

**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

**Тематическое направление**

Науки о жизни

**Исполнитель**

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

**Цели и задачи исследования**

Объект исследования – светочувствительные ретиналь-связывающие белки, являющиеся базовыми инструментами оптогенетики.

Основной целью проекта является выявление и создание новых светочувствительных ретинальных мембранных белков со свойствами, необходимыми для оптогенетического контроля нервных клеток.

Для достижения основной цели проекта будет выполнена работа по следующим задачам:

- а) рациональный скрининг базы данных аминокислотных последовательностей при поддержке компьютерного моделирования для выявления перспективных кандидатов новых светочувствительных протонных и ионных каналов и насосов, которые представляют потенциальный интерес для неврологии (IBS и МФТИ);
- б) генная инженерия, экспрессия и очистка белков из предложенных белков-кандидатов (ICS-6);
- в) функциональная характеристика в пробирке методами спектроскопии, в том числе определение фотоцикла методами флэш-фотолиза и спектроскопии одиночных молекул (МФТИ);
- г) крупномасштабное производство белков-кандидатов, выбранных на этапах 2 и 3 для изучения структуры (МФТИ);
- д) кристаллизация и решение структуры для выбранных белков (IBS);
- е) основанное на знаниях о структуре и свойствах, компьютерное моделирование новых белков с нужными свойствами (калиевых насосов, натриевых и калиевых ионных каналов) на основе ретинальных белков, в частности тех, структуры которых мы недавно решили (IBS, МФТИ);
- ж) функциональная характеристика вновь созданных светочувствительных белков в естественных условиях, включая их активность в нервных клетках (MPI).

**Актуальность и новизна исследования**

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, в том числе поиск новых оптогенетических инструментов для управления активностью нейронов.

### **Описание исследования**

В ходе реализации проекта выполняется поиск и создание новых светочувствительных каналов и транспортеров, используя два взаимодополняющих подхода: а) идентификация новых белков или определенных мутантных белков с помощью анализа эволюции родопсинов из разных видов и типов; б) молекулярно-динамическое моделирование процессов проникновения и транспорта, происходящих в светочувствительных каналах и транспортерах с известной кристаллической структурой для того, чтобы получить более глубокое понимание механизмов, лежащих в основе ионного транспорта и для системного прогнозирования мутаций на рациональной основе.

Объединение этих стратегий приведет к успешной функциональной экспрессии для многих новых родопсинов, которые в дальнейшем будут созданы и изучены в рамках проекта.

Наши эксперименты будут определять светочувствительные белки, которые встраиваются во внутриклеточные органеллы, такие как эндосомы / лизосомы или эндоплазматический ретикулум, и могут быть полезными для оптогенетических подходов контроля выделения  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных органелл или изменения лизосомальной активности.

Имеющиеся структуры основных состояний не являются достаточными для выявления тонких молекулярных деталей ионной проводимости и селективности. Знание этих деталей необходимо для разработки стратегий по изменению селективности и требует определение структур родопсинов в промежуточных состояниях. Наша цель здесь заключается в определении структуры высокого разрешения для промежуточных состояний  $K^{+}$  и  $Na^{+}$  насосов, а также ChR2 с помощью рентгеновской кристаллографии.

## Результаты исследования

На первом этапе работ выполнен аналитический обзор современной научно-технической, нормативной, методической литературы, показано, что в ряде современных публикаций отражены результаты поиска новых и модификацию классических оптогенетических инструментов, выявлены основные фокусы исследований. По результатам рационального скрининга базы данных аминокислотных последовательностей, а также с учетом данных иностранного партнера Institut de Biologie Structurale, (IBS, Франция) по анализу классов сенсорных и канальных родопсинов, при поддержке компьютерного моделирования, были идентифицированы консервативные аминокислотные остатки в определенных позициях и выполнен анализ протонных помп, хлорных и натриевых насосов. Это позволило выявить перспективных кандидатов новых светочувствительных протонных и ионных каналов и насосов, представляющих потенциальный интерес для оптогенетики (определены потенциальные целевые белки):

а) Родопсин MacR из *Candidatus Actinomarina minuta*, представитель кластера RDTEDK. Предположительно протонный насос. Важнейшей отличительной особенностью белка является его крайне малый размер и крайне малый размер организма, в котором белок обнаружен. Найден при анализе важных деталей существующего кластера.

б) Ксенородопсин XeR из *Candidatus Nanosalina*, представитель кластера WDSAPK. Кластер был найден при дальнейшем филогенетическом анализе базы данных белков. Отличительной особенностью кластера является практически полное несовпадение ключевых консервативных аминокислот с «классическими» (например, замена аргинина на триптофан).

в) Белки, находящиеся в стадии подбора и оптимизации генетических конструкций для экспрессии. Работы ведутся иностранным партнером:

1) Безлизиновый родопсин (Q-Rh) из кластера RNTNDQ из организма *Penicillium digitatum*;

2) Натриево-протонные гибридные светочувствительные насосы (NaR) из *Gillisia limnaea*, из *Truepera radiovictrix* и из *Nonlabens marinus S1-08*;

3) Предполагаемые сенсоры из *Candidatus Haloredivivus*, C117 по результатам метагеномного секвенирования и из семейства *Acidibacterium* (B1-BR-g2).

На втором этапе реализации проекта с двумя отобранными кандидатами, родопсином MacR и ксенородопсином XeR, проведены спектроскопические и функциональные исследования. Партнерской организацией, Institute of Complex Systems-6: Structural Biochemistry, Research Center Juelich (ICS-6), Германия, проводится предварительная работа с прочими перспективными кандидатами.

По результатам обзора и анализа существующей литературы по спектроскопической и функциональной характеристике фотоактивируемых каналов и транспортеров обоснованы подходы и методики, позволяющие решить поставленные задачи и достичь заданных параметров по точности.

Проведены спектроскопические исследования препаратов белков родопсина MacR и ксенородопсина XeR в солюбилизованном виде и реконструированными в нанодиски. Исследованы свето- и темно-адаптация

белков. Результаты дополнены зависимостью спектра поглощения от pH буфера, в котором находился белок.

Предложенные экспериментальные подходы к характеристике фотоактивируемых каналов и транспортеров белковых препаратов позволяют дать качественный ответ о функциональной активности целевых белков.

Иностраным партнером проведена сборка генетических конструкций и функциональная экспрессия в *Escherichia coli* дополнительных белков-кандидатов.

### **Практическая значимость исследования**

В области методик оптогенетического контроля и их использования в нейробиологии ниша высокопроизводительных систем для рационального конструирования фотоактивируемых мембранных белков не заполнена, что приводит к дефициту эффективных инструментов.

Исходя из тенденций развития оптогенетики можно предполагать, что привлечение в качестве дополнительных оптогенетических инструментов селективных катионных насосов представляет значительный практический интерес.

Непосредственные результаты проекта найдут применение в фундаментальных исследованиях нейробиологии, а также создадут основу для медицинских применений. Сопутствующие наработки будут иметь самостоятельную важность для развития ряда научных областей затронутых в проекте: будут разработаны биоинформатические методы поиска белков с заданными характеристиками; методы экспрессии ряда мембранных белков; подходы к получению переходных состояний белков (в том числе с использованием рентгеновских лазеров на свободных электронах); методы кристаллизации мембранных белков; методы компьютерного моделирования новых белков с нужными свойствами. Проект также является значимым для развития оптогенетических исследований и их приложений, которые требуют создания панели светоактивируемых белков с различными функциями как инструментов тонкой настройки нейронных процессов. Настоящий проект будет способствовать этому развитию, предоставляя светочувствительные транспортеры и каналы с новыми, крайне необходимыми свойствами. Результаты проекта создадут рациональную парадигму для исследований и инженерии таких оптогенетических инструментов.