали при 14°C в охладителе проб SC2D, (Biosom) в течение ночи, в ряде случаев лигирование проводили при комнатной температуре в течение 1,5 – 2 часов.

2.1.9 Метод «Golden Gate»

Модульное клонирование «Golden Gate» [110] применялось для создания химерных конструкций с инсерцией *срFR189-188* в петельные области трансмембранного домена претина. Принцип метода заключается в использовании эндонуклеаз рестрикции типа IIS, сайт расщепления которых удален от сайта узнавания. Образующиеся в результате рестрикции ДНК-фрагменты имеют «липкие» концы, соединяются в строго определенной последовательности. Лигирование ДНК-фрагментов осуществляется с помощью T4 ДНК-лигазы. При этом реакции рестрикции и лигирования протекают циклически в единой реакционной смеси, это возможно благодаря удалению сайта узнавания используемой эндонуклеазы рестрикции типа IIS, происходящему в процессе реакции. Эндонуклеазы рестрикции BsaI и BpiI (Thermo Fisher Scientific) использовались поочередно для последовательных этапов сборки модулей транскрипционной единицы. Это возможно благодаря наличию упорядоченных сайтов рестрикции, заложенных в вектор разработчиками метода.

2.1.10 Анализ нуклеотидной последовательности ДНК

Нуклеотидные последовательности ДНК определяли методом прямого секвенирования по Сэнгеру на автоматическом секвенаторе CEQ 2000 DNA Analysis (коммерческая фирма

Евроген). Анализ полученных последовательностей осуществляли в программе SeqMan и с помощью алгоритмов онлайн-ресурса benchling.com.

2.1.11 Выделение белков из культуры *E. coli*

Для выделения белков использовалась культура бактерий *E. Coli* (штамм XL1-Blue). Культивирование в среде LB происходило в течение 16 часов в шейкере (New Brunswick Scientific Incubator Exella E25) при температуре 37°C при активном перемешивании для достижения эффективной аэрации (интенсивность перемешивания 200 оборотов в минуту). Полученный центрифугированием ночной культуры (20 минут, 4500g, +4°C, центрифуга Heraeus MULTIFUGE 3 S-R), осадок ресуспендировался в 2 мл 100 мМ Трис-НСl (рН7,56) и подвергался ультразвуковой обработке (соникатор SONICS VUBRA CELL, 5 минут во льду, рабочий цикл: активность on – 15 секунд, пауза off – 30 секунд, амплитуда 30%). Полученная суспензия центрифугировалась в течение 20 минут при 4500g (Heraeus MULTIFUGE 3 SR). Под флуоресцентным бинокуляром оценивали относительную интенсивность флуоресценции осадка к супернатанту, при интенсивности флуоресценции осадка равной интенсивности флуоресценции супернатанта процедуру ультразвуковой обработки проводили повторно, пока интенсивность флуоресценция осадка не достигала нуля (на этой стадии оценивали визуально, без применения методов количественного анализа). По окончании ультразвуковой обработки супернатант переносили в новую пробирку, и ресуспендировали с 2 мл носителя Talon (Clontech) (предварительно отделенного от спирта и промытого 100 мМ трис-НСl рН 7,56 дважды). Для посадки белка на носитель пробу помещали на ротатор на 10 минут, после чего центрифугировали (2 мин., 1500 g, центрифуга Heraeus MULTIFUGE 3 S-R). Далее мы сравнивали интенсивность флуоресценции осадка и надосадочной жидкости под бинокулярным микроскопом: интенсивность флуоресценции осадка должна быть значительно выше, чем надосадочная жидкость. При необходимости добавляли дополнительный 1 мл Talon и процедуру повторяли. Talon+белок хранился в 100 мМ Трис-НСl, рН 7,56 при температуре +4°C.

2.2 Спектроскопия

2.2.1. Оценка спектров поглощения

Выделенные белки проходили процедуру измерения спектров поглощения на спектрофотометрах NanoDrop 2000 (Thermo scientific) и Cary 100 BioUV-Vis. NanoDrop позволяет проводить измерение спектров белкового элюата в объеме 1 мкл. Для измерения спектров поглощения с помощью спектрофотометра Cary 100, элюат белка разводили в 500 мкл буфера (100 mM Трис-HCl, pH7,56).

2.2.2. Измерения молярного коэффициента экстинкции

Измерения молярного коэффициента экстинкции белков проводили в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4, GIBCO) на спектрофотометре Cary 100 BioUV-Vis. Для этого мы проводили нормировку на количество зрелого хромофора белка FusionRed, денатурированного 1M NaOH (описано ранее в работе [101]).

2.2.3. Расчет квантового выхода флуоресценции

Квантовый выход флуоресценции измеряли на флуоресцентном спектрофотометре Varian Cary Eclipse, показатель рассчитывался относительно стандарта (для FusionRed квантовый выход составлял 0.19 [101]).

2.3 Работа с культурами клеток

2.3.1 Трансформация прокариотических клеток

Для трансформация методом электропорации (электропоратор MicroPulser, кюветы BioRad) к 40 мкл компетентных клеток *E. coli* штамма XL1 Blue добавляли 7 мкл лигазной смеси, очищенной переосаждением или Cleanup Mini (Евроген). После трансформации клетки вносили в 1 мл стерильной среды SOB. Суспензию бактерий инкубировали в течение часа на 37°C при интенсивном перемешивании для начала экспрессии гена устойчивости к антибиотику. 1/10 объема клеток высевалась на чашки Петри с агаризованной средой LB, содержащей соответствующий антибиотик. Чашки инкубировались при 37°C в течение

ночи.

Для химической трансформации использовались также компетентные клетки *E. coli* штамма XL1 Blue. К 100 мкл клеток добавлялись 0,01-0,1 мкг лигазной смеси или плазмидной ДНК. Клетки инкубировали с ДНК в течение 20 мин на льду, далее 4 мин при температуре 42°C, и вновь помещались на лед на 1-2 мин. После процедуры теплового шока к ним добавлялись 200 мкл теплой стерильной среды SOB. Суспензия инкубировалась при 37°C в течение 30-60 мин. при постоянном перемешивании. Далее высевали от 100 мкл до 1 мл суспензии на чашки Петри с агаризованной средой LB. Рост колоний шел при 37°C в течение ночи.

2.3.2 Ведение и трансфекция клеток НЕК293Т

Клетки линии НЕК293Т [111] из клеточной коллекции ИБХ РАН культивировались в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с 10% эмбриональной бычьей сывороткой (Sigma, США) при 37°C в атмосфере 5% CO₂ на 35 мм чашках Fluorodish (WPI, США). Трансфекция проводилась с помощью реагента FuGene 6 и HD (Promega, США) согласно протокола производителя. Для проведения функционального тестирования методом patch-clamp клетки высаживались на покровные стекла диаметром 8 мм и толщиной 0.08-0.13 мм, предварительно размещенные в 24-луночный планшет.

2.3.3 Ведение клеток PC12

Клеточная линия феохромоцитомы крысы PC12 [112] была взята из коллекции клеточных линий Института Биоорганической Химии РАН. Клетки PC12 происходят из хромоаффинной опухоли мозгового вещества надпочечников крысы. PC12 может оставаться в подобном стволовым клеткам состоянии и характеризоваться суспензионным культивированием и активной пролиферацией, или дифференцироваться в нейроноподобные клетки, которые прикрепляются к субстрату и образуют дендритоподобные структуры. Дифференциация обычно индуцируется добавлением нейронального ростового фактора NGF. Хотя дифференцированные PC12 не эквивалентны взрослым нейронам, они, тем не менее, представляют собой популярную модельную систему для нейрофизиологии, сочетающую нейроноподобный фенотип с относительно простыми протоколами культивирования.

Клетки хранятся в резервуаре с жидким азотом, из азота клетки быстро размораживаются на водяной бане при 37°C при постоянном перемешивании в течение 2 минут. После размораживания аликвоту переносится коническую пробирку на 15 мл, содержащую 9 мл «полной» культуральной среды RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), содержащей 16% лошадиной сыворотки (Gibco) и 5% FBS (Sigma-Aldrich). Клетки центрифугируют со скоростью 1250 об/мин в течение 5 минут, далее супернатант удаляется и клеточный осадок повторно ресуспендируется в 15 мл свежей полной культуральной среды, после чего высевается на культуральные чашки. Смена среды производится раз в сутки. После того, как клетки достигли плотности примерно 80%, культуральная среда удаляется и к клеткам добавляется 10 мл свежей полной среды. Используется скребок для клеток, чтобы осторожно поднять клетки с планшета. Дифференцировка: удаляется полная культуральная среда и заменяется дифференцирующей средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), содержащей 1% лошадиной сыворотки (Gibco), 1% Pen-Strep (Invitrogen) и 100 нг/мл NGF (Gibco).

2.3.4 Трансфекция клеток PC12

Трансфекция методом нуклеофекции проводилась на электропораторе Lonza, программа U-010. После трансфекции мы проводили рассев клеток на 24-луночные планшеты с помещенным в них покровным стеклом и индуцировали добавлением NGF.

2.4 Микроскопия

Первичная оценка эффективности трансфекций проводилась на флуоресцентном микроскопе ZOE Fluorescent Cell Imager (BioRad). ZOE Fluorescent Cell Imager оснащен тремя флуоресцентными каналами, встроенной цифровой камерой, объективом с 20x увеличением, монохромной CMOS-камерой в качестве детектора сигнала.

Первичное тестирование полученных конструкций в эукариотических клетках линии HEK293T, а именно определение интенсивности флуоресцентного сигнала и локализации экспрессируемых химерных белков, проводилось на цифровом флуоресцентном микроскопе BioRevo BZ-9000 (Keyence) с использованием светофильтров TxRed (возбуждение 562/40, эмиссия 624/40) и GFP BP (возбуждение 472,5/30, эмиссия 520/35). BioRevo BZ-9000 оснащен оптической системой Nikon CFI 60 (2x – 100x диапазон увеличений объективов), системой

четырёх флуоресцентных каналов, ртутной лампой 120W в качестве источника света и монохромной CCD-камерой в качестве детектора сигнала. Детекцию флуоресцентного сигнала проводили во встроенной программе BZ-II Viewer. Поиск поля зрения осуществлялся с использованием функции “binning” (2x2, 4x4), объединяющей сигнал от соседних пикселей CCD-камеры, что позволяло уменьшить фотообесцвечивание флуорофоров. Использовали значение коэффициента усиления “gain” +12dB. По времени экспозиции возбуждающим светом оценивали интенсивность флуоресценции. При значениях экспозиции короче 1/100с определяли уровень флуоресцентного сигнала как “высокий”, от 1/100 до 1/2 с – как “средний”, длиннее 1/2 с – как “низкий”. Основными критериями первичного тестирования считали уровень флуоресцентного сигнала и локализацию химерного белка в клетках линии НЕК293Т. Для конструкций со средним и высоким уровнем флуоресцентного сигнала, сосредоточенного на клеточной мембране, проводили функциональное тестирование на наличие индикаторных свойств.

Для бимолекулярных вариантов, а также Prestin-EGFP и Prestin-5, микроскопия проводилась с помощью флуоресцентного инвертированного микроскопа AF6000 (Leica) с иммерсионным масляным объективом HCX PL APO lbd. BL 63 × 1.4NA, цифровым ПЗС-регистратором Photometrics CoolSNAP HQ и ртутной лампой 120W HXP (Osram) в качестве источника света. CCD камера Photometrics Cool-SNAP HQ (США). Сигналы зелёной и красной флуоресценции детектировались с помощью стандартного набора светофильтров GFP (возбуждение BP470/40, эмиссия BP525/50) и mCherry-T (возбуждение BP560/40, эмиссия BP630/75).

Яркость сигнала при экспрессии в клетках эукариот линии НЕК293Т измеряли с помощью программного обеспечения Leica LAS AF. Для каждого флуоресцентного белка проводилось 3 независимых эксперимента с регистрацией сигнала от 40–50 клеток для каждого варианта. Все эксперименты проводилась спустя 48 часов после трансфекции.

2.5 Метод локальной фиксации потенциала

Для тестирования чувствительности полученных конструкций к изменению потенциала мембраны, проводилась регистрация потенциала мембраны с использованием микроэлектродов и одновременной регистрацией флуоресценции.

Измерения проводились в сотрудничестве с двумя группами коллабораторов.

1. Протокол методики, предоставленный Е.С. Никитиным (Институт ВНД РАН, Лаборатория клеточной нейробиологии обучения, Москва).

В работе использовали методы конфокальной микроскопии с применением лазерного сканирующего микроскопа LSM 5 live (Zeiss, Германия), возбуждающие линии лазеров 405, 488 и 532 нм, полоса пропускания 500-540 нм, 550LP или 650LP (low pass). Данные обрабатывали на программном обеспечении ZeissAIM 4.2. Для конфокальной микроскопии использовали объектив х63 W.I. NA 1.0 IR DIC (Zeiss). Наведение и манипуляции с пэч-электродами проводили в инфракрасном проходящем свете с использованием DIC, инфракрасной видеокамеры и монитора. Для регистрации культуральный раствор замещали на стандартный ACSF (artificial cerebrospinal fluid – искусственная цереброспинальная жидкость) следующего состава: 125 мМ NaCl, 25 мМ NaHCO₃, 27.5 мМ глюкозы, 2.5 мМ KCl, 1.25 мМ NaH₂PO₄, 2 мМ CaCl₂ и 1.5 мМ MgCl₂ (все Sigma), pH 7.4, преаэрированный 95% O₂, 5% CO₂.

Внутриклеточный пэч раствор: 132 мМ К-глюконат, 20 мМ KCl, 4 мМ Mg-АТФ, 0.3 мМ Na₂GTP, 10 мМ Na-Phosphocreatine, 10 мМ HEPES, pH 7.25 (все Sigma). Усиление сигнала (внутриклеточный усилитель Axoclamp 2B (Axon Instruments, USA)) проводили в режиме фиксации потенциала. Автоматически отфильтровывали при этом сигнал с полосой пропускания 0-500 Гц. В роли индифферентного электрода использовали хлорсеребряный электрод. Аналоговый сигнал после усиления преобразовывали в цифровую форму (в отдельном канале АЦП Digidata 1440A, Molecular Devices, USA). Сопротивление заполненного пэч-электрода составляло 5 МОм.

Измерения проводились на клетках линии PC12 в перфузионной камере с температурой перфузионного раствора 37°C.

2. Часть измерений проводилась Уной Санг, (лаборатория Лоуренса Коэна, KIST, Корея, Сеул). Описание оборудования и методики приведены ниже.

Измерения проводились на эукариотических клетках линии НЕК293, использовалась перфузионная камера, температура перфузионной жидкости 33°C, состав: 120 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgSO_4 , 10 mM HEPES, 2.2 mM CaCl_2 , и 1.8 мг/мл D-глюкозы, pH 7.4. Использовали 3–5 MΩ стеклянные пэтч-электроды (заготовкой для микроэлектродов служит стеклянный капилляр диаметром 1.5/0.75 мм (OD/ID-World Precision Instruments, FL), которые изготавливались вытягиванием и разрывом нагретого капилляра на специальном приспособлении — пуллере (микрокузнице) (P-97 Flaming/Brown type puller, Sutter Instrument Company, CA). Состав раствора электролита для микроэлектрода 120 mM К-аспарат, 4 mM NaCl, 4 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 10 mM EGTA, 3 mM Na_2ATP и 5 mM HEPES, pH 7.2. Voltage-clamp регистрация сигнала проводилась в конфигурации «whole-cell» («англ. целая клетка») и была осуществлена с использованием Patch Clamp PC-505B усилителя (Warner Instruments, CT). Ступеньки подаваемого потенциала были от -70 мВ до -170 мВ, -20 мВ, 30 мВ, и 130 мВ, продолжительность каждой ступеньки 100 мс использовался инвертированный микроскопом Olympus IX71 с масляным иммерсионным объективом Olympus UPLANSAPO 60x/1.35 NA и ксеноновой дуговой лампой XBO 75 W/2 OFR (OSRAM).

Фильтры:

- Для конструкций VSD76-73, VSD-FR189-188: 562/40, 593Di, 641/75;
- Для Butterfly1.2: 500/24, 520 Di (микроскоп), 550/60, 645/75, 600 Di (ADSL фильтр: Cairn OptosplitII)

3. Результаты и их обсуждение

Разработка индикатора на основе флуоресцентного белка (ФБ) включает в себя подбор и оптимизацию каждого из доменов (чувствительного и репортерного) в отдельности и их сочетания в составе целой химерной молекулы.

3.1 Циркулярно пермутированные варианты белка FusionRed

В рамках первого этапа работы (конструирования флуоресцентного ядра индикатора) нами был выбран красный флуоресцентный белок FusionRed. Для использования в топологической схеме “insertion into cpFP” необходимо было разработать циркулярно пермутированные и бимолекулярные варианты этого белка. В ходе исследования в нашей лаборатории был сконструирован набор из 23 пермутированных вариантов FusionRed (cpFR). Используемый нами подход к циркулярной пермутации основан на создании tandemных повторов гена ФБ, в которых 5'-конец второй копии гена соединяется с 3'-концом первой копии гена по принципу “голова-хвост” олигонуклеотидным линкером (в нашем случае линкер кодировал аминокислотную последовательность GGTGGS) и далее амплифицируются парой специфических праймеров. Исходя из имеющихся данных о трехмерной структуре белка mKate [113], были выбраны 23 точки пермутации. Их можно разделить на две группы. Первая группа – 12 вариантов с разрывом в петлевых участках полипептидной цепи: 75-74, 76-73, 87-85, 150-151, 152-151, 167-166, 168-167, 169-168, 189-188, 167-167, 167-168, 168-168; вторая группа из 11 вариантов несла разрыв β -тяжа, вплотную примыкающего к фенольному кольцу хромофора (нумерация по mKate): 142-141, 143-142, 144-143, 145-144, 142-142, 142-143, 142-144, 143-143, 143-144, 144-144, 150-149. В нумерации пермутированных вариантов первое число соответствует номеру последнего аминокислотного остатка N-концевой части белка, второе число – номеру первого аминокислотного остатка C-концевой части белка. Из всех вариантов генно-инженерных конструкций при экспрессии в *E. coli* 11 пермутированных вариантов (в том числе все варианты с разрывом β -тяжа), не обладали флуоресценцией. Что говорит о значительном нарушении фолдинга и/или процесса формирования их хромофорной группы при таких модификациях. 12 других вариантов демонстрировали детектируемый уровень флуоресцентного сигнала (Таблица 2) различной интенсивности.

Таблица 2. Относительная яркость и скорость созревания пермутантов FusionRed.

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

Квантовый выход красной флуоресценции при возбуждении 574 нм измеряли с использованием FusionRed в качестве эталонного стандарта. Коэффициенты экстинкции были измерены методом денатурированного щелочью хромофора. Относительную яркость хромофора (коэффициент экстинкции * квантовый выход) сравнивали с FusionRed (100%). Скорость созревания измеряли путем сравнения яркости колоний *E.coli* за 24 часа инкубации при 37°C с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop CS5. «-» – показывает отсутствие детектируемого флуоресцентного сигнала после 24 часов инкубации при 37 ° C, «++++» – высокий уровень флуоресценции, «+++» – средний уровень флуоресценции и «+» – низкий уровень флуоресценции. срFR варианты, которые не показаны в этой таблице, не имели детектируемого флуоресцентного сигнала через 48 часов при 37°C.

* – срFR76-73 R126I представляет собой оптимизированный вариант срFR76-73, который имеет улучшенную яркость и скорость созревания благодаря замене R126I, введенной во время случайного ПЦР-мутация.

При этом большая часть пермутированных белков демонстрировала низкую скорость созревания, для полного созревания приходилось прибегать к инкубированию в течение нескольких дней, что неприменимо при дальнейшем использовании инструментов на основе таких ФБ. Таким образом, были отобраны два варианта характеризующиеся минимальным временем созревания и релевантной яркостью при экспрессии в *E. coli* – срFR76-73 и

срFR189-188. Полученные белки обладали спектральными характеристиками сходными с исходным FusionRed (максимум возбуждения при 573 – 577 нм, максимум эмиссии при 603–606 нм), однако квантовый выход флуоресценции был несколько снижен (таблица 3).

Таблица 3. Спектральные свойства белка FusionRed и его производных, циркулярно перемутированных вариантов срFR76-73 и срFR189-188.

Название белка	Максимум поглощения, нм	Максимум эмиссии, нм	Молярный коэффициент поглощения, М ⁻¹ см ⁻¹	Квантовый выход флуоресценции и	Относительная яркость флуоресценции
FusionRed	574	603	95500	0.19	1,00
срFR76-73	573	603	76000	0.10	0,42
срFR189-188	577	606	109000	0.14	0,84

3.2 Бимолекулярные варианты белка FusionRed

Далее мы сконструировали и протестировали бимолекулярные варианты, соответствующие перемутированным вариантам срFR76-73 и срFR189-188. Для этого были созданы последовательности, кодирующие N- и C-концевые фрагменты FusionRed под контролем двух одинаковых промоторов.

Для экспрессии бимолекулярных вариантов в клетках эукариот, мы использовали вектор pAqMHalvesZip1 (предоставлен Д.Щербо) с двумя одинаковыми промоторами CMV, аналогичный описанному в работе [114]. Плазмида pFR76-73-zip содержала последовательности фрагментов FusionRed 1-76 и 73-232; плазмида pFR189-188-zip – фрагменты 1-189 и 188-232. Для ассоциации пар фрагментов FusionRed были использованы мотивы “лейциновых молний” (leucine zippers). Данные мотивы способны к спонтанной

гетеродимеризации и являются классическими димеризующими агентами для реассоциации бимолекулярных вариантов флуоресцентных белков [115],[116] (плазмидные векторы pFR76-73-zip и pFR189-188-zip).

Под контроль первого промотора помещали фрагмент, кодирующий С-концевую часть FusionRed (а.о. 73-232 или 188-232), соединенную с С-конца с последовательностью лейциновой молнии CZ. Под контролем второго промотора располагали N-концевую часть FusionRed (а.о. 1-76 или 1-189), с N-конца соединенную с кодирующей последовательностью лейцинового zipper NZ (Приложение 7.2, рис. 33). Полученные генно-инженерные конструкторы были транзientно экспрессированы в клетках линии HEK293T. В случае обеих конструкций, клетки проявляли хорошо детектируемый уровень флуоресценции. Яркость флуоресцентного сигнала клеток с бимолекулярным вариантом FR189-188-zip была схожа с таковой для клеток с исходным белком FusionRed (Рис. 9). Вместе с тем, FR76-73-zip демонстрировал сниженную более чем в 5 раз интенсивность флуоресценции относительно исходного белка FusionRed. В качестве контроля отсутствия самопроизвольной реассоциации сплит-фрагментов использовали конструкции без фрагментов, кодирующих лейциновые молнии NZ и CZ. Варианты без лейциновых молний при тех же условиях экспрессии не проявляли детектируемой флуоресценции.

Таким образом, мы получили бимолекулярный вариант белка FusionRed с разрывом по 188-189 положениям (FR189-188), который обладает рядом свойств, удобных для его практического использования. В отличие от большинства описанных ранее бимолекулярных вариантов красных флуоресцентных белков, FR189-188 способен реассоциировать и формировать хромофор при 37°C, что делает возможным его применение в клетках млекопитающих. При этом по интенсивности флуоресценции FR189-188 не уступает исходному белку FusionRed, что свидетельствует о высокой эффективности ассоциации фрагментов и созревания красного хромофора. Наконец, FR189-188 не имеет склонности к самопроизвольной реассоциации в отсутствие димеризующих доменов (лейциновых молний в нашем случае).

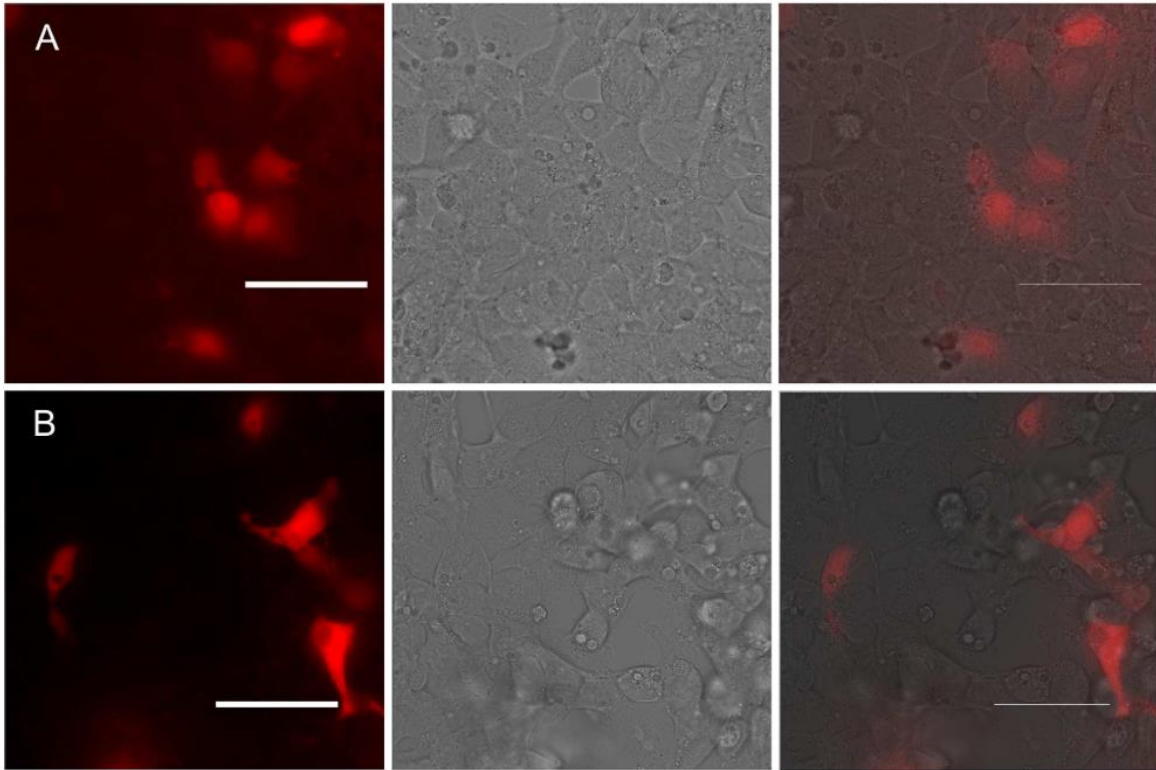


Рисунок 9. Клетки HEK293T, временно трансфицированные (A) FR76-73-zip и (B) FR189-188-zip. Левая панель – флуоресцентные изображения, центральная панель – соответствующие изображения в проходящем свете, правая панель – наложение. Масштабная линейка 50 мкм.

3.3 Создание новой топологической комбинации ГКИМП на основе бимолекулярного варианта белка FusionRed

Для разработки новой конструкции индикатора мембранного потенциала, мы решили использовать ранее не применявшуюся для ГКИМП топологическую схему вставка в циркулярный пермутант ФБ “insertion into cpFP” описанную выше (раздел 1.2.2.h). Мы предположили, что новый для ГКИМП дизайн будет способствовать более тонкому взаимодействию функциональных доменов индикатора, что положительно скажется на его рабочих характеристиках (скорость, контраст). Среди прочих хорошо описанных белковых топологий, ранее использовавшихся в молекулярных сенсорах, эта конструкция заслуживает особого интереса. Здесь, в отличие от типичного сенсора на основе cpFP, полипептидная цепь ФБ разделяется на два фрагмента инсерцией ПЧД, новые концы ФБ не соединены с

чувствительным доменом, а могут свободно взаимодействовать друг с другом с образованием зрелого флуоресцентного белка. Этот принцип похож на повторную ассоциацию бимолекулярных вариантов ФБ, используемый в технике бимолекулярной флуоресцентной комплементации (BiFC [117]), однако в этом случае соединение частей ФБ происходит внутримолекулярно. Потенциал-чувствительный домен в цикле своей работы претерпевает значительные конформационные подвижки, существенно изменяя относительные пространственные положения своих концов, поэтому мы предположили, что топология сенсора, активно задействующая оба конца чувствительного домена, может быть более эффективной, чем «классическое» последовательное соединение cpFP-VSD, где задействован только один конец полипептидной цепи чувствительного и репортерного доменов.

Для создания индикатора бы выбран трансмембранный ПЧД из потенциал-чувствительной фосфатазы асцидий *Ciona intestinalis* использованный в индикаторе Butterfly1.2. Данный ГКИМП первоначально был создан в лаборатории Томаса Кнопфеля [58], и зарекомендовал себя как перспективное чувствительное ядро индикатора мембранного потенциала благодаря быстрой кинетике и надежному нацеливанию на мембрану в различных типах клеток. Ответ на изменения мембранного потенциала обеспечивается в нем значительным конформационным сдвигом четвертой трансмембранной спирали (S4), который может эффективно передаваться репортерному домену. В нашем дизайне конформационные подвижки, происходящие в ПЧД при изменении мембранного потенциала, предположительно будут влиять на интенсивность флуоресценции реассоциирующего ФБ FusionRed за счет механического растяжения нековалентно связанного бета-бочонка (рис.10). Регистрация флуоресцентного ответа индикатора в этом случае производится в единственном красном канале как изменение интенсивности сигнала. Мы сконструировали два варианта экспрессионных векторов pVSD-FR76-73 и pVSD-FR189-188.

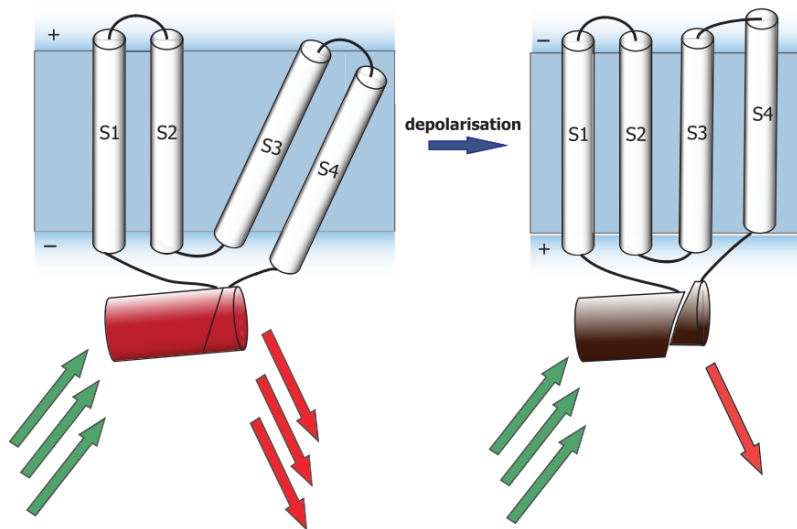


Рисунок 10. Схематическое изображение принципа работы индикатора. Деполяризация вызывает смещение трансмембранного домена, чувствительного к изменению потенциала мембраны, что в свою очередь ведет к изменению конформации ФБ и снижению интенсивности флуоресцентного сигнала. S1-S4 – трансмембранные чувствительные к изменению потенциала домены ПЧД из *Butterfly1.2*, красный цилиндр, соединенный с N- и C-концами ПЧД, изображает ФБ FusionRed с разрывом по положениям 189-188 или 76-73.

Мы провели транзientную трансфекцию и экспрессировали обе конструкции в клетках НЕК293Т (рис. 11) и РС12.

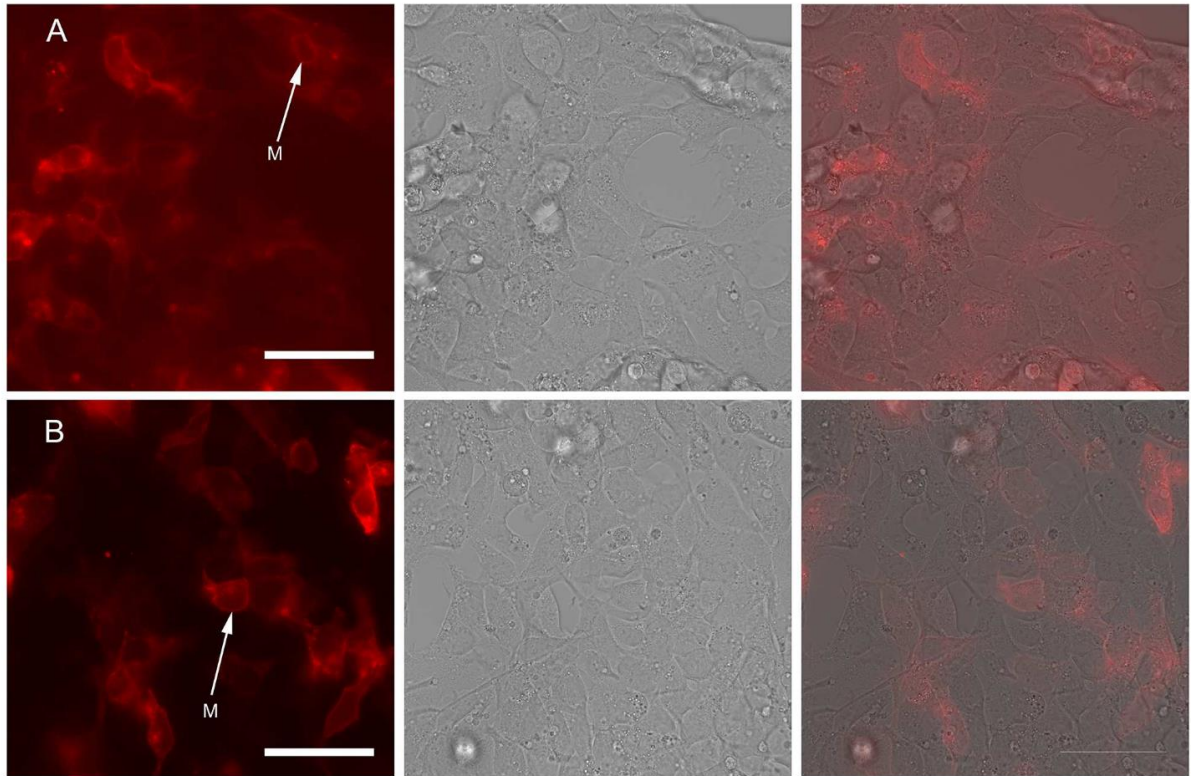


Рисунок 11. Клетки HEK293T, временно трансфицированные (A) pVSD-FR76-73 и (B) pVSD-FR189-188. Левая панель – флуоресцентные изображения, центральная панель – соответствующие изображения в проходящем свете, правая панель – наложения. Масштабная линейка 50 мкм. Стрелки с буквой «М» показывают плазматические мембраны. Можно наблюдать преимущественно мембранную локализацию белка и нескольких агрегатов в цитоплазме.

Для конструкции pVSD-FR76-73 мы наблюдали агрегацию белка в перинуклеарном пространстве и относительно слабый сигнал на плазматической мембране после экспрессии в обеих модельных системах (HEK293 и PC12). Низкий уровень флуоресцентного сигнала и слабая экспрессия в сочетании с проблемами мембранной локализации приводят к невозможности достоверно регистрировать сдвиг флуоресцентного сигнала в ответ на изменения потенциала мембраны. Напротив, VSD-FR189-188 имел преимущественно мембранную локализацию и демонстрировал снижение интенсивности флуоресценции в красном канале в ответ на изменения мембранного потенциала. Чтобы оценить чувствительность к изменению потенциала VSD-FR189-188, мы фиксировали потенциал в режиме voltage clamp и подавали ступенчатые изменения потенциала к клеткам,

трансфицированным VSD-FR189-188, одновременно регистрируя оптический ответ с помощью флуоресцентного микроскопа.

Ступенчатые изменения потенциала от значений удерживающего потенциала -85 mV до $+60$ mV вызвали явное снижение флуоресценции VSD-FR189-188 при тестировании на клетках линии PC12 (нормированная амплитуда сигнала: $0.4 \pm 0.04\%$, $n = 5$ клеток; Рис.12A). Сигнал VSD-FR189-188 на серию стимулирующих ступенек потенциала отражали периодические изменения напряжения в соответствии с частотами 2.5 и 5 Гц (Рис.12B and 12C). Мы также провели тестирование VSD-FR189-188 в клетках линии HEK293 с пошаговым изменением подаваемых ступенек потенциала от удерживающего потенциала -110 мВ до -170 мВ, -20 мВ, 30 мВ и 130 мВ с длительностью шага 100 мс (Рис.12D). Для каждого шага изменения флуоресценции соответствовали шагам приложенного напряжения и увеличивались соответственно амплитуде скачка напряжения.

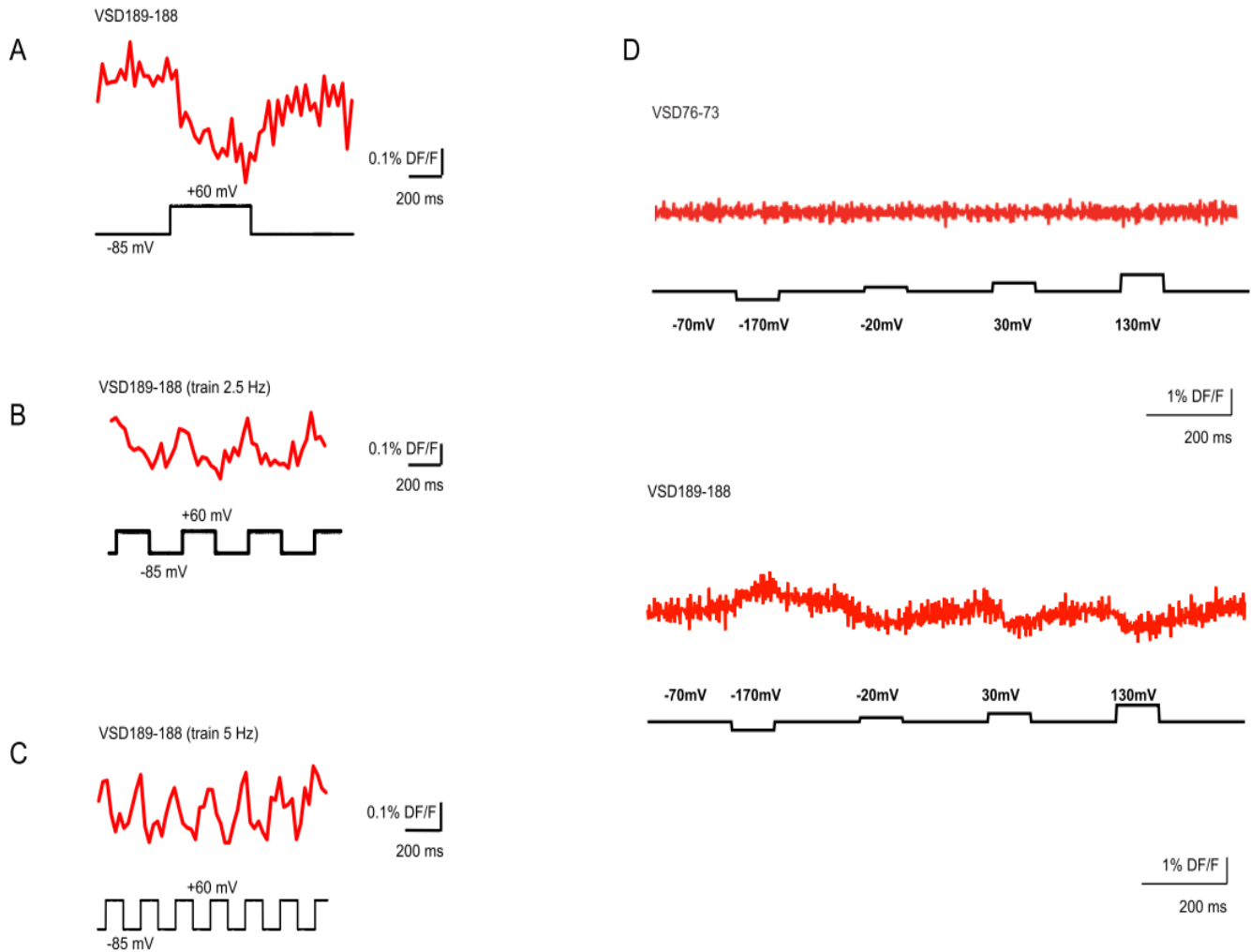


Рисунок 12. Функциональное тестирование вариантов ГКИМП на основе srFR в клетках PC12 (A-C) и HEK293 (D). Флуоресценция индикатора VSD-FR189-188 чувствительна к изменениям трансмембранного потенциала. (A-C) Изменения флуоресценции (верхние кривые) для отдельных ступенек напряжения (A) и серий частотой 2,5 Гц (B) и 5 Гц (C) регистрировались с помощью конфокального микроскопа. Под каждой кривой показаны ступеньки подаваемого потенциала. (D) Сравнение сигнала VSD-FR189-188 (нижняя кривая), индуцированного командным протоколом одного шага гиперполяризации и трех последующих шагов инкрементной деполяризации, с записью VSD-FR76-73, выполненной с тем же протоколом (верхняя кривая). Изображения были записаны с частотой 500 кадров в секунду, усреднения по 16 экспериментам показаны без фильтрации.

Затем мы сравнили сигнал VSD-FR189-188 с сигналом от ранее описанного потенциал-чувствительного индикатора Butterfly1.2, записав его флуоресцентный ответ при изменении

потенциала мембраны с помощью CCD-камеры в полосе возбуждения 510–550 нм. Сигнал VSD-FR189-188 регистрировался с помощью полосового фильтра 575–630 нм. Наши эксперименты показали, что как кинетические характеристики, так и амплитуда ответов в этих индикаторах были сопоставимы.

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

Константа времени τ VSD-FR189-188: 26.3 ± 2.6 ms, Butterfly1.2: 22.7 ± 3.0 мс; $n = 6$ клеток, (Рис. 13).

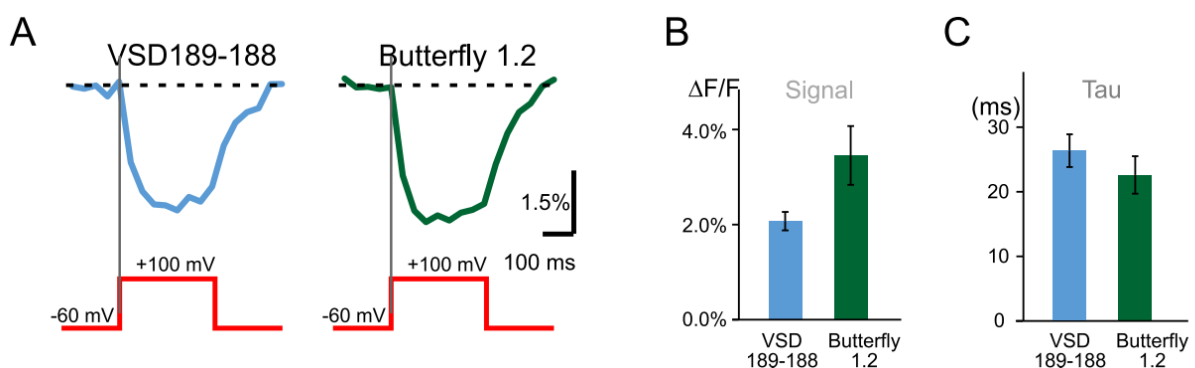


Рисунок 13. Сравнение амплитуды и динамики сигнала индикаторов мембранного потенциала VSD-FR189-188 и Butterfly1.2, протестированных в аналогичных условиях в клетках HEK293. (A) Флуоресцентные ответы, вызванные ступеньками подаваемого потенциала, (B) амплитуда сигнала \pm SEM, измеренная относительно базовой линии в конце каждого шага напряжения. (C) $\tau \pm$ SEM, постоянная времени, полученная из экспоненциальной аппроксимации флуоресцентных ответов индикаторов, показанных на A.

Хотя контраст индикатора невелик (около 0,4–3% dF/F, в зависимости от протокола измерения и линии клеток), наши эксперименты успешно продемонстрировали, что конструкция репортерного домена, основанная на вставке ПЧД в пермутированный красный ФБ, может использоваться для регистрации потенциала мембраны. Более того, в среднем VSD-FR189-188 показал лучшую производительность в клетках HEK293, чем индикаторы на основе cpmKate, разработанные с топологией fusion-to-cpFP.

3.4 Оптимизация междоменного линкера индикатора VSD-FR189-188

В молекуле VSD-FR189-188 С-концевой фрагмент FusionRed (189-233) соединен с Сi-VSP ПЧД через линкер, тогда как N-концевой фрагмент (1-188) присоединен «вплотную» (Рисунок 14). Исходный линкер из 25 аминокислот (EERIDIPEISGLWWGENEHGVDDGR) представлен нативной последовательностью из N-концевой области потенциал-чувствительного домена потенциал-чувствительной фосфатазы Сi-VSP.

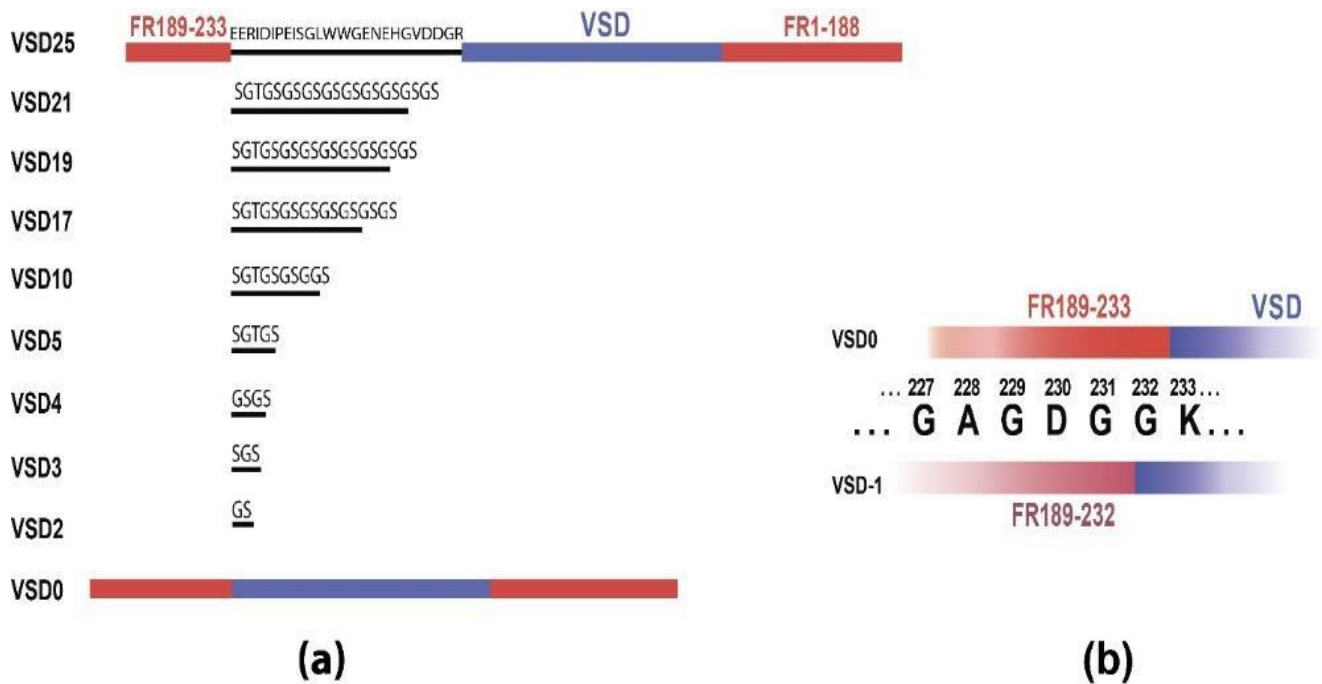


Рисунок 14. (а) Схематическое изображение конструкции вариантов сенсора с 10 различными длинами линкеров, от исходного VSD25 до VSD0. Фрагменты FusionRed показаны красным, потенциал-чувствительный домен (VSD) – синим, а линкеры – черным. (б) Вариант VSD-1 с укороченной частью FR189-232 показан розовым.

В рабочем цикле индикатора VSD-FR189-188 линкер передает механическую силу, вызванную сдвигом конформации ПЧД под действием смены потенциала, молекуле флуоресцентного белка, оказывая влияние на ее структуру и приводя к изменению интенсивности флуоресценции. Подобный механизм ранее был предложен для индикатора потенциала на одиночном ФБ VSFP3.1 [32]. Таким образом, мы предположили, что умеренный контраст и скорость ответа VSD-FR189-188 могут быть следствием

неэффективной трансдукции энергии внутри молекулы ГКИМП. При этом укорочение междоменного линкера, вероятно, может усилить междоменное взаимодействие. Чтобы проверить это предположение, мы решили заменить 25-аминокислотный нативный линкер набором укороченных гибких линкеров, построенных из глицин-сериновых повторов ((GS)_n), часто используемых для соединения структурных модулей в конструкциях на основе ФБ. Таким образом, мы заменили сложную последовательность, происходящую от слабо аннотированного N-конца Ci-VSP, на простой регулярный мотив, который, вероятно, обеспечивает более прозрачную зависимость между длиной линкера и его конформацией / гибкостью. Всего мы сконструировали девять вариантов сенсора (рис. 14а) с длиной линкера в диапазоне от 0 (без линкера) до 21 аминокислоты (0, 2, 3, 4, 5, 10, 17, 19, 21; называются VSD0-21 в тексте), где VSD0 представляет собой вариант с фрагментом FusionRed 189-233, клонированным вплотную с VSD. Мы также сконструировали вариант VSD-1 (рис. 14b), который представляет собой VSD0 с фрагментом FusionRed, уменьшенным на одну C-концевую аминокислоту (до 189-232). Варианты VSD0 и VSD-1 не обладали флуоресценцией при экспрессии в клетках млекопитающих, что свидетельствует о необходимости наличия линкера, состоящего по крайней мере из 1-2 аминокислот, для обеспечения правильного фолдинга FusionRed и/или созревания хромофора в конструкциях этого типа. Остальные 8 конструкций были экспрессированы в клетках HEK293T, где их флуоресцентные ответы на электрическую стимуляцию измеряли в режиме фиксации потенциала для всей клетки (конфигурация whole-cell patch clamp) и сравнивали с исходным VSD-FR189-188 (описана ранее в разделе 1.2.2 h) (VSD25 для единообразия номенклатуры).

Для оценки амплитуды и полярности сигнала в полученном наборе индикаторов, мы провели регистрацию оптических сигналов клеток HEK293T, вызванные одиночными ступеньками потенциала в 160 мВ (Рисунок 15b, 10–20 одиночных ступенек потенциала с интервалами 1 с), индуцированного подачей тока через патч-пипетку в режиме фиксации потенциала.

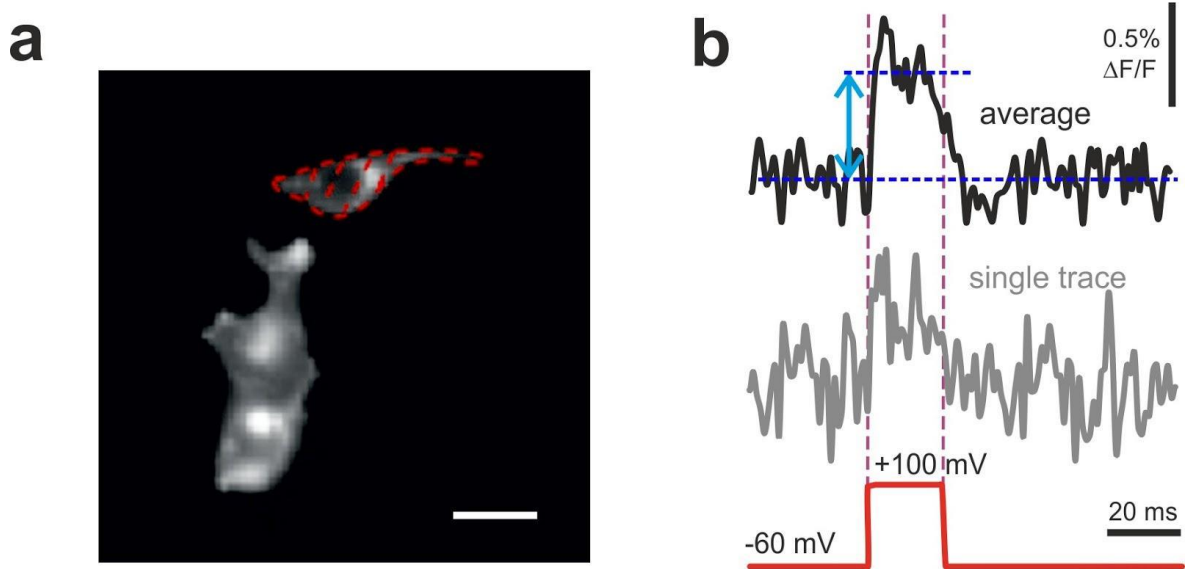


Рисунок 15. Примеры оптических ответов клеток HEK293T, трансфицированных VSD2. (a) Пунктирная линия обозначает анализируемую область (region of interest ROI). Шкала шкалы: 30 мкм. (b) Оптические кривые (полученные из ROI, показанной на a) сигналов VSD2, вызванных одним скачком напряжения амплитудой 160 мВ (нижняя красная пунктирная линия), повторяемым 10–20 раз с интервалом 1 с. Показаны как одиночная пробная запись (нижняя кривая), так и среднее значение из 10 кривых (верхняя полужирная кривая). Двунаправленная стрелка показывает амплитуду усредненного сигнала флуоресценции, измеренного относительно базовой линии. Сигнал записывался с частотой 1 кГц (экспозиция 1 мс на кадр).

В 6 из 8 исследуемых вариантов конструкций подача ступенек потенциала приводила к ступенчатым изменениям флуоресценции, которые различались по амплитуде и полярности ответа (рисунок 16). Поскольку мы не смогли зарегистрировать флуоресцентный ответ VSD10 и VSD21, данные для них не показаны.

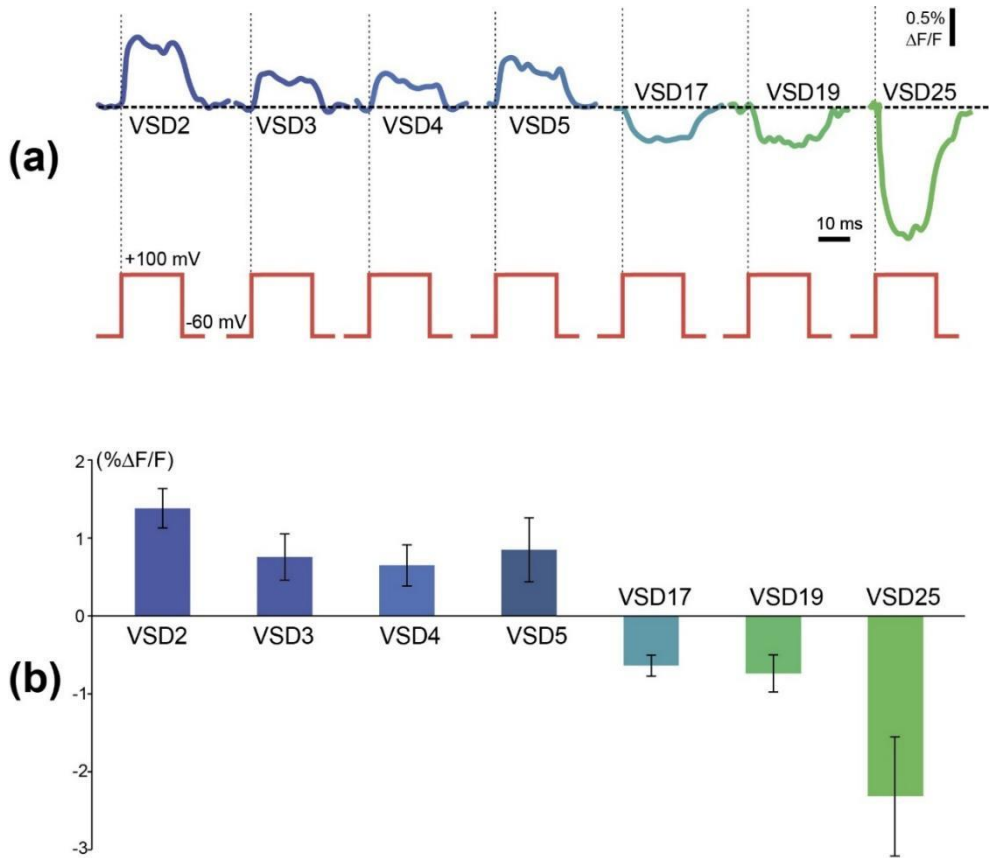


Рисунок 16. Сравнение амплитуд оптических сигналов 7 вариантов потенциал-чувствительных конструкций, протестированных в аналогичных условиях. (a) Примеры кривых, вызванных ступенькой потенциала от -60 мВ удерживающего потенциала до +100 мВ (верхние красные ступеньки). Относительное изменение флуоресценции каждого зонда отображено на графике над каждой ступенькой потенциала с идентичной амплитудой. Цвета оптических кривых соответствуют столбцам на гистограмме 16b и имеют цветовую кодировку тестируемых зондов. (b) Показаны амплитуды сигналов зондов, измеренные как среднее разности между амплитудами сигналов и базовой флуоресценцией каждого индикатора. Каждый столбец представляет собой среднее значение 3–5 экспериментов + стандартная ошибка среднего.

Эти результаты демонстрируют комплексное влияние длины линкера на свойства ГКИМП. С одной стороны, они противоречат нашей первоначальной гипотезе о том, что укорочение линкера может вызывать более сильный сдвиг флуоресценции FusionRed, поскольку контраст ответа вариантов сенсора с укороченными линкерами даже ниже, чем в исходном VSD-FR189-188 (также известном как VSD25).

С другой стороны, можно наблюдать тенденцию в зависимости “полярности” флуоресцентного ответа индикатора, выражающуюся в значении соотношения dF/dV . Так, снижение интенсивности флуоресценции в ответ на увеличение потенциала – характерный для VSD25 “отрицательный” ответ, меняется на “положительный” dF/dV между вариантами с линкерами длиной 17 и 5 а.о. В наборе с полипептидными линкерами длиной от 5 до 2 а.о. наблюдается небольшое увеличение контраста индикаторов. Все вместе эти изменения формируют «косинусообразную» зависимость с локальным отрицательным максимумом при длине линкера в 25 а.о. и локальным положительным максимумом при 2 а.о.

“Отрицательный” ответ индикатора, то есть уменьшение флуоресцентного сигнала в ответ на увеличение потенциала мембраны, рассматривается как широко распространенный среди популярных ГКИМП недостаток (например, ArcLight, ASAP2f и AceNeon) [55]. Ранее «переключение» полярности ответа было получено в индикаторе Marina путем направленного мутагенеза репортерного домена [55]. В нашей работе мы обнаружили альтернативный способ изменения полярности индикатора, потенциально применимый к широкому диапазону интенсифицированных ГКИМП на основе флуоресцентных белков.

Мы также оценили скоростные характеристики индикатора, проведя расчеты постоянных времени, полученных из моноэкспоненциальных аппроксимаций фаз нарастания и спада сигнала в начале и в конце ступеньки потенциала (рис. 17а).

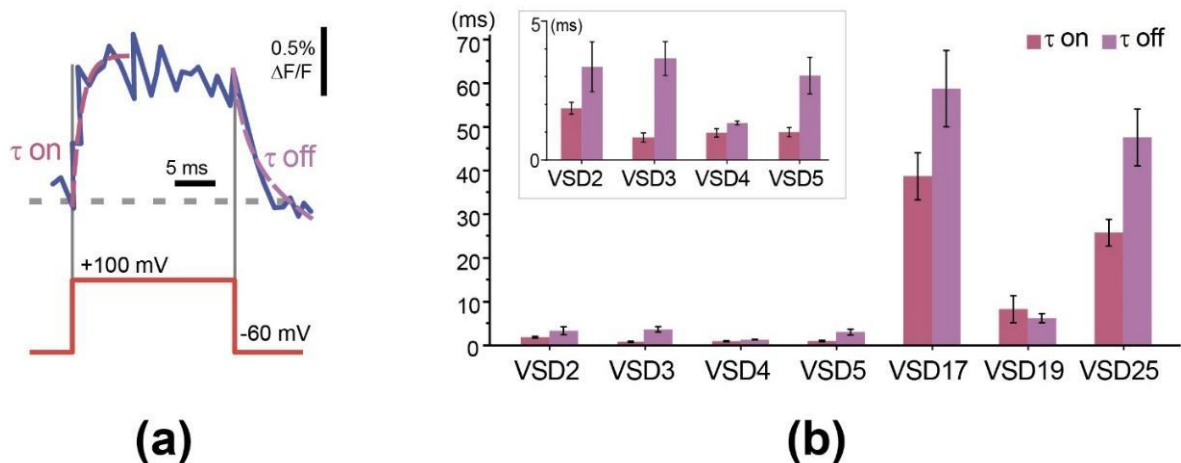


Рисунок 17. Характеристика скорости вариантов индикатора. (а) Пример моноэкспоненциальной аппроксимации (пунктирные пурпурные линии) нарастания и спада сигнала в

начале и в конце ступеньки потенциала 160 мВ (красная линия). Оптический отклик (синяя кривая) имел задержку относительно подаваемого потенциала (красная кривая ниже). Задержка характеризовалась константой времени τ одноэкспоненциальных функций (пунктирная пурпурная линия). (b) Гистограммы показывают постоянные времени (τ) \pm SEM для зондов с разной длиной линкера, полученные из одноэкспоненциальных аппроксимаций начала сигнала (τ -on) и затухания (τ -off). На врезке отдельно показаны постоянные времени для наиболее быстрых вариантов VSD2-VSD5.

Наши эксперименты показали, что конструкции с длиной линкера 5 а.о. и меньше могут достигать субмиллисекундных скоростей ответа, что значительно (в 25-30 раз) быстрее, чем варианты с длинным линкером (VSD17, 19) и исходный вариант индикатора VSD-FR189-188 (~25 мс). Хотя мы ожидали, что укорочение линкера приведет к увеличению контраста ответа, повышение скорости ответа также попадает в парадигму лучшей междоменной коммуникации. Однако с этой точки зрения трудно объяснить скачкообразное изменение постоянной времени. В любом случае, высокая скорость отклика индикатора является важным преимуществом, необходимым для применения *in vivo*, поскольку нейроны могут генерировать потенциалы действия с частотой до 600 Гц [51]. Индикаторы VSD2-VSD5 показали кинетические характеристики, сравнимые с таковой у лучших основанных на ФБ ГКИМП – Ace2N-mNeon [53], VARNAM [54], Archon1 [70], Mermaid [118] и даже QuasAr2 на основе археородопсина [48]. Низкая контрастность ответа этих конструкций, недостаточная для использования *in vivo*, стимулировала дальнейший поиск решений.

VSD2 – вариант с самым высоким контрастом (~1,5%) среди высокоскоростных конструкций с короткими линкерами – был выбран в качестве отправной точки для дальнейшей оптимизации. Поскольку возможности для дальнейшего укорочения линкера между потенциал-чувствительным доменом и С-концевым фрагментом FusionRed были исчерпаны, было решено урезать аминокислоты на С-конце N-концевого фрагмента FusionRed (1-188). В частности, были сконструированы 3 варианта векторов на основе VSD2 с фрагментом FusionRed укороченным на 2, 3 и 4 аминокислоты (названные VSD2-186, VSD2-185, VSD2-184) (Рисунок 18).

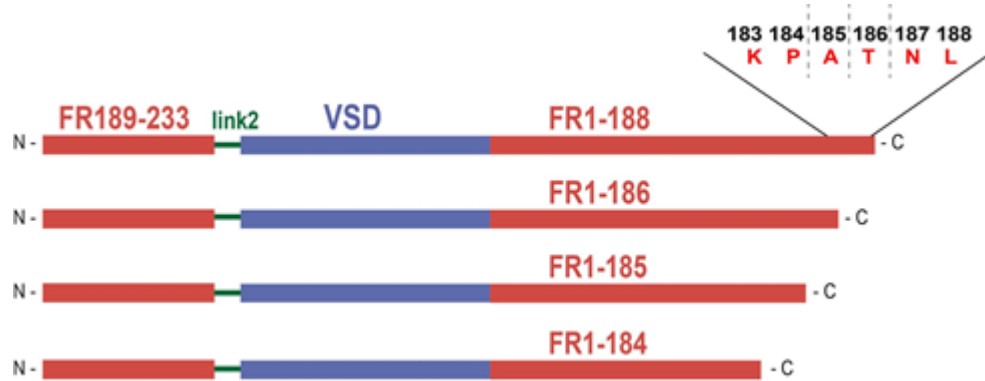


Рисунок 18. Модификации VSD2 – VSD2-186, VSD2-185, VSD2-184 – разработаны путем укорочения C-конца *cpFusionRed 1-188*. Красным цветом показаны два фрагмента *cpFusionRed*, зеленым – часть междоменного линкера, синим цветом показан ПЧД.

Мы провели стандартное функциональное тестирование на HEK293T для оценки контраста и скорости VSD2 и его производных с усеченным C-концом и обнаружили, что их амплитуды сигналов либо не были значительно изменены, либо даже уменьшились по сравнению с исходным VSD2 (рис. 19а). Константа времени VSD2-185 была существенно меньше, чем у VSD2 (0,83 против 1,86 мс, рисунок 19с). Таким образом, усечение N-концевого фрагмента *FusionRed* не влияло на флуоресценцию, хотя и приводило к относительно небольшим колебаниям характеристик сенсора.

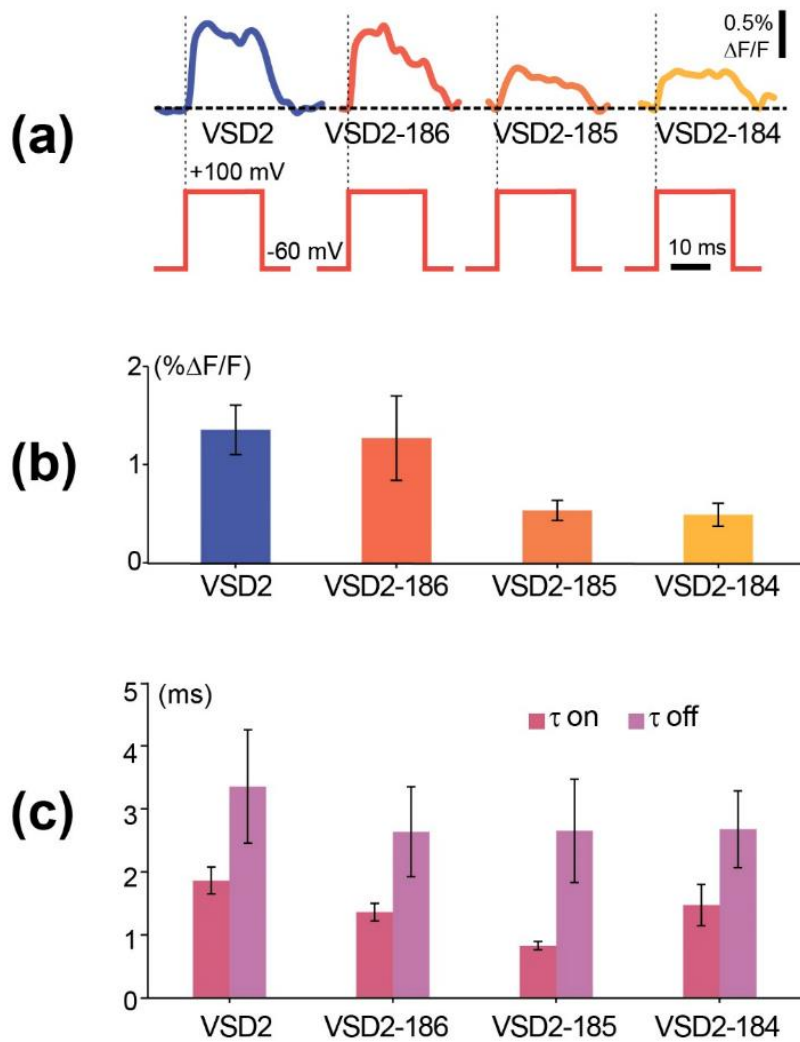


Рисунок 19. Функциональное тестирование вариантов ГКИМП в клетках HEK293T. (a) Изменение флуоресценции (верхние кривые) при изменении мембранного потенциала от -60 мВ до +100 мВ (нижние кривые, красный цвет), зарегистрированные с использованием четырех различных вариантов индикатора VSD2, линкеры были изменены с C-концов (рисунок 16). (b) Амплитуды сигналов \pm SEM, измеренные относительно базовой линии в конце каждого шага потенциала. Цвета столбцов соответствуют цветам графиков, показанных на (a). (c) Постоянные времени (τ) \pm SEM, полученные из экспоненциальной аппроксимации ON-ответов белков.

3.5 Оптимизация репортерного домена

Помимо оптимизации линкерной последовательности, мы предприняли попытку улучшения характеристик репортерного домена. При экспрессии FusionRed наблюдается образование как

зрелой флуоресцентной формы, так и варианта с расщеплением основной цепи белка в области, участвующей в образовании хромофора.

Кристаллическая структура мономерного красного флуоресцентного белка FusionRed (PDB ID: 6U1A) ($\lambda_{ex} / \lambda_{em}$ 580/608 nm) была определена с разрешением 1,09 Å и выявила два альтернативных пути посттрансляционной модификации, приводящие к образованию различающихся продуктов.

Соотношение зрелого хромофора Met63-Tyr64-Gly65 и нециклизованного образующего хромофор трипептида 60:40 с расщеплением основной цепи белка между Met63 и предшествующим Phe62 и окисленной связью C α -C β Tyr64 [119]. Мы проанализировали структуры FusionRed и нескольких родственных красных флуоресцентных белков, идентифицировали структурные элементы, вызывающие гидролиз пептидной связи, и подтвердили их влияние с помощью точечного мутагенеза. Эти внесло вклад в понимание посттрансляционной модификации GFP-подобных флуоресцентных белков за пределами канонического механизма циклизации-дегидратации-окисления. Они также показывают, что нарушение циклизации не препятствует дальнейшим превращениям трипептида, образующего хромофор, за счет того же набора каталитических остатков. Направленным мутагенезом удалось создать варианты с ингибированием расщепления пептидного остова, и вариант FusionRed с ~ 30% улучшенной яркостью (таблица 4) [119].

Таблица 4. Характеристики вариантов FusionRed.

Флуоресцентный белок	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (nm)	Молярный коэффициент экстинкции (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Квантовый выход	Яркость (%)	Разрыв полипептидной цепи
FusionRed	580/608	94,500	0.19	100	да

FusionRed C158A	571/598	91,000	0.24	126	да
FusionRed C158L	580/606	75,000	0.12	50	нет
FusionRed C158L/A157T	578/608	96,000	0.16	86	нет

Улучшенный FusionRed/C158L был применен в форме бимолекулярного варианта в конструкции аналогичной VSD-FR189-188. Однако при трансфекции в клетки линии HEK293T демонстрировал драматически сниженный уровень флуоресцентного сигнала, что препятствовало проведению дальнейшего электрофизиологического тестирования полученного варианта. Дальнейшие работы по поиску оптимального репортерного домена продолжаются, в т.ч. с применением подходов предсказания пространственной структуры белков на основе имеющихся данных рентгено-структурного анализа FusionRed и инструмента AlphaFold2 (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>).

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

Расширение репертуара потенциал-чувствительных доменов и разработка ГКИМП на основе белков млекопитающих является одной из важных задач на пути создания таких молекулярных инструментов. Белок престин, обуславливающий усиление вибраций в слуховом анализаторе млекопитающих, воспринимает изменение потенциала мембраны напрямую, не задействуя ферментативный аппарат клетки [89]. Следствием такого механизма является очень быстрая электроподвижность, движения престина на несколько порядков быстрее, чем у других моторных белков [85]. Электроподвижность престина характеризуется микросекундной кинетикой и многократно повторяющимися циклами растяжения-сжатия с частотой не менее 70 кГц [120]. Эти свойства позволяют рассматривать престин в качестве

перспективной основы для разработки новых молекулярных инструментов для регистрации электрической активности в популяциях электровозбудимых клеток.

Для разработки вариантов индикатора мембранного потенциала на основе претина мы опробовали три различных топологии соединения полипептидных цепей претина с флуоресцентным белком (Рис. 20).

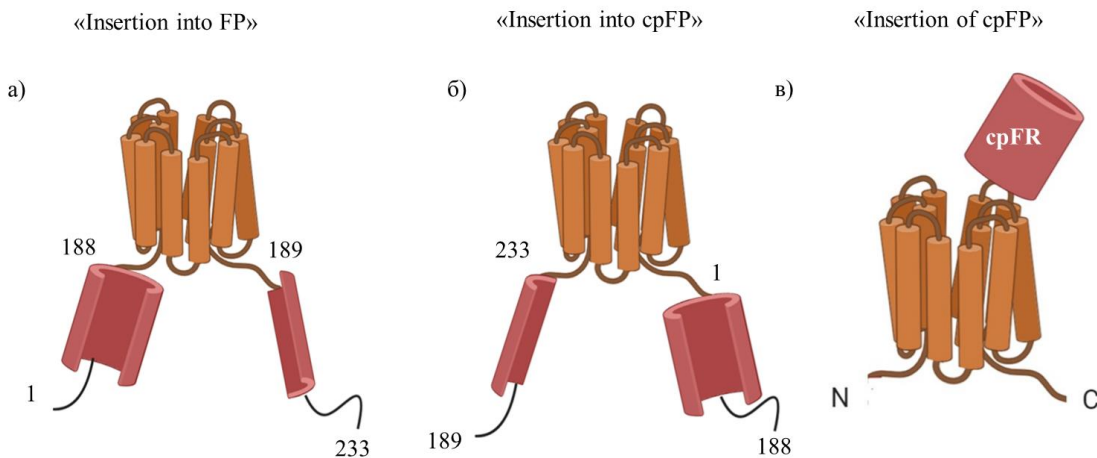


Рисунок 20. Варианты топологического сочетания ГКИМП из претина и флуоресцентного белка, реализованные в настоящей работе. Оранжевые цилиндры обозначают претин, красный цилиндр – фрагменты флуоресцентного белка (на примере FusionRed) и его циркулярно пермутированного варианта cpFR.

а) Топология «insertion into FP»

представляет собой вставку гена претина (чувствительное ядро для индикаторной конструкции) внутрь гена флуоресцентного белка (репортер индикатора) с сохранением исходной последовательности аминокислот ФБ, но с разделением его на два фрагмента. Вставка кодирующей последовательности претина в последовательность ФБ FusionRed осуществлялась между аминокислотными остатками 188 и 189 последнего, нумерация по FusionRed (Рис. 20, а).

б) Топология «insertion into cpFP»

предполагает инсерцию гена претина внутрь гена циркулярного пермутанта флуоресцентного белка (cpFR189-188) (Рис. 20, б). Кодирующая последовательность

престина вводилась между аминокислотными остатками 233 и 1 последовательности cpFR189-188 (нумерация в соответствии с нативным белком FusionRed) (Рис. 21).

Конструкция разрабатывалась аналогично описанной в главе 3.3 конструкции индикатора VSD-FR189-188. Топология «insertion into cpFP» сочетает в себе принципы бимолекулярной флуоресцентной комплементации и циркулярной пермутации ФБ, что позволяет рассчитывать на высокую чувствительность ГКИМП такого дизайна.



Рисунок 21. Схема генетической конструкции, реализующей топологию «insertion into cpFP» (Prestin-X, где X – длина N-концевого линкера). Красным цветом обозначены фрагменты кодирующей последовательности FusionRed, синим – кодирующая последовательность престина.

в) Топология «insertion of cpFP»

в отличие от двух предыдущих, данная топология основана на инсерции кодирующей последовательности пермутированного ФБ (cpFR189-188) внутрь последовательности чувствительного ядра (престина).

3.6.a Топология «insertion into FP» для создания Prestin-FR

Топологический вариант «insertion into FP» (Prestin-FR) содержит кодирующую последовательность престина, обрамленную двумя фрагментами гена флуоресцентного белка, не обладающими флуоресценцией поотдельности. При ассоциации фрагментов флуоресцентного белка происходит формирование хромофорной группы и детектируется флуоресцентный сигнал. Данный эффект основан на принципе бимолекулярной флуоресцентной комплементации [117].

Важным аспектом при конструировании ГКИМП является способ соединения последовательностей сенсорной (престин) и репортерной (ФБ) частей молекулы. Мы использовали последовательности гибких глицин-сериновых аминокислотных линкеров, которые часто применяются при разработке мультидоменных белковых конструкций [121]. С

N-конца престин соединен с фрагментом FusionRed1-188 аминокислотным линкером SGTGS, а с С-конца линкер между престином и FusionRed189-233 состоит из двух аминокислот (треонин и серин) (Рис. 22).

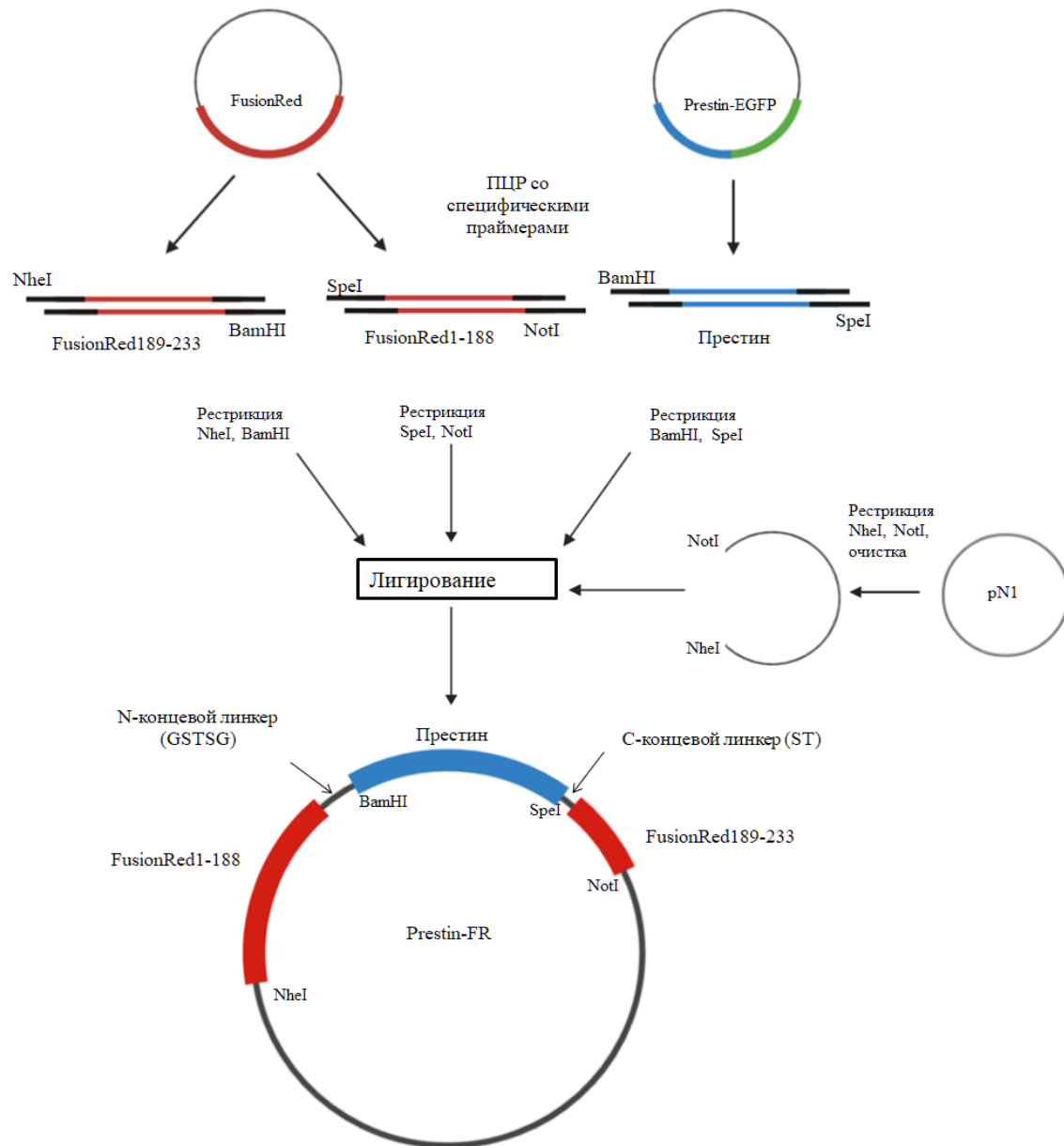


Рисунок 22. Схема “сборки” генетической конструкции *Prestin-FR*. Красным цветом обозначены фрагменты последовательности *FusionRed*, синим цветом – последовательность престина, зеленым – *EGFP*.

Корректность сборки конструкции Prestin-FR относительно модельной последовательности проверяли секвенированием. Далее осуществлялось первичное тестирование, для этого проводили транзientную трансфекцию клеток линии HEK293T для оценки характера локализации химерного белка и интенсивности флуоресцентного сигнала (Рис. 23).

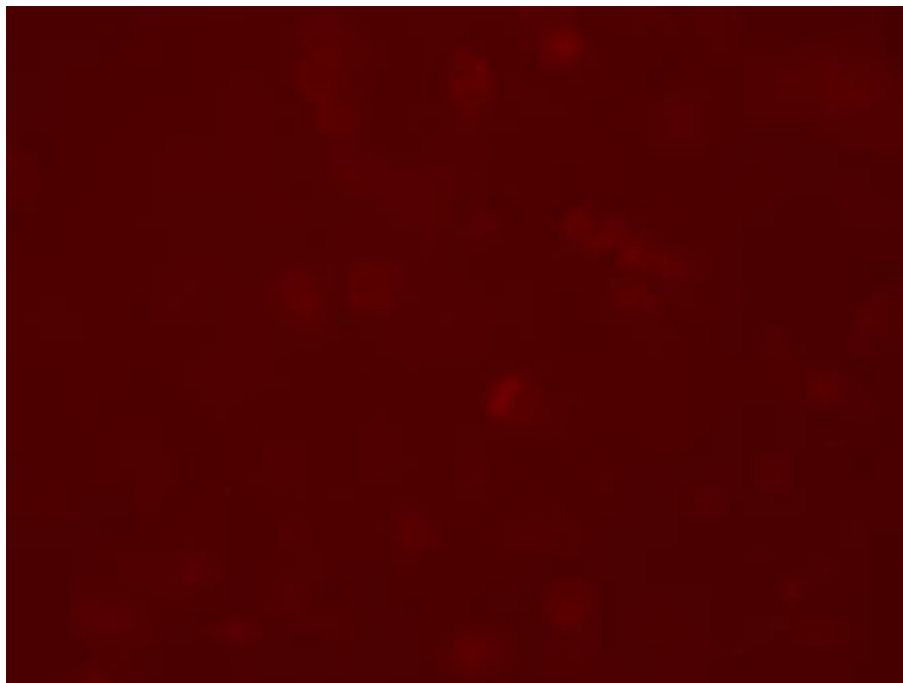


Рисунок 23. Флуоресцентная микрофотография. Клетки линии HEK293T, экспрессирующие конструкцию Prestin-FR.

Первичное тестирование показало слабый флуоресцентный сигнал и отсутствие выраженной мембранной локализации экспрессируемого белка. Также для Prestin-FR наблюдалась тенденция к накоплению и агрегации в цитоплазме. Вероятно, при формировании третичной структуры этого варианта химерного белка не происходит ассоциации полипептидной цепи FusionRed, в результате чего нарушается полноценное формирование “зрелого” флуорофора. В итоге мы наблюдаем снижение яркости флуоресценции, а также агрегацию белка в цитоплазме, которая повидимому оказывается следствием олигомеризации химерного белка. Эти обстоятельства показывают нецелесообразность перехода к функциональному тестированию варианта Prestin-FR.

3.6.6 Топология «insertion into cpFP» для создания вариантов Prestin-X

Дизайн конструкций в топологии «insertion into cpFP» (Prestin-X) использовался ранее при разработке линейки ГКИМП VSD-FR189-188 (глава 3.3). Строение конструкций при этом схоже с таковым для Prestin-FR, отличие заключается в инверсии фрагментов полипептидной цепи FusionRed. Так, на N-конце химерного белка располагается концевой фрагмент ФБ FusionRed189-233, а на С-конце – начальный FusionRed1-188 (относительно нативной последовательности FusionRed до пермутации).

Поскольку ранее (глава 3.4) нами было показано влияние длины междоменных полипептидных линкеров на рабочие характеристики ГКИМП, при реализации данного дизайна на основе ПЧД из престоина, нами была создана серия конструкций с разными вариантами длины N-концевого линкера (от 2 до 17 а.о.).

Варианты конструкций в топологии Prestin-X были разработаны с применением классических генноинженерных методик. Отличие от протоколов для Prestin-FR заключается в том, что фрагмент ДНК FusionRed189-233 фланкировался сайтами рестрикции NheI и BamHI, а фрагмент FusionRed1-188 содержал на концах SpeI и NotI (Рис. 24).

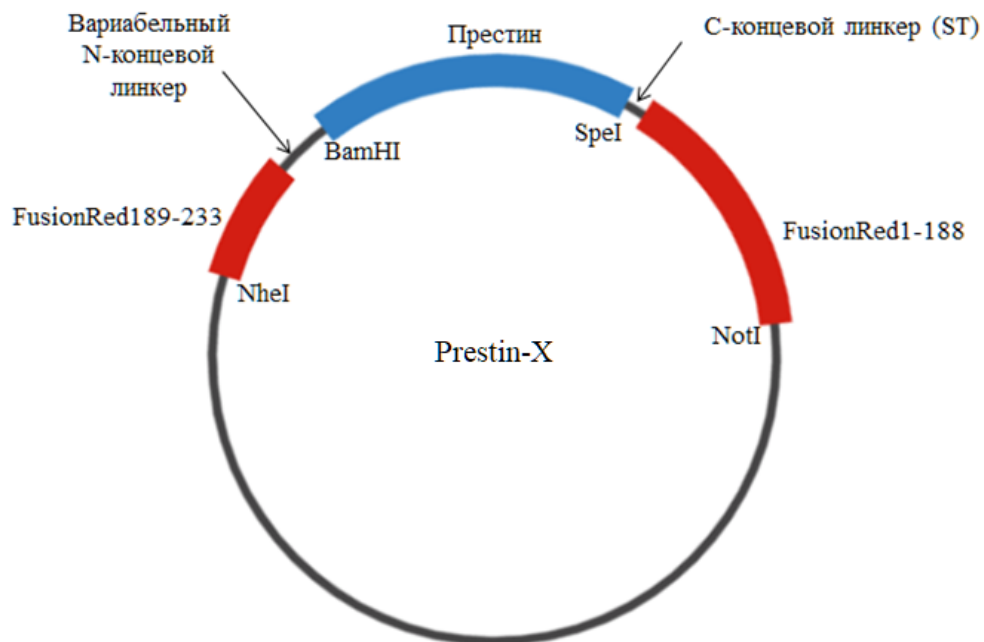


Рисунок 24. Общая схема экспрессионного вектора для химерного белка в топологии «insertion into cpFP». Красный цвет обозначает фрагменты гена ФБ FusionRed, синий – последовательность престина.

Короткий С-концевой линкер, соединяющий престин и FusionRed1-188, состоит из 2 аминокислотных остатков (треонин и серин).

Результаты первичного тестирования данной линейки вариантов Prestin-X при экспрессии в клетках HEK293 представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Аминокислотный состав вариантов N-концевого линкера и характеристики первичного скрининга в клетках HEK293T для топологии «insertion into cpFP»

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

Первичное тестирование данных 6 конструкций, различающихся длиной N-концевого линкера, показало удовлетворительную интенсивность флуоресцентного сигнала

одновременно с мембранной локализацией у вариантов Prestin-4, Prestin-5 и Prestin-6. Для химерных белков с наиболее коротким (Prestin-2) и наиболее длинными N-концевыми линкерами (Prestin-10 и Prestin-17) наблюдалась неспецифическая локализация флуоресцентного сигнала, а для варианта с линкером 17 детектировался крайне низкий уровень флуоресцентного сигнала. Prestin-17 и Prestin-10, по-видимому, демонстрировали ухудшение флуоресцентного сигнала в связи с изменением взаимной ориентации фрагментов пермутанта с_рFR189-188. То есть при формировании третичной структуры данного химерного белка происходит достижение некоторой “пороговой” длины линкера, после которой фрагменты пермутированного ФБ не способны к корректной ассоциации и формированию зрелой хромофорной группы.

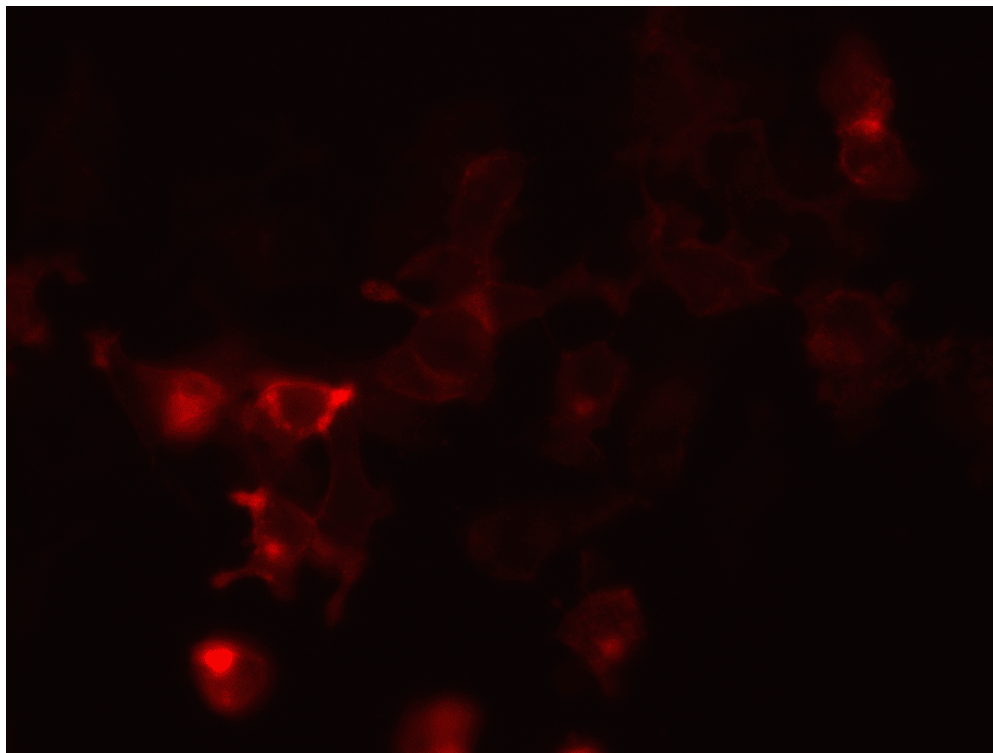


Рисунок 25. Флуоресцентная микрофотография клеток линии HEK293T, экспрессирующих Prestin-5.

Удовлетворительные результаты первичного тестирования конструкций Prestin-4, Prestin-5, Prestin-6 позволили перейти к этапу функционального тестирования. Функциональное тестирование направлено на выявление индикаторных свойств химерных белков, при этом

методом локальной фиксации потенциала в конфигурации “whole cell” проводится стимуляция клеток с одновременной регистрацией динамики флуоресцентного сигнала.

Внешняя электрическая стимуляция в режиме voltage-clamp применяется при тестировании конструкций в линии клеток НЕК293Т, которые не являются истинно электровозбудимыми клетками. В конфигурации “whole cell” внешним генератором задается удерживающий потенциал -60 мВ (сходный с потенциалом покоя нейронов). Измерение интенсивности флуоресценции при циклически подаваемых стимулах в виде изменения мембранного потенциала от удерживающего потенциала -60 мВ до +100 мВ (рис. 26) осуществлялось в коллаборации с Лабораторией клеточной нейробиологии обучения Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Тестировались три прошедшие первичное тестирование конструкции (Prestin-4, Prestin-5 и Prestin-6), для варианта Prestin-5 мы детектировали выраженный флуоресцентный ответ при изменении потенциала. Результаты функционального тестирования конструкции Prestin-5 представлены на рисунке 26.

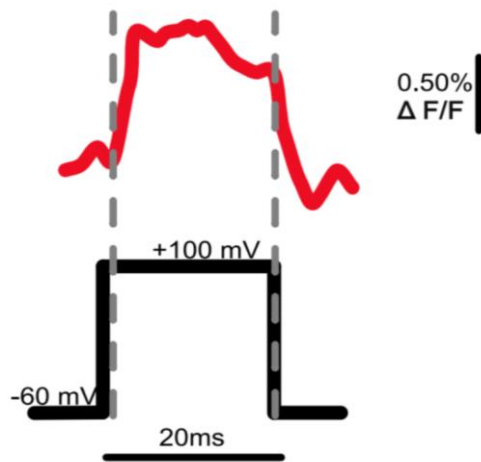


Рисунок 26. Изменение интенсивности флуоресцентного сигнала (красный цвет) при экспрессии Prestin-5 в клетке линии НЕК293. Изменение мембранного потенциала производилось от -60 мВ до +100 мВ (черный цвет).

Изменение амплитуды флуоресцентного сигнала при увеличении мембранного потенциала с -60 мВ до 100 мВ при тестировании химерного белка Prestin-5 составило в среднем 1,23 % $\Delta F/F$ (Таблица 7).

Таблица 7. Амплитуда (а) и кинетические характеристики (б) флуоресцентного ответа в клетках HEK293T, трансфецированных конструкцией Prestin-5.

а

Измерение	$\Delta F/F$, %
1	0.5
2	0.36
3	2.4
4	2.7
5	0.48
6	0.95
Среднее	1.24
SEM	0.91

б

Измерение	τ_{on} , мс	τ_{off} , мс
1	0.471	1.8
2	1.045	1.7
3	0.2	1
Среднее	0.57	1.5
SEM	0.19	0.19

Экспериментальные кривые изменения интенсивности флуоресцентного сигнала при сдвиге мембранного потенциала аппроксимировали экспоненциальной функцией для расчета кинетических характеристик флуоресцентного ответа (Таблица 7, б).

Prestin-5 продемонстрировал существенно более узкий динамический диапазон флуоресцентного ответа, чем таковой для большинства ГКИМП последних поколений. В то же время его кинетические характеристики ($\tau_{on} = 0.57$ мс, $\tau_{off} = 1.50$ мс) сравнимы с характеристиками наиболее “быстрых” индикаторов на основе микробных опсинов и значительно выше таковых у существующих многодоменных ГКИМП, при этом Prestin-5 обладает положительным соотношением dF/dV , что является важным преимуществом для практического использования такого варианта флуоресцентного индикатора.

По полученным результатам мы можем судить о важности такого параметра, как длина междоменного линкерного мотива для создания ГКИМП. Отличие в один аминокислотный остаток в случае вариантов Prestin-4 и Prestin-6 приводит к полной потере индикаторных свойств по сравнению с Prestin-5. То есть изменение конформации престаина преобразуется в изменение флуоресцентного сигнала с разной эффективностью в зависимости от длины и состава междоменного аминокислотного линкера. Корреляция между длиной линкеров и свойствами белковых конструкций, в частности в случае ГКИМП, имеет нелинейный характер.

Так как для конструкции Prestin-5 зарегистрирован флуоресцентный ответ при функциональном тестировании, была осуществлена её экспрессия в первичной эмбриональной культуре нейронов мыши, с целью оценки уровня флуоресцентного сигнала и характера экспрессии в данной модельной системе. Трансфекция методом нуклеофекции нейронов осуществлялась сразу после выделения первичной культуры, далее через 9 дней после трансфекции проводили характеризацию клеток на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе (Рис. 27).

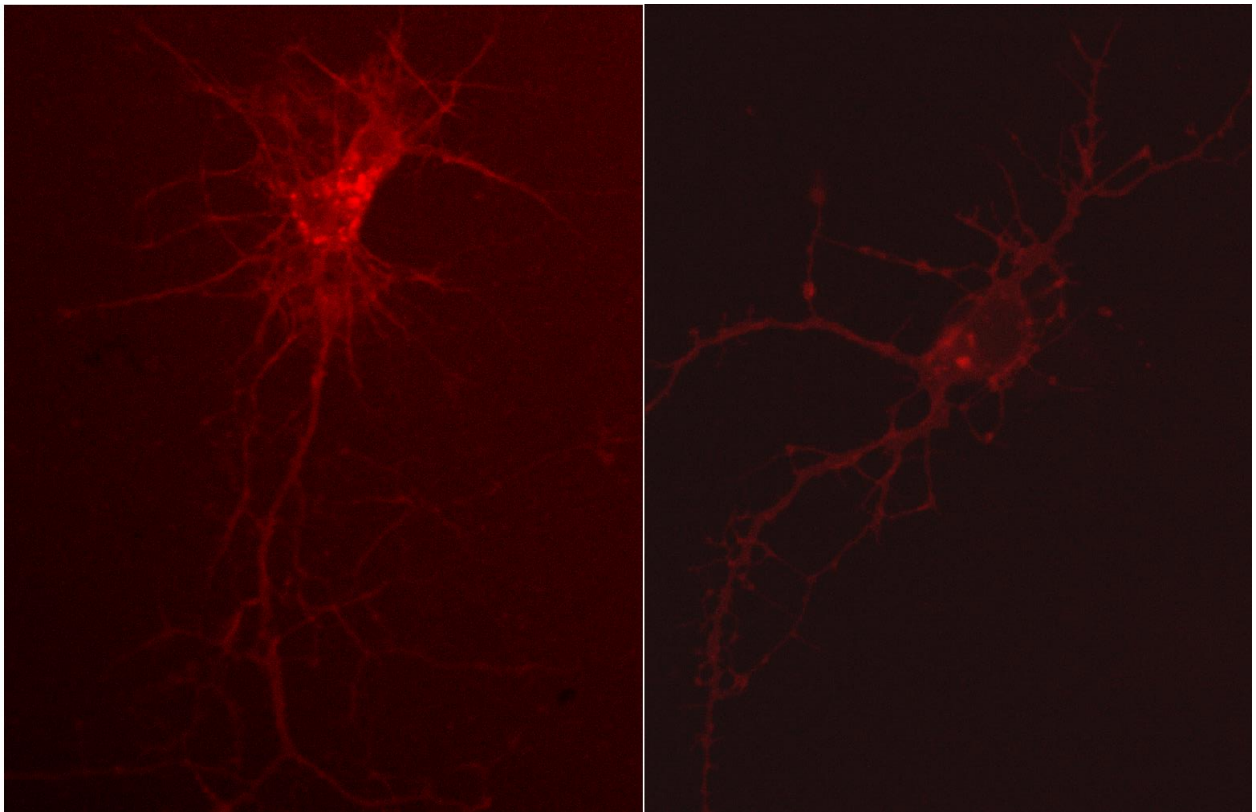


Рисунок 27. Конфокальное изображение, экспрессия Prestin-5 в первичной эмбриональной культуре нейронов мыши, 9ых день после трансфекции.

Трансфекция конструкции Prestin-5 в первичной эмбриональной культуре нейронов проходила с эффективностью 20%. Нейроны имели нормальную морфологию, наблюдалась преимущественно мембранная локализация химерного белка с присутствием в соме и в отростках небольших агрегатов флуоресцентного белка. Формирование таких агрегатов может быть следствием олигомеризации престилина. Данный эксперимент показывает

возможность успешной экспрессии Prestin-5 в культуре эмбриональных нейронов мышцы. Наблюдаемые результаты демонстрируют применимость конструкции Prestin-5 для задач, связанных с разрешением таких тонких деталей нейрональной структуры как дендриты.

3.6.в Топология «insertion of cpFP»

Трансмембранный домен престины претерпевает конформационные перестройки в ответ на изменение мембранного потенциала. По данным моделирования пространственной структуры престины [89], его трансмембранный домен включает в себя 14 трансмембранных сегментов, соединенных 13 петельными областями. Гидрофобные трансмембранные сегменты располагаются в мембране, поэтому для инсерции репортерного домена были предложены внемембранные петельные области, а также участок, соединяющий трансмембранный домен и внутриклеточный STAS-домен.

Петельные фрагменты, расположенные экстрацеллюлярно, во внеклеточном пространстве, мы обозначали буквой E (от external – внешний). Внемембранные петельные фрагменты, расположенные во внутриклеточном пространстве, обозначали буквой I (от англ. internal – внутренний), нумерация с N-конца. Участок соединения трансмембранного и STAS-домена, обозначали буквой S. Разработанная нами номенклатура петельных участков представлена на рисунке 28.

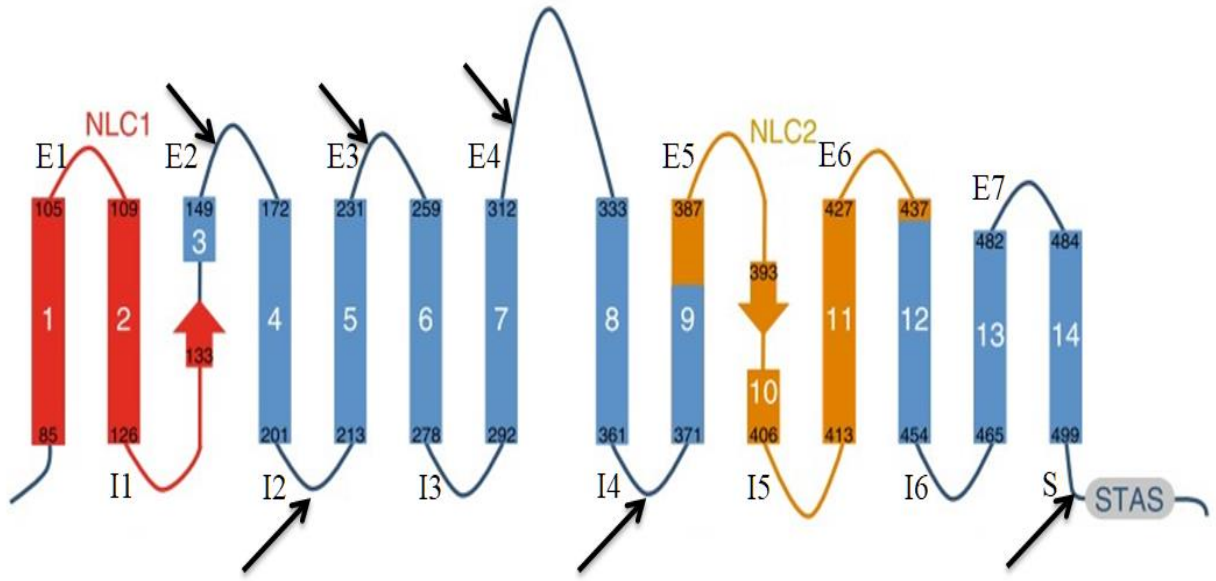


Рисунок 28. Принципиальная схема вторичной структуры молекулы престины [89]. Прямоугольники – ТМ α -спиральные участки, прямоугольники со стрелкой – β -листы, толстые линии обозначают петельные участки. Черные стрелки показывают положения инсерции ФБ cpFR189-188. S – область соединения ТМ домена и внутриклеточного STAS-домена.

NLC1 и NLC2 – области в молекуле престины, предположительно участвующие в осуществлении функции электроподвижности; при разработке химерных вариантов мы старались не затрагивать данные регионы, чтобы не нарушить нормального функционирования молекулы.

Топология «insertion of cpFP» была реализована нами в 6 вариантах конструкций, включающих две конструкции с инсерцией пермутированного ФБ во внутриклеточные немембранные петельные фрагменты (I2, I4), три конструкции с инсерцией во внеклеточные петельные участки (E2, E3, E4), а также конструкция с инсерцией в область между последним ТМ сегментом и STAS-доменом (S). Вариант топологии «insertion of cpFP» успешно применялся ранее при разработке молекулярных индикаторов, в частности в индикаторах мембранного потенциала ASAP [122].

Конструкции топологии «insertion of cpFP» создавались с помощью модульного клонирования MoClo на основе принципа Golden Gate [110] (Рис. 29). При амплификации N-концевой части гена претина, последовательности cpFR189-188 и C-концевой части гена претина использовались специфические олигонуклеотиды с сайтом рестрикции BpI, обеспечивающим «бесшовное» клонирование химерной кодирующей последовательности в векторе «нулевого» уровня (плазмида pICH41308) при помощи эндонуклеазы рестрикции IIS типа BpI. Экспрессионный вектор, содержащий регуляторные элементы и кодирующую последовательность из вектора «нулевого уровня», конструировали аналогично с помощью рестриктазы BsaI. Полученный вектор (на основе бэбона pICH47742) содержал последовательность цитомегаловирусного промотора (CMV) и терминатора SV40.

Результирующая конструкция секвенировалась и проходила транзientную трансфекцию для экспрессии в клетках линии HEK293T.

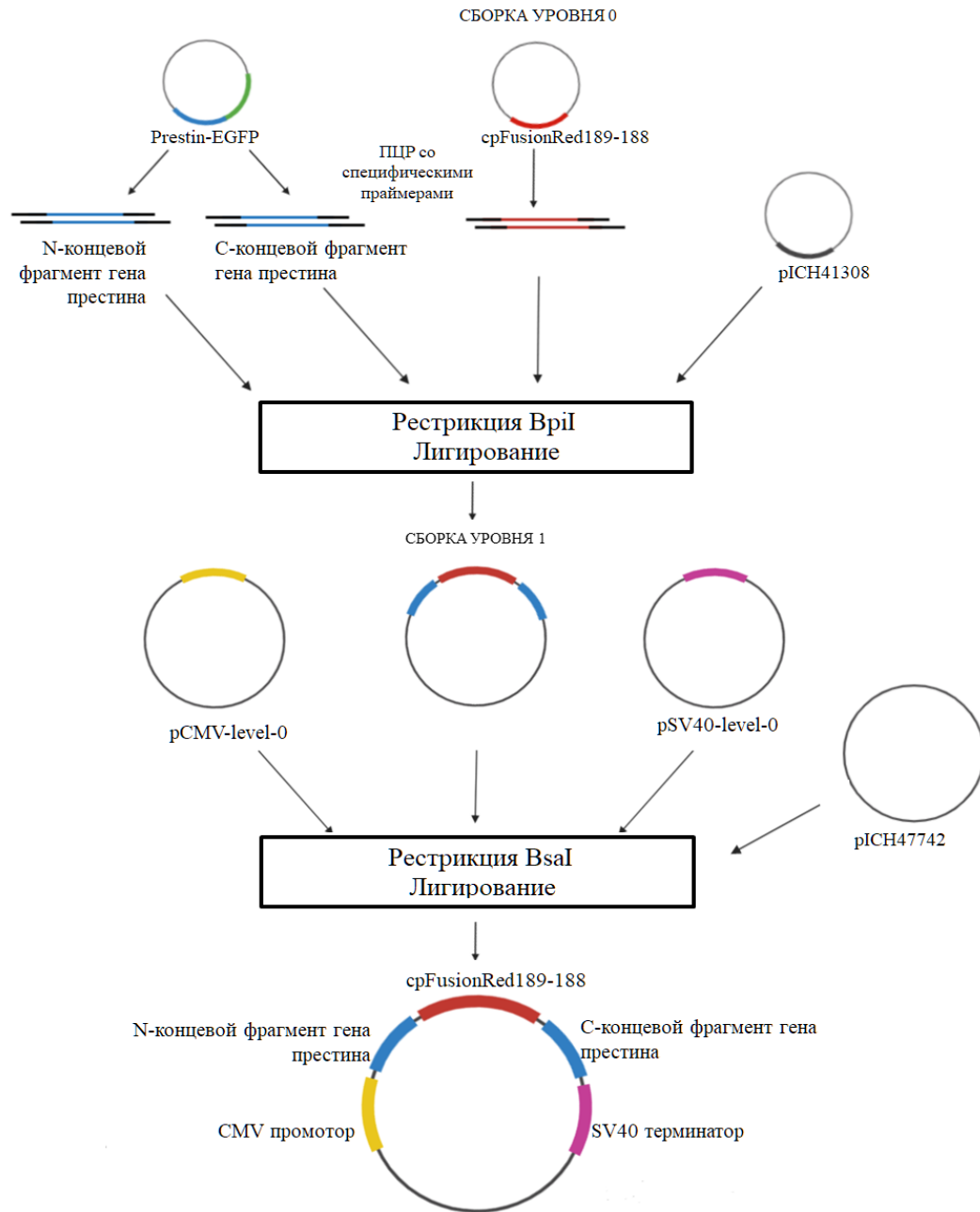


Рисунок 29. Принципиальная схема создания вариантов химерных конструкций на основе престина и *cpFR189-188* для реализации топологии «insertion of *cpFP*». Красным обозначена последовательность флуоресцентного белка *FusionRed*, синим последовательность престина, зеленым – последовательность *EGFP*, желтым *CMV*-промотор, а фиолетовым – *SV40*-терминатор.

Создан набор из 6 конструкций, их номенклатура и положения инсерции *cpFR189-188* в кодирующую последовательность престина представлены на рисунке 30.

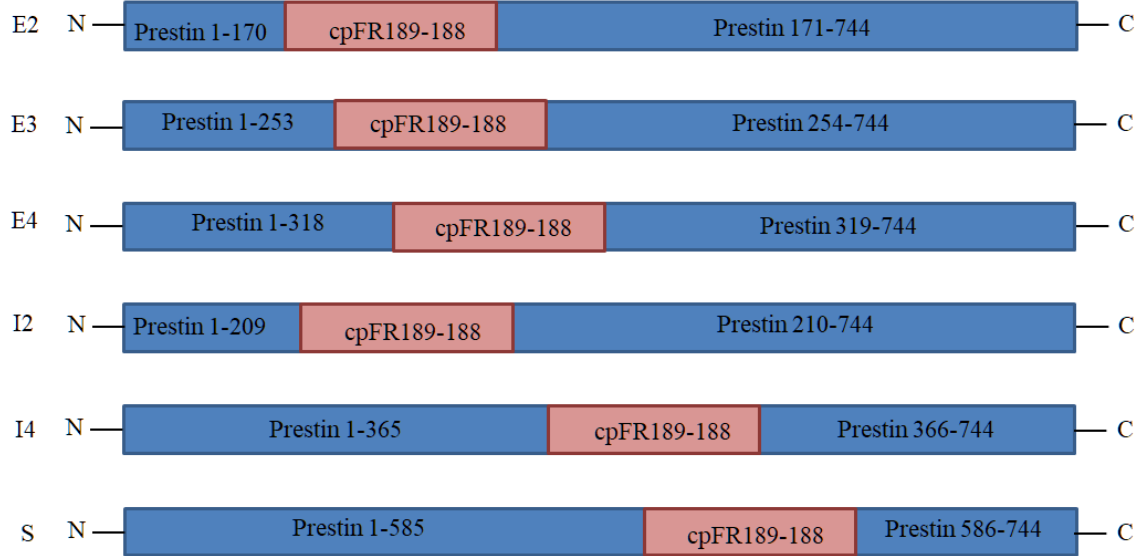


Рисунок 30. Схематическое изображение первичной последовательности химерных конструкций, реализующих топологию «insertion of cpFP». Последовательность cpFR189-188 (красный) располагается внутри первичной последовательности престины (синий).

E – обозначает петельные участки престины, располагающиеся во внеклеточном пространстве, *I* – внутриклеточные петельные участки престины. *S* – область в молекуле престины, соединяющая трансмембранный и цитоплазматический STAS-домены.

N-концевой фрагмент престины и пермутированный ФБ cpFR189-188 соединены линкером из 2 аминокислот (глицин и серин), так же и ФБ cpFR189-188 с C-концевым фрагментом престины (глицин и треонин). Полученные конструкции были транзientно трансфицированы для экспрессии в клетках линии HEK293T. Оценку уровня флуоресценции и локализации экспрессии химерных белков проводили через 48 ч после трансфекции (Рис. 31, 32).

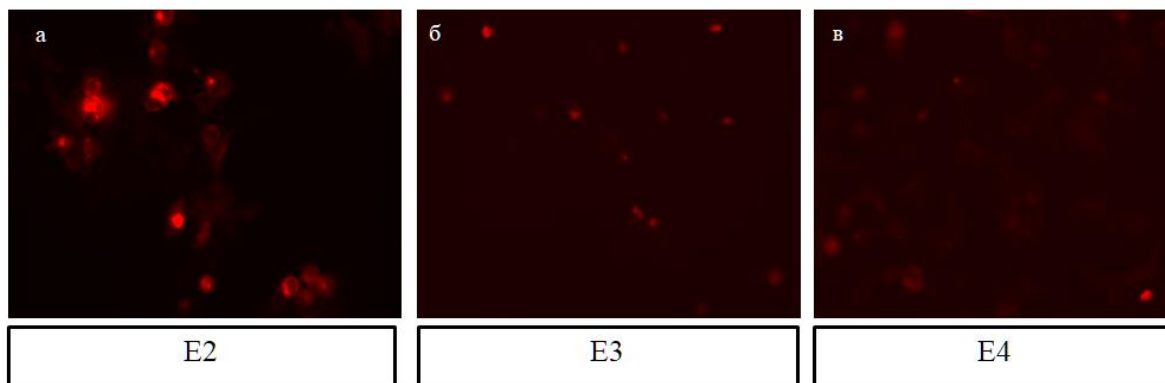


Рисунок 31. Флуоресцентные микрофотографии клеток линии HEK293T, экспрессирующие химерные белки (а) E2, (б) E3, (в) E4.

При инсерции ФБ srFR189-188 в наружные петельные участки молекулы претина (конструкции E2, E3, E4), наблюдался схожий характер экспрессии в клетках линии HEK293T (рис. 31). Низкая интенсивность флуоресценции сопровождалась формированием крупных агрегатов в цитоплазме. Помимо этого мы наблюдали патологически округлую морфологию клеток. Эти признаки могут указывать на токсичность конструкций.

Конструкции с инсерцией srFR189-188 во внутриклеточные петельные участки (I2, I4, S) демонстрировали среднюю интенсивность флуоресцентного сигнала и преимущественно мембранную локализацию (Рис. 32). Функциональное тестирование, однако, установило, что они не проявляют индикаторных свойств.

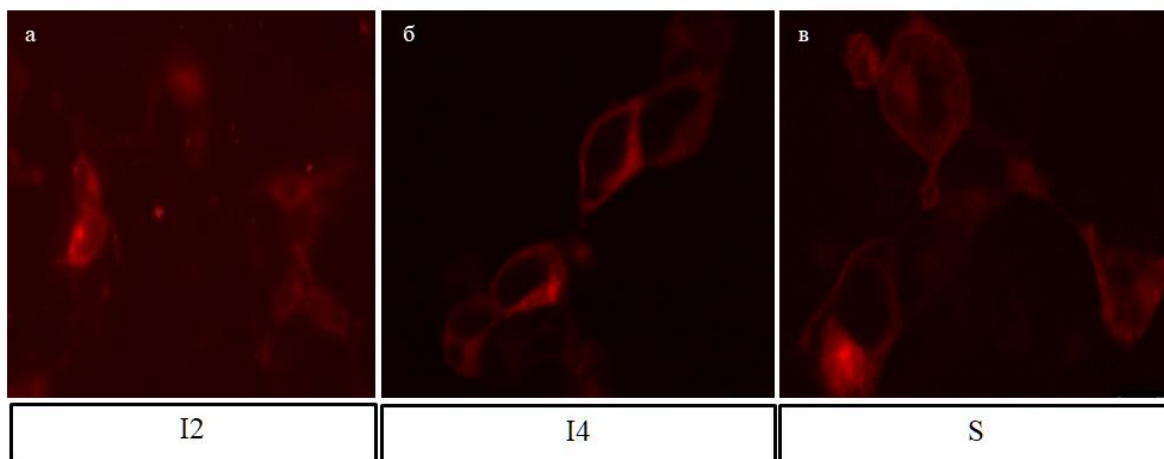


Рисунок 32. Флуоресцентные микрофотографии клеток линии HEK293T, трансфицированных конструкцией I2 (а), I4 (б), S (в).

Данные биоинформатического анализа и моделирования структуры престоина [89], на основании которых производился выбор позиций для инсерции флуоресцентного белка, имеют серьезные отличия от результатов криоэлектронной микроскопии, которые стали доступны недавно [80]. В результате, уточненные границы внеклеточных петельных фрагментов в ряде случаев не соответствовали предсказанным (Таблица 8). Так, 3-внеклеточная петля вместо ожидаемых 28 а.о. содержит всего 11 а.о., однако вариант химерного белка E3 с инсерцией в предполагаемую 3-петлю (позиции аминокислотных остатков, а.о. 227-238) оказался расположен в следующей внеклеточной области (4-внеклеточная петля 249-264 а.о.). Вероятно, позиция 253 (по исходной нумерации аминокислотной последовательности престоина), располагается критически близко к началу ТМ-домена, и наблюдаемая агрегация и накопление в комплексе Гольджи при экспрессии варианта E3 является результатом нарушенного фолдинга данного химерного белка.

Таблица 8. Границы внеклеточных петельных областей и позиция инсерции ФБ в эти области при создании химерных вариантов в топологии «insertion of cpFP».

Внеклеточная петельная область	Предсказанная область внеклеточного фрагмента**	Область внеклеточного фрагмента по данным криоэлектронной микроскопии***	Позиция инсерции ФБ
E2	149 – 172	227 – 238	170
E3	231 – 259	249 – 264	253
E4	312 – 333	249 – 246	318
E5*	387 – 363	301 – 340	Не планировалась
I2	201 – 213	200 – 201	209
I4	361 – 371	361 – 372	365
S	499 – 744	495 – 744	585

*конструкция E5 не разрабатывалась, данные о позиции этой внеклеточной области приведены для наглядности. ** нумерация аминокислотных остатков по последовательности протина в соответствии с [89], *** данные по кристаллической структуре протина PDB:7LGU [80].

Также при конструировании варианта I2 предполагаемая инсерция во вторую внутриклеточную петлю планировалась в центре внеклеточного фрагмента (предполагаемые границы 201-213, позиция инсерции 209), однако по уточненным в соответствии с реальной структурой границам данной петли (200-210 а.о.) ФБ оказался на самом краю внеклеточной области, что также приводит к нарушению его рабочих характеристик. Для варианта I2, при наличии мембранной локализации и частичной агрегации белка в цитоплазме, функциональное тестирование не показало достоверного флуоресцентного ответа при сдвиге мембранного потенциала.

Помимо взаимного расположения доменов и корректного сворачивания их третичной структуры, серьезный вклад в наличие индикаторных свойств у полученных химерных конструкторов вносят также соединяющие функциональные домены линкеры. Избыточная для данной системы гибкость линкеров может приводить к снижению эффективности передачи потенциал-индуцируемых конформационных подвижек протина к хромофору ФБ, в результате чего система теряет способность к изменению флуоресценции в ответ на сдвиг потенциала. Для решения этой проблемы необходима оптимизация длины и состава междоменных линкерных последовательностей.

4. Заключение

В рамках настоящей работы реализован практически полный спектр задач, с которыми сталкиваются исследователи при разработке генетически кодируемого индикатора мембранного потенциала.

Мы осуществили генноинженерную оптимизацию красного флуоресцентного белка FusionRed для использования его в роли репортерного домена генетически кодируемых индикаторов разных топологических архитектур.

На основе бимолекулярного варианта FusionRed189-188 мы сконструировали индикатор мембранного потенциала, сочетающий в себе функциональные домены в новой для флуоресцентных индикаторов топологической комбинации («insertion-into-cpFP»). Дальнейшая оптимизация индикатора VSD-FR189-188 позволила достичь субмиллисекундной кинетики флуоресцентного ответа на сдвиг мембранного потенциала, увеличив скорость отклика индикатора в 25-30 раз. При изучении роли длины и состава междоменного линкера, соединяющего чувствительный и репортерный домены индикатора, в детерминировании характеристик VSD-FR189-188 нами был обнаружен ранее неизвестный путь смены полярности (dF/dV) флуоресцентного ответа индикатора. Это наблюдение представляет интерес не только при создании ГКИМП, но и для разработки широкого круга молекулярных инструментов на основе флуоресцентных белков.

В данной работе мы впервые применили электроподвижный белок млекопитающих престин в роли нового потенциал-чувствительного домена ГКИМП. Мы создали набор конструкций на основе престина и красного флуоресцентного белка FusionRed в трех топологических вариантах соединения данных белковых доменов. При экспрессии полученных химерных белков один из вариантов, реализующих предложенную нами ранее топологическую комбинацию «insertion-into-cpFP» – Prestin-5 – продемонстрировал индикаторные характеристики в ходе электрофизиологического тестирования. Флуоресцентный ответ этого ГКИМП имеет довольно узкий динамический диапазон (1.23% $\Delta F/F$), однако кинетические характеристики ($\tau_{on} = 0.57$ мс, $\tau_{off} = 1.50$ мс) ставят Prestin-5 в один ряд с лучшими на данный момент вариантами ГКИМП на основе микробных опсинов. Prestin-5 был успешно

экспрессирован в первичной эмбриональной культуре нейронов мышцы. По совокупности описанных характеристик полученных химерных молекул можно с уверенностью говорить о том, что электроподвижный белок престин принципиально пригоден для применения в качестве потенциал-чувствительного ядра ГКИМП.

5. ВЫВОДЫ

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

6. Список цитированной литературы

1. Lewis Galvani An Account of the Experiments and Discoveries of Lewis Galvani, Professor of Anatomy at Bologna, Relative to the Powers of Electricity in Muscular Motion: Vide Aloysii Galvani de Viribus Electricitatis in Motu Musculari Commentarium. 4to.//Medical Facts and Observations, 1792, Vol. 3, P. 180-190.
2. Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve//The Journal of Physiology, 1952, Vol. 117, No. 4, P. 500-544.
3. Sakmann B., Neher E. Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes//Annual Review of Physiology, 1984, Vol. 46, P. 455-472.
4. Thiébaud P., de Rooij N.F., Koudelka-Hep M., Stoppini L. Microelectrode arrays for electrophysiological monitoring of hippocampal organotypic slice cultures//IEEE transactions on bio-medical engineering, 1997, Vol. 44, No. 11, P. 1159-1163.
5. Anecchino L.A., Schultz S.R. Progress in automating patch clamp cellular physiology//Brain and Neuroscience Advances, 2018, Vol. 2, P.1-16.
6. Desai N.S., Siegel J.J., Taylor W., Chitwood R.A., Johnston D. MATLAB-based automated patch-clamp system for awake behaving mice//Journal of Neurophysiology, 2015, Vol. 114, No. 2, P. 1331-1345.
7. Liu P., Miller E.W. Electrophysiology, Unplugged: Imaging Membrane Potential with Fluorescent Indicators//Accounts of Chemical Research, 2020, Vol. 53, Electrophysiology, Unplugged, No. 1, P. 11-19.
8. Miller E.W. Small molecule fluorescent voltage indicators for studying membrane potential//Current Opinion in Chemical Biology, 2016, Vol. 33, P. 74-80.
9. Cohen L.B., Keynes R.D., Hille B. Light scattering and birefringence changes during nerve activity//Nature, 1968, Vol. 218, No. 5140, P. 438-441.
10. Lerman L., Watanabe A., Tasaki I. Intracellular perfusion of squid giant axons: recent findings and interpretations//Neurosciences Research, 1969, Vol. 2, , P. 71-109.
11. Braubach O., Cohen L.B., Choi Y. Historical Overview and General Methods of Membrane Potential Imaging//Advances in experimental medicine and biology. – 2015. – Vol. 859. – P. 3-26.
12. Iijima T., Witter M.P., Ichikawa M., Tominaga T., Kajiwara R., Matsumoto G. Entorhinal-hippocampal interactions revealed by real-time imaging, 1996, Vol. 272, No. 5265, P. 1176-1179.
13. Zhou W.-L., Yan P., Wuskell J.P., Loew L.M., Antic S.D. Intracellular long-wavelength voltage-sensitive dyes for studying the dynamics of action potentials in axons and thin dendrites//Journal of Neuroscience Methods, 2007, Vol. 164, No. 2, P. 225-239.

14. Wang S., Li B., Zhang F. Molecular Fluorophores for Deep-Tissue Bioimaging//ACS central science, 2020, Vol. 6, No. 8, P. 1302-1316.
15. Peterka D.S., Takahashi H., Yuste R. Imaging voltage in neurons//Neuron, 2011, Vol. 69, No. 1, P. 9-21.
16. Kwon T., Sakamoto M., Peterka D.S., Yuste R. Attenuation of Synaptic Potentials in Dendritic Spines//Cell Reports, 2017, Vol. 20, No. 5, P. 1100-1110.
17. Rohr S., Salzberg B.M. Multiple site optical recording of transmembrane voltage (MSORTV) in patterned growth heart cell cultures: assessing electrical behavior, with microsecond resolution, on a cellular and subcellular scale//Biophysical Journal, 1994, Vol. 67, No. 3, P. 1301-1315.
18. Matiukas A., Mitrea B.G., Qin M., Pertsov A.M., Shvedko A.G., Warren M.D., Zaitsev A.V., Wuskell J.P., Wei M., Watras J., Loew L.M. Near-infrared voltage-sensitive fluorescent dyes optimized for optical mapping in blood-perfused myocardium//Heart Rhythm, 2007, Vol. 4, No. 11, P. 1441-1451.
19. Lundby A., Akemann W., Knöpfel T. Biophysical characterization of the fluorescent protein voltage probe VSFP2.3 based on the voltage-sensing domain of Ci-VSP//European biophysics journal : EBJ, 2010, Vol. 39, No. 12, P. 1625-35.
20. Nakajima R., Laskaris N., Rhee J.K., Baker B.J., Kosmidis E.K. GEVI cell-type specific labelling and a manifold learning approach provide evidence for lateral inhibition at the population level in the mouse hippocampal CA1 area//The European Journal of Neuroscience, 2021, Vol. 53, No. 9, P. 3019-3038.
21. Bayguinov P.O., Ma Y., Gao Y., Zhao X., Jackson M.B. Imaging Voltage in Genetically Defined Neuronal Subpopulations with a Cre Recombinase-Targeted Hybrid Voltage Sensor//The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience, 2017, Vol. 37, No. 38, P. 9305-9319.
22. Jin L., Han Z., Platasa J., Wooltorton J.R.A., Cohen L.B., Pieribone V.A. Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe//Neuron, 2012, Vol. 75, No. 5, P. 779-785.
23. Ma Y., Bayguinov P.O., Jackson M.B. Action Potential Dynamics in Fine Axons Probed with an Axonally Targeted Optical Voltage Sensor//eNeuro, 2017, Vol. 4, No. 4, P. 7 1–13.
24. Yang H.H., St-Pierre F., Sun X., Ding X., Lin M.Z., Clandinin T.R. Subcellular Imaging of Voltage and Calcium Signals Reveals Neural Processing In Vivo//Cell, 2016, Vol. 166, No. 1, P. 245-257.
25. Piatkevich K.D., Bensussen S., Tseng H.-A., Shroff S.N., Lopez-Huerta V.G., Park D., Jung E.E., Shemesh O.A., Straub C., Gritton H.J., Romano M.F., Costa E., Sabatini B.L., Fu Z., Boyden E.S., Han X. Population imaging of neural activity in awake behaving mice//Nature, 2019, Vol. 574, No. 7778, P. 413-417.

26. Kralj J.M., Douglass A.D., Hochbaum D.R., Maclaurin D., Cohen A.E. Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin//*Nature Methods*, 2011, Vol. 9, No. 1, P. 90-95.
27. Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins//*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, Vol. 96, No. 20, P. 11241-11246.
28. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W., Prasher D. Green fluorescent protein as a marker for gene expression//*Science*, 1994, Vol. 263, No. 5148, P. 802-805.
29. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues//*Physiological Reviews*, 2010, Vol. 90, No. 3, P. 1103-1163.
30. Miesenböck G., De Angelis D.A., Rothman J.E. Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins//*Nature*, 1998, Vol. 394, No. 6689, P. 192-195.
31. Piao H.H., Rajakumar D., Kang B.E., Kim E.H., Baker B.J. Combinatorial mutagenesis of the voltage-sensing domain enables the optical resolution of action potentials firing at 60 Hz by a genetically encoded fluorescent sensor of membrane potential//*The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2015, Vol. 35, No. 1, P. 372-385.
32. Lundby A., Mutoh H., Dimitrov D., Akemann W., Knöpfel T. Engineering of a genetically encodable fluorescent voltage sensor exploiting fast Ci-VSP voltage-sensing movements//*PloS One*, 2008, Vol. 3, No. 6, P. e2514.
33. Siegel M.S., Isacoff E.Y. A genetically encoded optical probe of membrane voltage//*Neuron*, 1997, Vol. 19, No. 4, P. 735-741.
34. Ataka K., Pieribone V.A. A genetically targetable fluorescent probe of channel gating with rapid kinetics//*Biophysical Journal*, 2002, Vol. 82, No. 1 Pt 1, P. 509-516.
35. Abdelfattah A.S., Farhi S.L., Zhao Y., Brinks D., Zou P., Ruangkittisakul A., Platisa J., Pieribone V.A., Ballanyi K., Cohen A.E., Campbell R.E. A Bright and Fast Red Fluorescent Protein Voltage Indicator That Reports Neuronal Activity in Organotypic Brain Slices//*The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2016, Vol. 36, No. 8, P. 2458-2472.
36. Barnett L., Platisa J., Popovic M., Pieribone V.A., Hughes T. A fluorescent, genetically-encoded voltage probe capable of resolving action potentials//*PloS One*, 2012, Vol. 7, No. 9, P. e43454.
37. Abdelfattah A.S., Rancic V., Rawal B., Ballanyi K., Campbell R.E. Ratiometric and photoconvertible fluorescent protein-based voltage indicator prototypes//*Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2016, Vol. 52, No. 98, P. 14153-14156.
38. Kost L.A., Nikitin E.S., Ivanova V.O., Sung U., Putintseva E.V., Chudakov D.M., Balaban P.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. Insertion of the voltage-sensitive domain into circularly permuted

- red fluorescent protein as a design for genetically encoded voltage sensor//PloS One, 2017, Vol. 12, No. 9, P. e0184225.
39. Кост Л., Юнусова В., Иванова В., Никитин Е., Лукьянов К., Богданов А. Электроподвижный белок престин как чувствительное ядро флуоресцентного индикатора мембранного потенциала, *Биоорганическая химия*, 2021, принята к печати.
40. Baker B.J., Lee H., Pieribone V.A., Cohen L.B., Isacoff E.Y., Knopfel T., Kosmidis E.K. Three fluorescent protein voltage sensors exhibit low plasma membrane expression in mammalian cells//*Journal of Neuroscience Methods*, 2007, Vol. 161, No. 1, P. 32-38.
41. Gradinaru V., Zhang F., Ramakrishnan C., Mattis J., Prakash R., Diester I., Goshen I., Thompson K.R., Deisseroth K. Molecular and cellular approaches for diversifying and extending optogenetics//*Cell*, 2010, Vol. 141, No. 1, P. 154-165.
42. Han Z., Jin L., Platisa J., Cohen L.B., Baker B.J., Pieribone V.A. Fluorescent protein voltage probes derived from ArcLight that respond to membrane voltage changes with fast kinetics//*PloS One*, 2013, Vol. 8, No. 11, P. e81295.
43. Sjulson L., Miesenböck G. Rational optimization and imaging in vivo of a genetically encoded optical voltage reporter//*The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2008, Vol. 28, No. 21, P. 5582-5593.
44. Binggeli R., Weinstein R.C. Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions//*Journal of Theoretical Biology*, 1986, Vol. 123, No. 4, P. 377-401.
45. Bradshaw R.A., Stahl P., eds. *Encyclopedia of cell biology*. – Waltham, MA: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016. – 4 p.
46. Lukyanov K.A., Belousov V.V. Genetically encoded fluorescent redox sensors//*Biochimica Et Biophysica Acta*, 2014, Vol. 1840, No. 2, P. 745-756.
47. Flytzanis N.C., Bedbrook C.N., Chiu H., Engqvist M.K.M., Xiao C., Chan K.Y., Sternberg P.W., Arnold F.H., Gradinaru V. Archaelhodopsin variants with enhanced voltage-sensitive fluorescence in mammalian and *Caenorhabditis elegans* neurons//*Nature Communications*, 2014, Vol. 5, P. 4894.
48. Hochbaum D.R., Zhao Y., Farhi S.L., Klapoetke N., Werley C.A., Kapoor V., Zou P., Kralj J.M., Maclaurin D., Smedemark-Margulies N., Saulnier J.L., Boulting G.L., Straub C., Cho Y.K., Melkonian M., Wong G.K.-S., Harrison D.J., Murthy V.N., Sabatini B.L., Boyden E.S., Campbell R.E., Cohen A.E. All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins//*Nature Methods*, 2014, Vol. 11, No. 8, P. 825-833.
49. Bando Y., Sakamoto M., Kim S., Ayzenshtat I., Yuste R. Comparative Evaluation of Genetically Encoded Voltage Indicators//*Cell Reports*, 2019, Vol. 26, No. 3, P. 802-813.e4.

50. Milosevic M.M., Jang J., McKimm E.J., Zhu M.H., Antic S.D. In Vitro Testing of Voltage Indicators: Archon1, ArcLightD, ASAP1, ASAP2s, ASAP3b, Bongwoori-Pos6, BeRST1, FlicR1, and Chi-VSFP-Butterfly//eNeuro, 2020, Vol. 7, , No. 5.
51. Wang B., Ke W., Guang J., Chen G., Yin L., Deng S., He Q., Liu Y., He T., Zheng R., Jiang Y., Zhang X., Li T., Luan G., Lu H.D., Zhang M., Zhang X., Shu Y. Firing Frequency Maxima of Fast-Spiking Neurons in Human, Monkey, and Mouse Neocortex//Frontiers in Cellular Neuroscience, 2016, Vol. 10, P. 239.
52. Adam Y., Kim J.J., Lou S., Zhao Y., Xie M.E., Brinks D., Wu H., Mostajo-Radji M.A., Kheifets S., Parot V., Chettih S., Williams K.J., Gmeiner B., Farhi S.L., Madisen L., Buchanan E.K., Kinsella I., Zhou D., Paninski L., Harvey C.D., Zeng H., Arlotta P., Campbell R.E., Cohen A.E. Voltage imaging and optogenetics reveal behaviour-dependent changes in hippocampal dynamics//Nature, 2019, Vol. 569, No. 7756, P. 413-417.
53. Gong Y., Huang C., Li J.Z., Grewe B.F., Zhang Y., Eismann S., Schnitzer M.J. High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor//Science (New York, N.Y.), 2015, Vol. 350, No. 6266, P. 1361-1366.
54. Kannan M., Vasan G., Huang C., Haziza S., Li J.Z., Inan H., Schnitzer M.J., Pieribone V.A. Fast, in vivo voltage imaging using a red fluorescent indicator//Nature Methods, 2018, Vol. 15, No. 12, P. 1108-1116.
55. Platasa J., Vasan G., Yang A., Pieribone V.A. Directed Evolution of Key Residues in Fluorescent Protein Inverses the Polarity of Voltage Sensitivity in the Genetically Encoded Indicator ArcLight//ACS chemical neuroscience, 2017, Vol. 8, No. 3, P. 513-523.
56. Katayama H., Yamamoto A., Mizushima N., Yoshimori T., Miyawaki A. GFP-like proteins stably accumulate in lysosomes//Cell Structure and Function, 2008, Vol. 33, No. 1, P. 1-12.
57. Hirrlinger P.G., Scheller A., Braun C., Quintela-Schneider M., Fuss B., Hirrlinger J., Kirchhoff F. Expression of reef coral fluorescent proteins in the central nervous system of transgenic mice//Molecular and Cellular Neurosciences, 2005, Vol. 30, No. 3, P. 291-303.
58. Akemann W., Mutoh H., Perron A., Park Y.K., Iwamoto Y., Knöpfel T. Imaging neural circuit dynamics with a voltage-sensitive fluorescent protein//Journal of Neurophysiology, 2012, Vol. 108, No. 8, P. 2323-2337.
59. Cho J.-H., Swanson C.J., Chen J., Li A., Lippert L.G., Boye S.E., Rose K., Sivaramakrishnan S., Chuong C.-M., Chow R.H. The GCaMP-R Family of Genetically Encoded Ratiometric Calcium Indicators//ACS Chemical Biology, 2017, Vol. 12, No. 4, P. 1066-1074.
60. Cao G., Platasa J., Pieribone V.A., Raccuglia D., Kunst M., Nitabach M.N. Genetically targeted optical electrophysiology in intact neural circuits//Cell, 2013, Vol. 154, No. 4, P. 904-913.
61. Kang B.E., Baker B.J. Pado, a fluorescent protein with proton channel activity can optically monitor membrane potential, intracellular pH, and map gap junctions//Scientific Reports, 2016, Vol. 6, P. 23865.

62. Chanda B., Blunck R., Faria L.C., Schweizer F.E., Mody I., Bezanilla F. A hybrid approach to measuring electrical activity in genetically specified neurons//*Nature Neuroscience*, 2005, Vol. 8, No. 11, P. 1619-1626.
63. Dimitrov D., He Y., Mutoh H., Baker B.J., Cohen L., Akemann W., Knöpfel T. Engineering and characterization of an enhanced fluorescent protein voltage sensor//*PloS One*, 2007, Vol. 2, No. 5, P. e440.
64. St-Pierre F., Marshall J.D., Yang Y., Gong Y., Schnitzer M.J., Lin M.Z. High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor//*Nature Neuroscience*, 2014, Vol. 17, No. 6, P. 884-889.
65. Wu J., Liang Y., Chen S., Hsu C.-L., Chavarha M., Evans S.W., Shi D., Lin M.Z., Tsia K.K., Ji N. Kilohertz two-photon fluorescence microscopy imaging of neural activity in vivo//*Nature Methods*, 2020, Vol. 17, No. 3, P. 287-290.
66. Bèjà O., Aravind L., Koonin E.V., Suzuki M.T., Hadd A., Nguyen L.P., Jovanovich S.B., Gates C.M., Feldman R.A., Spudich J.L., Spudich E.N., DeLong E.F. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea//*Science (New York, N.Y.)*, 2000, Vol. 289, No. 5486, P. 1902-1906.
67. Bèjà O., Spudich E.N., Spudich J.L., Leclerc M., DeLong E.F. Proteorhodopsin phototrophy in the ocean//*Nature*, 2001, Vol. 411, No. 6839, P. 786-789.
68. Kralj J.M., Hochbaum D.R., Douglass A.D., Cohen A.E. Electrical spiking in *Escherichia coli* probed with a fluorescent voltage-indicating protein//*Science (New York, N.Y.)*, 2011, Vol. 333, No. 6040, P. 345-348.
69. Gong Y., Wagner M.J., Zhong Li J., Schnitzer M.J. Imaging neural spiking in brain tissue using FRET-opsin protein voltage sensors//*Nature Communications*, 2014, Vol. 5, P. 3674.
70. Piatkevich K.D., Jung E.E., Straub C., Linghu C., Park D., Suk H.-J., Hochbaum D.R., Goodwin D., Pnevmatikakis E., Pak N., Kawashima T., Yang C.-T., Rhoades J.L., Shemesh O., Asano S., Yoon Y.-G., Freifeld L., Saulnier J.L., Riegler C., Engert F., Hughes T., Drobizhev M., Szabo B., Ahrens M.B., Flavell S.W., Sabatini B.L., Boyden E.S. A robotic multidimensional directed evolution approach applied to fluorescent voltage reporters//*Nature Chemical Biology*, 2018, Vol. 14, No. 4, P. 352-360.
71. Mishina Y., Mutoh H., Song C., Knöpfel T. Exploration of genetically encoded voltage indicators based on a chimeric voltage sensing domain//*Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2014, Vol. 7, P. 78.
72. Mishina Y., Mutoh H., Knöpfel T. Transfer of Kv3.1 voltage sensor features to the isolated Ci-VSP voltage-sensing domain//*Biophysical Journal*, 2012, Vol. 103, No. 4, P. 669-676.
73. Zhu M.H., Jang J., Milosevic M.M., Antic S.D. Population imaging discrepancies between a genetically-encoded calcium indicator (GECI) versus a genetically-encoded voltage indicator (GEVI)//*Scientific Reports*, 2021, Vol. 11, No. 1, P. 5295.

74. Song C., Piscopo D.M., Niell C.M., Knöpfel T. Cortical signatures of wakeful somatosensory processing//*Scientific Reports*, 2018, Vol. 8, No. 1, P. 11977.
75. Atasoy D., Sternson S.M. Chemogenetic Tools for Causal Cellular and Neuronal Biology//*Physiological Reviews*, 2018, Vol. 98, No. 1, P. 391-418.
76. Zheng J., Shen W., He D.Z., Long K.B., Madison L.D., Dallos P. Prestin is the motor protein of cochlear outer hair cells//*Nature*, 2000, Vol. 405, No. 6783, P. 149-155.
77. Zhang X.-D., Thai P.N., Ren L., Perez Flores M.C., Ledford H.A., Park S., Lee J.H., Sihm C.-R., Chang C.-W., Chen W.C., Timofeyev V., Zuo J., Chan J.W., Yamoah E.N., Chiamvimonvat N. Prestin amplifies cardiac motor functions//*Cell Reports*, 2021, Vol. 35, No. 5, P. 109097.
78. He D.Z.Z., Jia S., Sato T., Zuo J., Andrade L.R., Riordan G.P., Kachar B. Changes in plasma membrane structure and electromotile properties in prestin deficient outer hair cells//*Cytoskeleton*, 2009, P. 1-23.
79. Fettiplace R. Hair Cell Transduction, Tuning, and Synaptic Transmission in the Mammalian Cochlea//*Comprehensive Physiology*, 2017, Vol. 7, No. 4, P. 1197-1227.
80. Ge J., Elferich J., Dehghani-Ghahnaviyeh S., Zhao Z., Meadows M., von Gersdorff H., Tajkhorshid E., Gouaux E. Molecular mechanism of prestin electromotile signal amplification//*Cell*, 2021, Vol. 184, No. 18, P. 4669-4679.e13.
81. Cryo-EM Structures of Prestin and the Molecular Basis of Outer Hair Cell Electromotility : preprint/*Neuroscience*. Bavi N., Clark M.D., Contreras G.F., Shen R., Reddy B., Milewski W., Perozo E., 08.08.2021.
82. Chi X., Jin X., Chen Y., Lu X., Tu X., Li X., Zhang Y., Lei J., Huang J., Huang Z., Zhou Q., Pan X. Structural insights into the gating mechanism of human SLC26A9 mediated by its C-terminal sequence//*Cell Discovery*, 2020, Vol. 6, No. 1, P. 55.
83. Walter J.D., Sawicka M., Dutzler R. Cryo-EM structures and functional characterization of murine Slc26a9 reveal mechanism of uncoupled chloride transport//*eLife*, 2019, Vol. 8, P. e46986.
84. Zhai F., Song L., Bai J.-P., Dai C., Navaratnam D., Santos-Sacchi J. Maturation of Voltage-induced Shifts in SLC26a5 (Prestin) Operating Point during Trafficking and Membrane Insertion//*Neuroscience*, 2020, Vol. 431, P. 128-133.
85. Oliver D., He D.Z., Klöcker N., Ludwig J., Schulte U., Waldegger S., Ruppertsberg J.P., Dallos P., Fakler B. Intracellular anions as the voltage sensor of prestin, the outer hair cell motor protein//*Science*, 2001, Vol. 292, No. 5525, P. 2340-2343.
86. Rybalchenko V., Santos-Sacchi J. Allosteric modulation of the outer hair cell motor protein prestin by chlorid//*Biophysics of the Cochlea Proceedings of the International Symposium*. – Titisee, Germany: WORLD SCIENTIFIC, 2003. – P. 116-126.

87. Lu F., Li S., Jiang Y., Jiang J., Fan H., Lu G., Deng D., Dang S., Zhang X., Wang J., Yan N. Structure and mechanism of the uracil transporter UraA//*Nature*, 2011, Vol. 472, No. 7342, P. 243-246.
88. Alguet Y., Amillis S., Leung J., Lambrinidis G., Capaldi S., Scull N.J., Craven G., Iwata S., Armstrong A., Mikros E., Diallinas G., Cameron A.D., Byrne B. Structure of eukaryotic purine/H⁺ symporter UapA suggests a role for homodimerization in transport activity//*Nature Communications*, 2016, Vol. 7, No. 1, P. 11336.
89. Gorbunov D., Sturlese M., Nies F., Kluge M., Bellanda M., Battistutta R., Oliver D. Molecular architecture and the structural basis for anion interaction in prestin and SLC26 transporters//*Nature Communications*, 2014, Vol. 5, P. 3622.
90. Shimomura O. Structure of the chromophore of Aequorea green fluorescent protein//*FEBS Letters*, 1979, Vol. 104, No. 2, P. 220-222.
91. Cox G., ed. *Fundamentals of Fluorescence Imaging*. – 1. – Jenny Stanford Publishing, 2019.
92. Lister T., Wright P.A., Chappell P.H. Optical properties of human skin//*Journal of Biomedical Optics*, 2012, Vol. 17, No. 9, P. 90901-90901.
93. Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldrige K.K., Tsien R.Y. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral//*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, Vol. 97, No. 22, P. 11990-11995.
94. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species//*Nature Biotechnology*, 1999, Vol. 17, No. 10, P. 969-973.
95. Strack R.L., Strongin D.E., Mets L., Glick B.S., Keenan R.J. Chromophore formation in DsRed occurs by a branched pathway//*Journal of the American Chemical Society*, 2010, Vol. 132, No. 24, P. 8496-8505.
96. Subach F.V., Verkhusha V.V. Chromophore transformations in red fluorescent proteins//*Chemical Reviews*, 2012, Vol. 112, No. 7, P. 4308-4327.
97. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues//*Physiological Reviews*, 2010, Vol. 90, No. 3, P. 1103-1163.
98. Day R.N., Davidson M.W. The fluorescent protein palette: tools for cellular imaging//*Chemical Society Reviews*, 2009, Vol. 38, The fluorescent protein palette, No. 10, P. 2887-2921.
99. Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Lukyanov K.A., Bogdanova E.A., Zaraisky A.G., Lukyanov S., Chudakov D.M. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging//*Nature Methods*, 2007, Vol. 4, No. 9, P. 741-746.

100. Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Chepurnykh T.V., Shcheglov A.S., Verkhusha V.V., Pletnev V.Z., Hazelwood K.L., Roche P.M., Lukyanov S., Zaraisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M. Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues//The Biochemical Journal, 2009, Vol. 418, No. 3, P. 567-574.
101. Shemiakina I.I., Ermakova G.V., Cranfill P.J., Baird M.A., Evans R.A., Souslova E.A., Staroverov D.B., Gorokhovatsky A.Y., Putintseva E.V., Gorodnicheva T.V., Chepurnykh T.V., Strukova L., Lukyanov S., Zaraisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M., Shcherbo D. A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity//Nature Communications, 2012, Vol. 3, P. 1204.
102. Nakai J., Ohkura M., Imoto K. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein//Nature Biotechnology, 2001, Vol. 19, No. 2, P. 137-141.
103. Kost L.A., Putintseva E.V., Pereverzeva A.R., Chudakov D.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. Bimolecular fluorescence complementation based on the red fluorescent protein FusionRed//Russian Journal of Bioorganic Chemistry, 2016, Vol. 42, No. 6, P. 619-623.
104. Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins//Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, Vol. 96, No. 20, P. 11241-11246.
105. Muto A., Ohkura M., Kotani T., Higashijima S., Nakai J., Kawakami K. Genetic visualization with an improved GCaMP calcium indicator reveals spatiotemporal activation of the spinal motor neurons in zebrafish//Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, Vol. 108, No. 13, P. 5425-5430.
106. de Juan-Sanz J., Holt G.T., Schreiter E.R., de Juan F., Kim D.S., Ryan T.A. Axonal Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals//Neuron, 2017, Vol. 93, No. 4, P. 867-881.e6.
107. Broussard G.J., Liang Y., Fridman M., Unger E.K., Meng G., Xiao X., Ji N., Petreanu L., Tian L. In vivo measurement of afferent activity with axon-specific calcium imaging//Nature Neuroscience, 2018, Vol. 21, No. 9, P. 1272-1280.
108. Belousov V.V., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Staroverov D.B., Shakhbazov K.S., Terskikh A.V., Lukyanov S. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide//Nature Methods, 2006, Vol. 3, No. 4, P. 281-286.
109. Zhao Y., Hu Q., Cheng F., Su N., Wang A., Zou Y., Hu H., Chen X., Zhou H.-M., Huang X., Yang K., Zhu Q., Wang X., Yi J., Zhu L., Qian X., Chen L., Tang Y., Loscalzo J., Yang Y. SoNar, a Highly Responsive NAD⁺/NADH Sensor, Allows High-Throughput Metabolic Screening of Anti-tumor Agents//Cell Metabolism, 2015, Vol. 21, No. 5, P. 777-789.
110. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs//PloS One, 2011, Vol. 6, No. 2, P. e16765.

111. Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5//*The Journal of General Virology*, 1977, Vol. 36, No. 1, P. 59-74.
112. Greene L.A., Tischler A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor//*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1976, Vol. 73, No. 7, P. 2424-2428.
113. Pletnev S., Shcherbo D., Chudakov D.M., Pletneva N., Merzlyak E.M., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev V. A crystallographic study of bright far-red fluorescent protein mKate reveals pH-induced cis-trans isomerization of the chromophore//*The Journal of Biological Chemistry*, 2008, Vol. 283, No. 43, P. 28980-28987.
114. Pereverzev A.P., Gurskaya N.G., Ermakova G.V., Kudryavtseva E.I., Markina N.M., Kotlobay A.A., Lukyanov S.A., Zarskiy A.G., Lukyanov K.A. Method for quantitative analysis of nonsense-mediated mRNA decay at the single cell level//*Scientific Reports*, 2015, Vol. 5, P. 7729.
115. Hu C.-D., Chinenov Y., Kerppola T.K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation//*Molecular Cell*, 2002, Vol. 9, No. 4, P. 789-798.
116. Ghosh I., Hamilton A.D., Regan L. Antiparallel Leucine Zipper-Directed Protein Reassembly: Application to the Green Fluorescent Protein//*Journal of the American Chemical Society*, 2000, Vol. 122, No. 23, P. 5658-5659.
117. Kerppola T.K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells//*Annual Review of Biophysics*, 2008, Vol. 37, P. 465-487.
118. Tsutsui H., Jinno Y., Tomita A., Niino Y., Yamada Y., Mikoshiba K., Miyawaki A., Okamura Y. Improved detection of electrical activity with a voltage probe based on a voltage-sensing phosphatase//*The Journal of Physiology*, 2013, Vol. 591, No. 18, P. 4427-4437.
119. Muslinkina L., Pletnev V.Z., Pletneva N.V., Ruchkin D.A., Kolesov D.V., Bogdanov A.M., Kost L.A., Rakitina T.V., Agapova Y.K., Shemyakina I.I., Chudakov D.M., Pletnev S. Two independent routes of post-translational chemistry in fluorescent protein FusionRed//*International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, Vol. 155, P. 551-559.
120. Santos-Sacchi J., Tan W. The Frequency Response of Outer Hair Cell Voltage-Dependent Motility Is Limited by Kinetics of Prestin//*The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2018, Vol. 38, No. 24, P. 5495-5506.
121. Spencer D., Novarra S., Zhu L., Mugabe S., Thisted T., Baca M., Depaz R., Barton C. O-glycosylation in a recombinant protein is directed at a common motif on glycine-serine linkers//*Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, Vol. 102, No. 11, P. 3920-3924.
122. Villette V., Chavarha M., Dimov I.K., Bradley J., Pradhan L., Mathieu B., Evans S.W., Chamberland S., Shi D., Yang R., Kim B.B., Ayon A., Jalil A., St-Pierre F., Schnitzer M.J., Bi G.,

Toth K., Ding J., Dieudonné S., Lin M.Z. Ultrafast Two-Photon Imaging of a High-Gain Voltage Indicator in Awake Behaving Mice//Cell, 2019, Vol. 179, No. 7, P. 1590-1608.e23.

7. Приложения

7.1 Список сокращений

а.о. – аминокислотный остаток

ГКИМП – генетически кодируемые индикаторы мембранного потенциала

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

кДНК – комплементарная ДНК

мРНК – матричная РНК

ПД – потенциал действия

ПЧД – потенциал чувствительный домен

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

п.о. – пара оснований

ТМ – трансмембранный сегмент

УФ – ультрафиолетовое излучение

ФБ – флуоресцентный белок

ANEPPS – amino-naphthyl-ethylene-pyridinium propyl sulfonate (амино-нафтил-этилен пиридиний пропилсульфонат)

ASAP – accelerated sensor of action potentials (ускоренный индикатор потенциала действия)

CMV – cytomegalovirus (цитомегаловирус)

срGFP – circularly permuted green fluorescent protein (циркулярно пермутированный зеленый флуоресцентный белок)

срFP – circularly permuted fluorescent protein (циркулярно пермутированный флуоресцентный белок)

срFR – circularly permuted FusionRed (циркулярно пермутированный FusionRed)

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium (модифицированная Дульбекко среда Игла)

dNTP – deoxyribonucleotide triphosphate (дезоксинуклеотидтрифосфаты)

EDTA – ethylenediaminetetraacetic acid (этилендиаминтетрауксусная кислота)

EGFP – enhanced GFP (улучшенный зелёный флуоресцентный белок)

FBS – fetal bovine serum (бычья эмбриональная сыворотка)

FlicR1 – fluorescent indicator for voltage imaging red 1 (красный флуоресцентный индикатор для визуализации мембранного потенциала 1)

FP – fluorescent protein (флуоресцентный белок)

FRET – Förster resonance energy transfer (Фёрстеровский резонансный перенос энергии)

GFP – green fluorescent protein (зеленый флуоресцентный белок)

GPR – green-absorbing proteorhodopsin (поглощающий зеленый протеородопсин)

HEK293T – human embryonic kidney 293 (линия человеческих эмбриональных клетки почек, содержащая большой антиген Т вируса SV40)

hVOS – hybrid voltage sensor (гибридный индикатор потенциала)

JF – Janelia fluorophore (флуорофор Janelia)

LB – lysogeny broth (лизогенная среда)

LSS – large Stokes shift (большой Стоксов сдвиг)

MEM – minimum essential medium (минимальная питательная среда, среда Игла)

MET – mechanoelectrical transducer (механоэлектрическое преобразование)

mKOk – mKusabira-Orange-kappa

mUkG – mUmikinoko-Green

NLC – non-linear capacitance (нелинейное емкостное сопротивление)

PROPS – proteorhodopsin optical proton sensor

PC12 – pheochromocytoma cell line (клеточная линия феохромоцитомы)

QuasAr – quality superior to Arch (качественно превосходящий Arch)

RFP – red fluorescent protein (красный флуоресцентный белок)

SLC26 – solute carrier family 26 (семейство транспортеров растворённых веществ 26)

SNR – signal-to-noise ratio (отношение сигнал-шум)

SOB – super optimal broth (богатая бактериальная среда на основе пептона)

STAS – sulfate transporter and anti-sigma factor antagonist (сульфатный транспортер и антагонист анти-сигма фактора)

TAE – tris-acetate-EDTA (трис-ацетат-ЭДТА)

VARNAM – voltage-activated red neuronal activity monitor (активируемый потенциалом индикатор нейрональной активности)

VSD – voltage-sensing domain (потенциал-чувствительный домен)

VSFP – voltage-sensitive fluorescent protein (потенциал-чувствительный флуоресцентный белок)

VSP – voltage-sensitive phosphatase (потенциал-чувствительная фосфатаза)

7.2 Схема двухпромоторного вектора

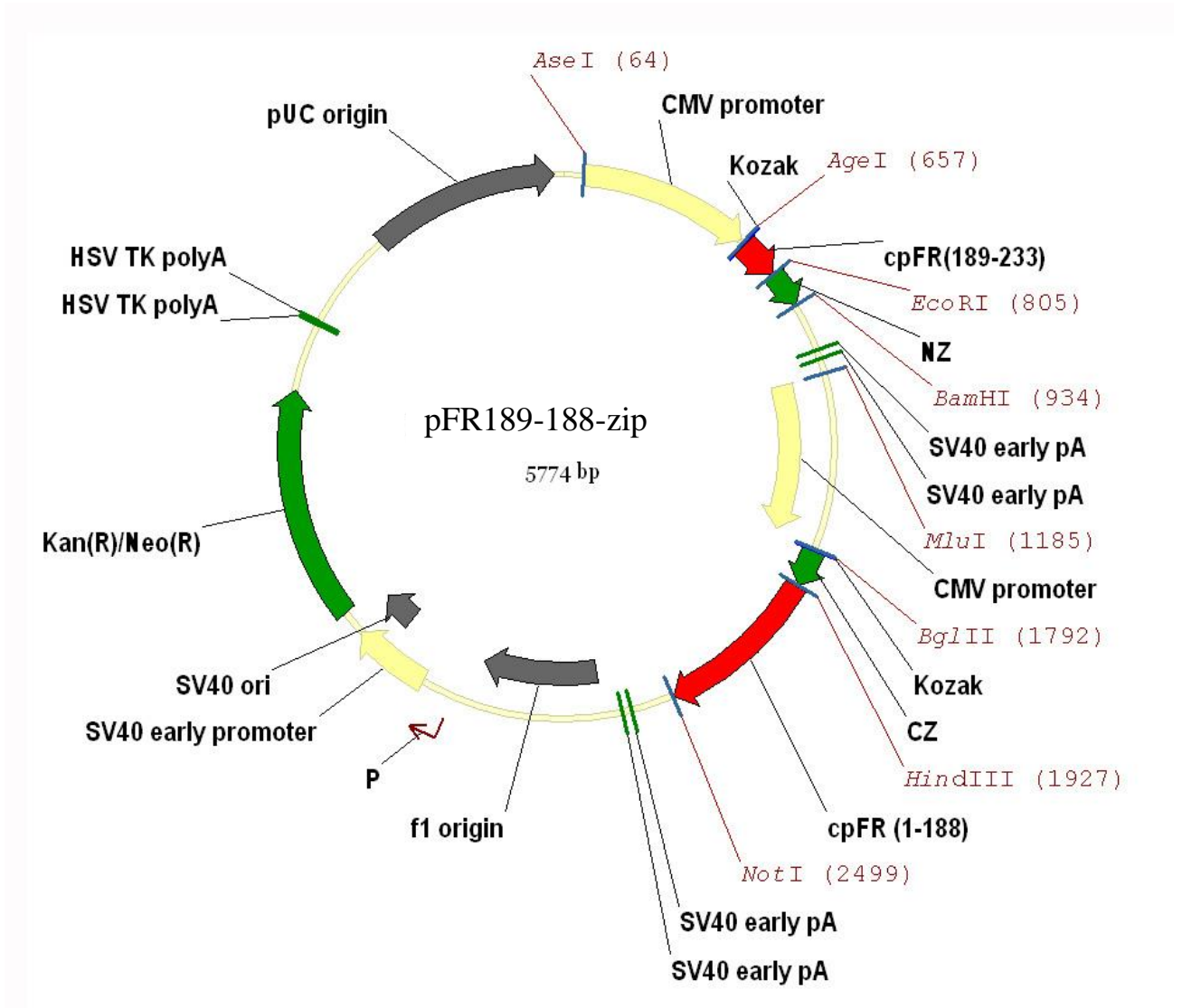


Рис.33. Схема вектора pFR189-188-zip. Красными стрелками обозначены фрагменты белка FusionRed. Желтыми стрелками показаны 2 промоторные области и 1 терминатор. Нуклеотидные последовательности мотивов лейциновых zipperов NZ и CZ приведены ниже.

NZ

GCCGGTACCCCGGGTTCGACCTGCAGCACTGAAGAAGGAGCTGCAAGCAAACAAGAAG
GAGCTGGCACAACCTGAAGTGGGAGCTGCAAGCGCTGAAGAAGGAGCTAGCACAGAAA
CTTAATTAG

CZ

CGCCACCATGGAGCAGCTAGAGAAGAAGCTACAGGCACTAGAGAAGAAGCTAGCACA
CGTAGAGTGGAAGAACCAGGCACTAGAGAAGAAGCTAGCACAGGGTACCCCGGGTTCG
ACCTGCAGGCAACGG