

**Аннотация проекта (ПНИЭР), выполняемого в рамках ФЦП  
«Исследования и разработки по приоритетным направлениям  
развития научно-технологического комплекса России на 2014 –  
2020 годы»**

**Номер Соглашения о предоставлении субсидии/государственного  
контракта:** 14.587.21.0011

**Название проекта:** Новые светууправляемые каналы и транспортеры  
для оптогенетического контроля нейронов и исследований мозга

**Основное приоритетное направление:** Науки о жизни

**Исполнитель:** федеральное государственное автономное образовательное  
учреждение высшего профессионального образования "Московский физико-  
технический институт (государственный университет)"

**Руководитель проекта:** Бюлдт Георг Дитрих

**Должность:** научный сотрудник

**E-mail:** i.s.okhrimenko@gmail.com

**Ключевые слова:**

**Цель проекта**

Оптогенетика – новейшее междисциплинарное направление в биотехнологии, объединяющее молекулярную и клеточную биологию, электрофизиологию, оптику, электронику и генную инженерию. В течение последнего десятилетия это направление стремительно развивалось и привело к революции в нейробиологии и других научных областях. Оптогенетика способна решить сложнейшие задачи клеточного контроля в живых тканях благодаря достижению беспрецедентно высокой временной и пространственной точности, недоступной методам электростимуляции и фармакологии. Оптогенетический контроль нервных клеток является одним из важнейших технологических достижений современной нейробиологии. Этот метод открывает новые возможности для исследования механизмов сложных процессов в нейронных сетях, таких как обучение или моторная функция. В то же время он позволяет разработку совершенно новых подходов для восстановления функционирования при слепоте или дегенерации мозга, а также для лечения различных неврологических и психических расстройств. В 2010 году оптогенетика была выбрана Методом Года среди всех областей науки и инженерии по версии междисциплинарного научного журнала Nature Methods. В том же году оптогенетика была охарактеризована в статье как «прорыв десятилетия» в научно-исследовательском журнале Science. Медицинские применения оптогенетики для лечения таких тяжелых заболеваний и расстройств (как, например, болезнь Паркинсона, эпилепсия, наркотическая зависимость, депрессия, нарушение сна, боль и шизофрения) активно и углубленно разрабатываются в настоящее время. Таким образом, нейронная оптогенетика сдвигается из области фундаментальной академической науки в сторону развития высокоэффективных методов вмешательства в мозговую деятельность и исправления определенных патологических процессов. В нейронных цепях информация передается по нейронам в форме потенциала действия, возникающего из-за разности электрических потенциалов между внешней и внутренней сторонами цитоплазматической мембраны нейрона. Ионные каналы, транспортеры и рецепторы, сопряженные с G-белком (GPCR), встроенные в мембрану нейрона, функционируют как молекулярные машины, создающие, регулирующие и модулирующие потенциал действия. Оптогенетика позволяет модифицировать часть этой молекулярной машинерии или вводить новые

чужеродные световозбудимые белки, такие как определенные ретиналь-связывающие белки микроорганизмов, в мембрану нейронов с целью возможности манипулирования нейронными циклами при помощи оптических методов. Несмотря на выдающиеся достижения в области оптогенетики, в ней еще остается множество нерешенных задач. Прежде всего, необходимо повысить эффективность световозбудимых ретиналь-связывающих белков. Основной целью настоящего проекта является выявление и создание новых светочувствительных ретинальных мембранных белков со свойствами, необходимыми для оптогенетического контроля нервных клеток.

### **Основные планируемые результаты проекта**

В ходе выполнения проекта планируется достигнуть следующих результатов:

- 1) Получить структура K<sup>+</sup> селективного насоса - мутанта белка KR2,
- 2) Получить последовательности мутантов KR2, оптимизированных для Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> транспорта,
- 3) Определить последовательности новых перспективных родопсинов,
- 4) Охарактеризовать распределения светочувствительных белков внутри одной клетки,
- 5) Определить последовательности, определяющие встраивание родопсинов в мембрану и внутриклеточные органеллы,
- 6) Определить светочувствительные белки для оптогенетических подходов в клетках млекопитающих,
- 7) Определить светочувствительные белки, которые хорошо экспрессируются для оптогенетических подходов в нейронах млекопитающих,
- 8) Проверить применимость светочувствительных белков для изменения частных функций нейронов,
- 9) Получить протоколы для накопления промежуточных состояний белков,
- 10) Получить структуры промежуточных состояний,
- 11) Изучить новые подходы к структурным исследованиям промежуточных состояний с помощью XFEL и кристаллографии,
- 12) Разработать графический пользовательский интерфейс для последовательности/структуры/функции производственной линии внутри модульной платформы программного обеспечения SAMSON,
- 13) Получить новые инструменты структурной биоинформатики специально разработанные для мембранных белков: прогноз сайтов связывания; Предсказание эффекта точечных мутаций,
- 14) Исследовать молекулярные механизмы исчезания и появления проводимости механизма в работе светочувствительного канального родопсина ChR2,
- 15) Получить структурные модели новых родопсинов, в том числе модель открытого состояния ChR2,
- 16) Прогнозировать новые ChR2 мутанты с улучшенными свойствами проводимости.

### **Краткая характеристика создаваемой/созданной научной (научно-технической, инновационной) продукции**

В конечном итоге мы хотим представить набор молекулярных инструментов (светочувствительных белков), применимых для эффективного и

всеобъемлющего контроля нервных систем. В этот набор светочувствительных белков будут включены а) протонные и ионные насосы б) ионные каналы в) сенсоры и многокомпонентные сигнальные системы.

А) Протонные и ионные насосы. Мы представим природные и рационально модифицированные светочувствительные белки, которые будут обеспечивать активный транспорт ионов натрия и калия через клеточную мембрану. По известным кристаллическим структурам белков с помощью мутагенеза мы оптимизируем избирательность транспортируемого иона. Также мы обеспечим нужную регулировку скорости фотоцикла белка (т.е. скорости, с которой переносятся ионы), для того чтобы контролировать передачу нервного импульса. В конце концов, найденные и модифицированные белки будут экспрессироваться в плазматической мембране нервных клеток, а также, возможно, в таких клеточных органеллах как митохондрии.

Б) Ионные каналы. На основе структурных данных о природной форме канального родопсина 2 (ChR2) мы предложим его модификации для улучшения свойств проводимости.

В) Сенсоры и многокомпонентные сигнальные системы. Тонкое управление сигнальными процессами внутри нервных клеток добавит дополнительные возможности в регулировке поведения нейронов. Эти возможности могут принципиально отличаться от тех, что обеспечивают ионные насосы и каналы, позволяя регулировать уровни экспрессии и активации/деактивации белков уже внутри нейронов. В этой части мы предложим потенциальные белки-кандидаты, которые необходимо будет исследовать в перспективе. При контроле нервных систем может потребоваться совместное использование двух и более инструментов. Для этого для каждого из типов предлагаемых белков будут созданы их варианты, которые настроены на разные длины волн, при этом функционально они продолжают выполнять ту же функцию. Это позволит активировать выборочно активировать нужный инструмент, не задействуя или задействуя в значительно меньшей степени другие.

Все планируемые результаты являются составными частями продукта или же шагами к достижению заявленных характеристик. В частности:

1. Биоинформатические методы позволяют найти новые потенциальные классы белков-кандидатов, а также дают возможность вести рациональный поиск сигнальных последовательностей, чтобы доставить экспрессируемый белок на плазматическую мембрану нейронов.
2. Функциональные спектроскопические исследования природных и мутантных форм белка позволяют исследовать его фотоцикл и рационально его оптимизировать. Также они дают предложения по накоплению промежуточных состояний для их структурной характеристики.
3. Структурные исследования -- это ключевой этап в понимании молекулярного механизма транспортной или сенсорной активности белка. Т.к. именно эти исследования являются нашим сильнейшим звеном, мы в полной мере рассчитываем на достижение вышеуказанных целей.
4. Тестирование предложенных кандидатов в человеческих клетках (включая нейроны) считается заключительным шагом в проверке справедливости

наших изысканий.

5. Для достижения части этих результатов требуется создание новых методов, таких как использование XFEL для получения структур промежуточных состояний, а также прогнозирование сайтов связывания и выдача предположений об эффекте точечного мутагенеза исследуемых белков.

Несколько лабораторий в США, Японии, Германии и Франции сосредоточены на поиске белков-кандидатов и демонстрации их применимости контроля нервных клеток. Результаты этих исследований регулярно публикуются в высокорейтинговых научных журналах Nature и Science. Недавно решенная нами структура натриевого насоса также была опубликована в журнале Nature Structural and Molecular Biology в 2015 году.

Имеющаяся высокоэффективная платформа для структурных и функциональных исследований мембранных белков полноценно решает инфраструктурные задачи (ссылка на описание платформы). Высокая квалификация группы в структурных исследованиях и молекулярном моделировании обеспечивает нужную экспертизу (эта квалификация подтверждена публикациями Nature, 2002, Nature, 2006, PNAS, 2013, NSMB, 2015). Закупленная установка для оптогенетических исследований позволит делать завершающий шаг в области, демонстрируя эффективность предлагаемых инструментов на нервных клетках. Предоставленные средства субсидии будут направлены на закупку реагентов и расходных материалов, необходимых для продвижения проекта, а также на зарплату сотрудников. Эти действия снижают риски недостижения результатов по организационным и квалификационным причинам практически до нуля.

С точки зрения достижения результатов по естественным физическим и биологическим причинам можно сказать следующее. Создание протонных насосов и ионных насосов и каналов с заявленными свойствами не несет рисков, т.к. знание и анализ существующих кристаллических структур белков и понимание молекулярных механизмов их работы позволяет рационально вносить мутации так, чтобы заявленные характеристики были достигнуты. Поиск и обнаружение новых белков-кандидатов имело больший риск, однако проведенный к настоящему времени филогенетический анализ позволил выявить большое число классов новых светочувствительных белков (в каждом из которых 15-20 белков). Поэтому вероятно, что какой-нибудь из классов проявит нужные свойства. Наибольшие риски несет подбор и анализ многокомпонентных сигнальных систем. Риск связан не с их идентификацией, а с предсказуемой работой в нервных клетках. Для полноценной отдачи работы всех компонентов многокомпонентных сигнальных систем может потребоваться время больше отведенного. С другой стороны, работа в этом направлении позволяет сформировать существенный задел для дальнейших исследований. И на данный момент это видится еще одним стратегическим направлением в оптогенетике. Резюмируя риски, следует отметить, что инфраструктура и квалификация позволяет безрисково двигаться по проекту, в самом же проекте выделены два блока: первый -- безрисковый,

базирующийся на уже проведенных структурных исследованиях, и второй -- представляющий потенциальный риск, но в то же время, при успешной реализации, открывающий новое направление в оптогенетике.

### **Назначение и область применения, эффекты от внедрения результатов проекта**

Результаты работы, сделанные на культуре нервных клеток, сразу непосредственно переносимы на более сложные организмы, например, нематод и мышей. Использование предложенных инструментов, их вариаций и их комбинации позволит более полно исследовать мозг в целом и его различные отделы в частности. А использование линий, моделирующих неврологические заболевания, позволит разрабатывать их терапию. Переход от тестов на модельных системах к апробации на людях -- это перспектива ближайших 10-20 лет.

Одновременно с разработкой оптогенетических инструментов появляется информация о фундаментальном устройстве светочувствительных белков. Второстепенно, эти данные могут быть использованы группами исследователей, которые занимаются биоэнергетикой.

Данные исследования проводятся в кооперации с ведущими научными центрами в Германии (Исследовательский центр Юлих) и Франции (Институт структурной биологии). Объединение усилий экспертов и имеющегося исследовательского времени на доступных приборах и платформах позволяет проекту развиваться с большей скоростью, чем в отсутствии международного взаимодействия.

### **Текущие результаты проекта**

Для более полного понимания непосредственных научных результатов, мы приводим основные тезисы аналитического обзора современной научно-технической литературы.

Инструменты оптогенетики, светочувствительные ретиналь-связывающие белки, были открыты в конце XX - начале XXI века (бактериородопсин (Oesterhelt, 1971), галородопсин (Matsuno-Yagi, 1977) и канальный родопсин (Nagel, 2002)). Однако лишь с демонстрации управления нейронами с помощью канального родопсина началась эра оптогенетики (Boyden, 2005). Для того чтобы заработала оптогенетика необходимо было свести вместе несколько компонентов: молекулярные машины, средства их доставки на плазматическую мембрану (генетику) и средства их контроля и манипуляции (оптику) (Deisseroth, 2015; Emiliani, 2015). Начиная с 2005 количество публикаций, относящихся к оптогенетике, растет экспоненциально.

Значительная доля публикаций в настоящее время относится к разработкам методик управления нервными системами, и одной из их основных частей является поиск и оптимизация новых, более эффективных, более естественных молекулярных инструментов. В частности, попытки доставить бактериородопсин на плазматическую мембрану занимали слишком много

времени, и был предложен другой протонный насос ArchT (модификация археородопсина-3), который гораздо легче экспрессировался, но обладал схожими с бактериородопсином характеристиками (Okazaki, 2012). Также, археородопсин-3 был успешно экспрессирован в ряде клеточных органелл (Rost, 2015). Фундаментальные структурные исследования канального родопсина (а точнее химеры канального родопсина 1 и 2) (Kato, 2012) привели к рациональному инжинирингу поры (Berndt, 2014), что позволило превратить катионный канал в хлорный канал (Wietek, 2014).

Совсем недавно был открыт целый класс белков, которые переносят ион натрия изнутри клетки наружу (Inoue, 2013; Yoshizawa, 2014; Balashov, 2014). Очень быстро была также получена структура натриевого насоса (Gushchin, 2015; Kato, 2015). При первом анализе структуры удалось предложить такие мутации, которые превратили натриевый насос в насос, который может прокачивать и натрий и калий (Gushchin, 2015; Kato, 2015). Также была продемонстрирована возможность использования этого насоса в нейронах и нематодах (Kato, 2015). Филогенетический анализ позволил идентифицировать еще один класс белков -- анионные каналы. Они были функционально охарактеризованы, а также их функция была продемонстрирована в нейронах (Govorunova, 2015). Перспективными кандидатами для использования в оптогенетике можно считать многокомпонентные сигнальные системы -- родопсин-(гистидин-киназы) (Luck, 2012) и родопсин-(гуанилил-циклазы) (Avelar, 2014).

Мы с нашими иностранными партнерами из Института структурной биологии (Гренобль, Франция) был проведен широкомасштабный поиск по базе данных белков, аннотированных как потенциальные родопсины (всего около 8000 аминокислотных последовательностей). Было построено филогенетическое дерево и выбран набор позиций, которые наиболее консервативны среди всех родопсинов. Далее для каждой из ветвей филогенетического дерева была проанализирована абсолютная консервативность аминокислот на определенных позициях. В результате данного анализа удалось выделить кластеры белков натриевых насосов и анионных каналов (которые были открыты в 2013 и 2015 годах соответственно). Это может служить индикатором, что методика группировки работоспособна. А непосредственным результатом работы можно считать идентифицированные 7 кластеров белков, которые могут быть охарактеризованы определенным "мотивом". Эти белки представляют собой мишени, которые мы собираемся анализировать и исследовать в первую очередь. Фрагмент филогенетического дерева и один из характеристических мотивов приведен в постере.

Т.к. автоматическая аннотация полной базы данных может иметь недостатки, мы создаем собственные алгоритмы поиска именно светочувствительных ретиналь-связывающих белков на основе структурных моделей и консервативности основных функциональных элементов этих белков.

Анализируя известные кристаллические структуры ретиналь-связывающих

белков, про которые известно, какой ион они прокачивают, мы обнаружили закономерность. Для всех белков, которые прокачивают протоны, расстояние между аминокислотами Asp-85 и Asp-212 (для бактериородопсина и гомологичными им в других белках) составляет около 10Å. И только для расширенной формы KR2 и формы со связанных хлором для галородопсина это расстояние составляет 12Å. Это добавляет еще один элемент в структуре белка, который можно рационально модифицировать, чтобы влиять на избирательность переносимого иона. Также более подробный анализ структуры натриевого насоса, полученной нами, позволил идентифицировать важность олигомерного (пентамерного) состояния натриевого насоса для функционального транспорта именно натрия. В мономерной форме белка расстояние между Asn-112 и Asp-251 оказывается недостаточным для прохождения там иона натрия. Наглядное представление этих результатов также приведено в постере.