МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Барыкина Наталья Викторовна

РАЗРАБОТКА НОВЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ КАЛЬЦИЕВЫХ ИНДИКАТОРОВ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ

специальность 02.00.10 – биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2018

Работа выполнена в лаборатории стволовых клеток мозга института нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий (ИНБИКСТ) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)».

Научный руководитель – **Субач Федор Васильевич**, кандидат химических наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», институт нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий (ИНБИКСТ), лаборатория стволовых клеток мозга, старший научный сотрудник

Официальные оппоненты – **Готтих Марина Борисовна**, доктор химических наук, профессор, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, отдел химии нуклеиновых кислот, главный научный сотрудник

Савицкий Александр Павлович, доктор химических наук, профессор, Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, лаборатория физической биохимии, заведующий лабораторией

Мишин Александр Сергеевич, кандидат биологических наук, Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, лаборатория биофотоники, старший научный сотрудник

Защита диссертации состоится «11» декабря 2018 г. в 17 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.03 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, НИИ ФХБ, аудитория 501.

E-mail: sig@genebee.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/154201162/

Автореферат разослан «___» ноября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук, доцент Смирнова И. Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Нейроны в мозге животных тесно связаны друг с другом и с глиальными клетками. Связи между нейронами объединяют нейроны в функциональные группы, обрабатывающие информацию и, в конечном счете, определяющие поведение животного. Одна из актуальных проблем современной нейробиологии – разработка инструментов для исследования связей между нейронами в живом организме. Разработка этих инструментов позволяет пролить свет на взаимосвязи и роль нервных клеток в таких процессах, как пластичность, сенсомоторная интеграция, память и обучение.

Известно, что в процессе активности мозга происходит существенное увеличение концентрации ионов кальция в цитоплазме нейронов. Генетически кодируемые кальциевые индикаторы (ГККИ) позволяют наблюдать за изменением концентрации ионов кальция в нейроне и, соответственно, исследовать активность мозга *in vivo*.

ГККИ – белки, которые состоят из Ca^{2+}-связывающей части и флуоресцентной части, связанных между собой линкерами (Рис. 1а). Ca^{2+}-связывающая часть состоит из одного из белков: кальмодулина (CaM) или тропонина С (TnC). Полноразмерные белки CaM и TnC связывают 4 иона Ca^{2+} благодаря 4м Ca^{2+}-связывающим мотивам. В случае CaM также используют M13-пептид из легкой цепи киназы миозина, который взаимодействует с комплексом CaM-4Ca^{2+} и позволяет увеличивать величину ответа индикатора на изменение концентрации ионов Ca^{2+}. Флуоресцентная часть состоит из одного или двух флуоресцентных белков в зависимости от типа ГККИ.

Первый тип ГККИ состоит из двух флуоресцентных белков (донора и акцептора), связанных между собой Ca^{2+}-связывающим белком (CaM/M13-пептид или TnC) (Рис. 1а). В отсутствие ионов Ca^{2+} доминирует флуоресценция белка-донора. При связывании ионов Ca^{2+} Ca^{2+}-связывающая часть становится более компактной, и расстояние между двумя флуоресцентными белками уменьшается. В результате происходит Фёрстеровский перенос энергии (FRET – Förster resonance energy transfer) между белком-донором и белком-акцептором и, как следствие, появление флуоресценции белка акцептора.

Второй тип ГККИ, как правило, состоит из одного циркулярно пермутированного флуоресцентного белка, то есть белка, в котором нативные N- и C-конец сшиты друг с другом с помощью линкера, а новые концы искусственно образованы в другой части молекулы вблизи хромофора. В качестве Ca^{2+}-связывающей части в этом типе индикаторов до настоящего времени использовали только CaM и M13-пептид (Рис. 1а). Флуоресценция индикаторов изменяется за счет изменения ближайшего окружения гидроксильной группы остатка Tyr66 хромофора при связывании/диссоциации ионов Ca^{2+} кальмодулином, входящим в состав индикатора.

Несмотря на широкое разнообразие разработанных ГККИ на основе одного флуоресцентного белка, их Ca^{2+}-связывающие части ограничены полноразмерным кальмодулином из позвоночных животных. Это, во-первых, может ограничивать ключевые свойства индикаторов, такие как размер молекулы, влияющий на количество нарабатываемых индикаторов в клетке и на эффективность их упаковки в вирусные частицы

для доставки в клетки, количество связываемых ионов кальция, динамику взаимодействия и сродство индикаторов к ионам кальция. Во-вторых, основным недостатком кальмодулина из позвоночных является наличие у него белков-партнеров в нейронах млекопитающих, что приводит к уменьшению динамического диапазона индикаторов на основе кальмодулина *in vivo*, а также к нарушению нормального функционирования нейрона. Один из путей преодоления этих ограничений – использование кальмодулинов из других организмов. Другой путь – использование Ca^{2+}-связывающего белка тропонина С из мышечной ткани, который не обладает белками-партнерами в нейроне.

Для регистрации быстрой динамики кальциевой активности нейронов необходима разработка кальциевых индикаторов с повышенной яркостью. Использование новых ярких GFP-подобных флуоресцентных белков в составе кальциевых индикаторов может значительно улучшить их яркость.

Степень разработанности темы. Все ранее разработанные кальциевые индикаторы, в состав которых входит белок тропонин С, состоят из двух флуоресцентных белков, и механизм их действия основан на переносе энергии FRET. Такие ГККИ требуют сложного оборудования для детекции флуоресцентного сигнала белков донора и акцептора. Кроме того, одновременное использование флуоресцентных маркеров других цветов в этом случае ограничено. Размер таких индикаторов примерно на 100 аминокислотных остатков (а.о.) больше, чем у широко используемых индикаторов на основе одного флуоресцентного белка. В этой связи перспективным направлением является разработка ГККИ с новым дизайном на основе тропонина С и одного флуоресцентного белка.

Все разработанные на настоящий момент ГККИ состоят из Ca^{2+}-связывающих белков, кальмодулина или тропонина С, из позвоночных животных. Последовательность белка кальмодулина идентична у всех позвоночных животных, поэтому разнообразие ключевых свойств кальциевых индикаторов на его основе ограничено. Поиск Ca^{2+}-связывающих белков с новыми свойствами из других организмов позволил бы преодолеть вышеупомянутые ограничения.

Цель работы заключалась в разработке новых генетически кодируемых кальциевых индикаторов на основе одного зеленого флуоресцентного белка и Ca^{2+}-связывающих белков тропонина С и кальмодулина из грибов. Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**: 1) методом направленной молекулярной эволюции разработать генетически кодируемые кальциевые индикаторы на основе тропонина С и флуоресцентных белков mNeonGreen и EYFP; 2) охарактеризовать индикаторы на основе тропонина С *in vitro* и *in vivo*; 3) разработать генетически кодируемый кальциевый индикатор на основе кальмодулина и киназы из грибов; 4) охарактеризовать разработанный индикатор *in vitro* и в модели рыбы *Danio rerio in vivo*; 5) выявить позиции в последовательностях кальмодулина и киназы из грибов, ответственные за сродство разработанного индикатора к ионам Ca^{2+}.

Научная новизна работы. Были получены новые генетически кодируемые кальциевые индикаторы NTnC и iYTnC2 с уникальным дизайном, впервые включающие два Ca^{2+}-связывающих мотива из белка тропонина С и один флуоресцентный белок. Впервые в

качестве флуоресцентной части кальциевый индикатор NTnC содержит флуоресцентный белок mNeonGreen. На основе NTnC путем замены флуоресцентного белка mNeonGreen на EYFP был создан кальциевый индикатор iYTnC2, обладающий увеличенным динамическим диапазоном и более быстрой скоростью диссоциации ионов Ca^{2+} *in vitro* по сравнению с NTnC.

Был разработан новый рациометрический генетически кодируемый кальциевый индикатор FGCaMP, в состав которого впервые входят Ca^{2+}-связывающий белок кальмодулин и M13-пептид из грибов рода *Aspergillus*. С помощью анализа полученной в работе кристаллической структуры индикатора FGCaMP были найдены аминокислотные остатки в кальмодулине и M13-пептиде из грибов рода *Aspergillus*, замена которых приводит к увеличению сродства FGCaMP к ионам Ca^{2+}. Было показано, что в клетках млекопитающих FGCaMP обладает повышенной мобильностью по сравнению с другими широко используемыми кальциевыми индикаторами, что говорит в пользу того, что FGCaMP не взаимодействует с эндогенными белками клетки.

Теоретическая и практическая значимость. Разработанные кальциевые индикаторы могут быть использованы не только для визуализации кальциевой активности нейронов и изучения работы мозга различных живых организмах, но и для мониторинга изменений концентрации ионов кальция в других клетках, например, раковых HeLa и стволовых HEK. Предложенные оригинальные подходы по разработке и оптимизации свойств кальциевых индикаторов являются универсальными и могут быть использованы для разработки индикаторов на другие низкомолекулярные вещества. Анализ кристаллических структур полученных нами кальциевых индикаторов, а также полученные на их основе мутанты позволят в дальнейшем разрабатывать новые ГККИ с улучшенными характеристиками.

Положения, выносимые на защиту.

1. Предложенный оригинальный подход по использованию С-концевого домена тропонина С и одного флуоресцентного белка mNeonGreen позволяет разработать новый генетически кодируемый кальциевый индикатор NTnC, применимый для визуализации активности нейронов мозга.
2. Замена флуоресцентного белка mNeonGreen в индикаторе NTnC на EYFP приводит к получению NTnC-подобного кальциевого индикатора iYTnC2 с б*о*льшим динамическим диапазоном и увеличенной скоростью диссоциации ионов кальция.
3. Предложенный оригинальный подход по использованию кальмодулина и киназы из грибов *Aspergillus niger* и *Aspergillus fumigatus* позволяет разработать новый рациометрический генетически кодируемый кальциевый индикатор FGCaMP для визуализации активности нейронов мозга.
4. Замена ключевых аминокислотных остатков в позициях T3, L4, H5, I8, D9 и T10 киназы и D78, T79 и N97 кальмодулина, найденных с помощью анализа кристаллической структуры FGCaMP, влияет на контраст и сродство индикатора FGCaMP к ионам кальция.

Апробация работы и публикации. Основные результаты диссертации были доложены на следующих научных конференциях: «Imaging the Brain», 2016, Warsaw, Poland; «V Съезд

биохимиков России», 2016, Москва, Россия; «XIV Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа», 2016, Москва, Россия; «XV Курчатовская междисциплинарная молодежная научная школа», 2017, Москва, Россия; 60-я научная конференция МФТИ, 2017, Москва, Россия; Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», 2018, Москва, Россия; FENS, 2018, Berlin, Germany. По материалам работы опубликовано 3 статьи в международных рецензируемых научных журналах.

Структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений, приложения и списка литературы. Диссертационная работа изложена на 177 страницах и содержит 77 рисунков, 8 таблиц и 205 библиографических ссылок.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Разработка генетически кодируемого кальциевого индикатора на основе тропонина С из *Opsanus tau* и флуоресцентного белка mNeonGreen

Недостатком ГККИ на основе кальмодулина (CaM), который чаще всего используют в качестве Ca^{2+}-связывающего домена, является их способность взаимодействовать с белками клетки. Мы решили создать кальциевый индикатор с новым дизайном на основе одного флуоресцентного белка и Ca^{2+}-связывающего белка тропонина С, который ранее не использовали для создания такого типа сенсоров. В качестве Ca^{2+}-связывающей части был выбран С-концевой домен белка тропонина С (руки EF3 и EF4) из мускулатуры плавательного пузыря рыбы-жабы *Opsanus tau*, который не имеет белков-партнеров в нейронах млекопитающих. С-концевой домен тропонина С состоит из двух Ca^{2+}-связывающих мотивов, в отличие от полноразмерных кальмодулина и тропонина С в других кальциевых индикаторах, и связывает 2 иона Ca^{2+} вместо 4-х, что уменьшает влияние индикатора на концентрацию ионов Ca^{2+} в клетке. Использование С-концевого домена тропонина С, а не полноразмерного белка, также уменьшает размер индикатора приблизительно на 100-240 а. о. по сравнению с ранее разработанными индикаторами на основе одного и двух флуоресцентных белков, соответственно (Рис. 1а), что облегчает экспрессию индикатора в животных клетках.

Другой проблемой ГККИ является их ограниченная яркость, поэтому в качестве флуоресцентной части был выбран новый флуоресцентный белок mNeonGreen, яркость которого в 3 раза выше яркости белка GFP, входящего в состав широко используемых индикаторов семейства GCaMP (Shaner *et al.*, 2013).

Для первичной конструкции кальциевого индикатора нуклеотидную последовательность тропонина С из *O. tau* синтезировали из олигонуклеотидов с помощью ПЦР с перекрывающимися фрагментами. Ca^{2+}-связывающую часть вставляли в последовательность флуоресцентного белка mNeonGreen между аминокислотными остатками 145 и 146, аналогично индикатору camgaroo-1 (Baird *et al.*, 1999). Между Ca^{2+}-связывающей и флуоресцентной частями вставляли линкеры длиной три произвольных а. о. (Рис. 1б). Полученную конструкцию или библиотеку генов индикатора с

рандомизированными линкерами клонировали в бактериальную плазмиду pBAD/HisB-TorA, содержащую сигнал транспорта индикатора в периплазму бактериальных клеток, и экспрессировали в клетках *E.coli* штамма BW25113.

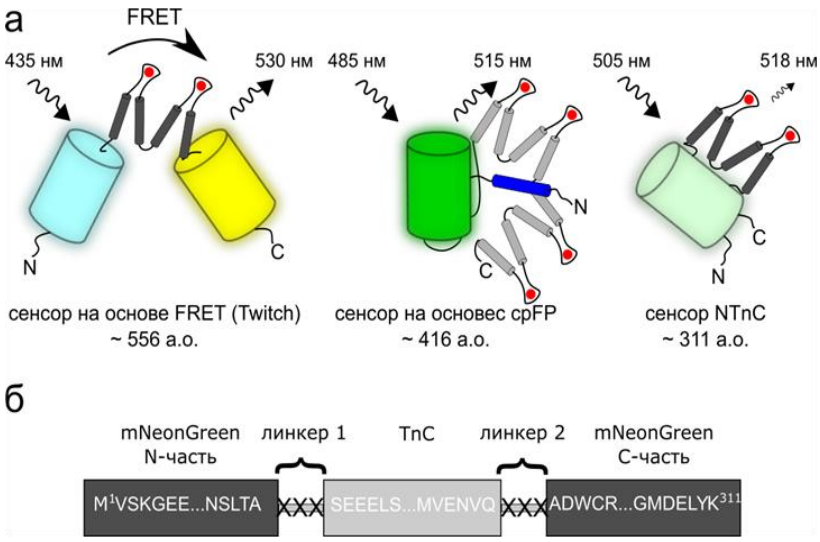

Рисунок 1. Схематичное изображение трех типов ГККИ (а) и исходной библиотеки генов индикатора NTnC (б). Все типы индикаторов представлены в Ca^{2+}-связанном состоянии. Флуоресцентные белки представлены в виде цилиндров. TnC, кальмодулин и M13-пептид выделены темно-серым, светло-серым и синим цветом, соответственно. cpFP – циркулярно пермутированный флуоресцентный белок.

Для оптимизации последовательности линкеров между флуоресцентной и Ca^{2+}-связывающей частями проводили скрининг полученной библиотеки. В процессе скрининга отбирали наиболее яркие и наиболее контрастные клоны, то есть клоны с наибольшим соотношением интенсивности флуоресценции до и после добавления буфера, содержащего хелатирующий агент ЭДТА. Скрининг осуществляли в три этапа. На первом этапе анализировали около 20,000 – 40,000 колоний на чашках Петри под флуоресцентным стереомикроскопом. Флуоресцентный контраст колоний определяли по изменению интенсивности флуоресценции на удаление ионов Ca^{2+} путем разбрызгивания буфера, содержащего ЭДТА. На следующем этапе 60-96 клонов, отобранных в результате скрининга на первом этапе, анализировали в бактериальных суспензиях и отбирали клоны с наибольшими показателями яркости и контраста после последовательного добавления буферов, содержащих $CaCl_2$ и ЭДТА. Отобранные на втором этапе клоны растили в среде LB, выделяли белки, очищали их на никель-содержащей смоле и определяли для них яркость и контраст. В результате скрининга исходной библиотеки генов был найден клон, интенсивность флуоресценции которого понижалась на 60% при добавлении 10 мМ $CaCl_2$.

Для улучшения яркости и контраста клон индикатора, найденный в результате оптимизации последовательности линкеров библиотеки генов, подвергали нескольким раундам случайного мутагенеза. Мутации вводили по всей длине гена с помощью ПЦР в присутствии ионов Mn^{2+} или с помощью кита GeneMorph II так, чтобы получить 2-3 случайные мутации на 1000 п.о. Полученные клоны экспрессировали в клетках *E.coli* штамма BW25113 с помощью вектора pBAD/HisB-TorA и скрининировали их на яркость и контраст в три этапа, как описано выше для исходной библиотеки генов индикатора. Случайный мутагенез проводили до тех пор, пока параметры яркости и контраста отобранных клонов индикатора не выходили на плато. Всего было проведено 5 раундов

случайного мутагенеза. В результате был получен окончательный вариант индикатора, названный NTnC (сокращенно от NeonGreen Troponin C).

2. Характеристика кальциевого индикатора NTnC *in vitro*

При анализе полученных в работе спектров испускания очищенного белка NTnC обнаружили, что его флуоресценция при 518 нм уменьшается при связывании ионов Ca^{2+} в отличие от флуоресценции большинства известных в настоящее время кальциевых индикаторов (например, семейств GCaMP и GECO) (Рис.2, Табл. 1). То есть индикатор NTnC обладает обратным фенотипом.

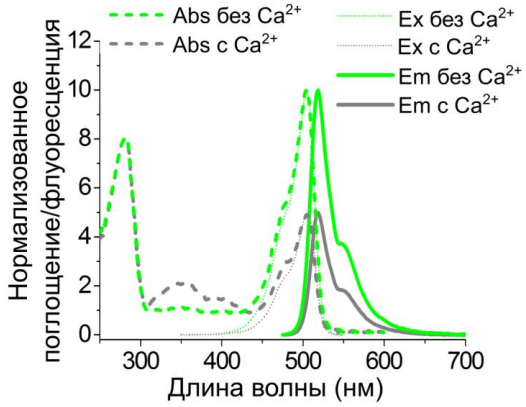

Рисунок 2. Спектры поглощения, возбуждения и испускания индикатора NTnC. Abs – поглощение, Ex – возбуждение, Em – испускание.

Яркость индикатора NTnC (в Ca^{2+}-свободном состоянии) превосходит яркость широко используемого кальциевого индикатора GCaMP6s (в Ca^{2+}-связанном состоянии) в 1,6 раз (Табл. 1), вероятно, за счет использования в качестве флуоресцентной части яркого белка mNeonGreen. Повышенная яркость является существенным преимуществом разработанного нами индикатора NTnC при его экспрессии в культуре клеток и *in vivo*.

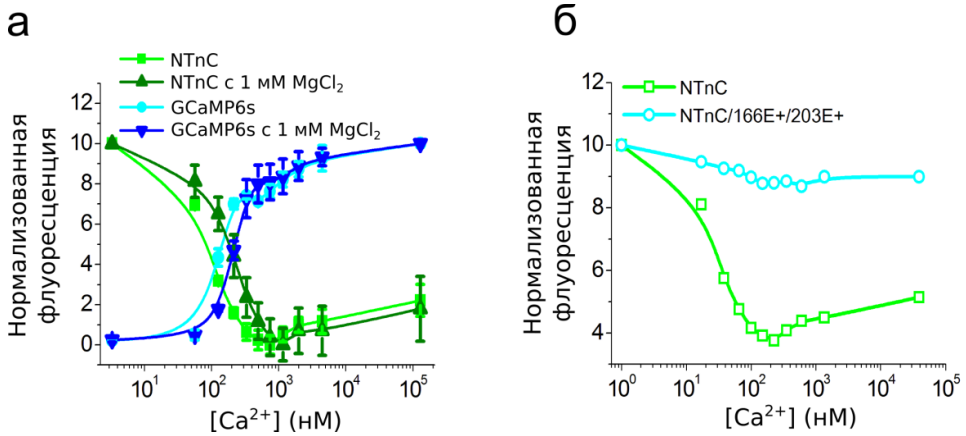

Рисунок 3. Титрование индикатора NTnC (а) и мутанта NTnC/166E+/203E+ (б) ионами Ca^{2+}.

Известно, что концентрация ионов Ca^{2+} в состоянии покоя в нейронах поддерживается на уровне 50-100 нМ, в то время, как в активном нейроне эти значения могут увеличиваться в 10-100 раз. Поэтому для того чтобы индикатор отражал изменения активности нейрона, сродство индикатора к ионам Ca^{2+} должно находиться в пределах изменения концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме нейрона. При равновесном титровании индикатора NTnC буферами с такими концентрациями Ca^{2+}-ЭГТА, чтобы свободная концентрация ионов Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]$) менялась от 0 до 39 мкМ, то есть в пределах изменения концентрации ионов Ca^{2+} в

цитоплазме нейронов константа диссоциации ($K_д$) для NTnC составила 84±6 нМ. Сродство NTnC к ионам Ca^{2+} в 1,7 раз выше, чем у GCaMP6s (Рис. 3а, Табл. 1), то есть индикатор NTnC более чувствителен к изменениям концентрации ионов Ca^{2+}, происходящим при минимальной кальциевой активности нейронов, вызванной одним потенциалом действия.

3. Анализ кристаллической структуры кальциевого индикатора NTnC

Совместно с нашими коллегами из НИЦ «Курчатовский Институт» была получена кристаллическая структура комплекса индикатора NTnC с ионами Ca^{2+} и проведен ее рентгеноструктурный анализ. Индикатор NTnC состоит из 11 β-цепей флуоресцентного белка mNeonGreen, внутри которого расположен хромофор, а также из С-концевого домена тропонина С, координирующего два иона Ca^{2+} (Рис. 4а). Два иона Ca^{2+} в NTnC координируются шестью а.о. в мотиве EF3: D161 (+x), D163 (+y), D165 (+z), F167 (-y), D169 через молекулу H_2O (-x) и E172 (-z) и шестью а.о. в мотиве EF4: D197 (+x), D199 (+y), N201 через молекулу H_2O (+z), R203 (-y), D205 (-x) и E208 (-z) (Рис. 4б, в).

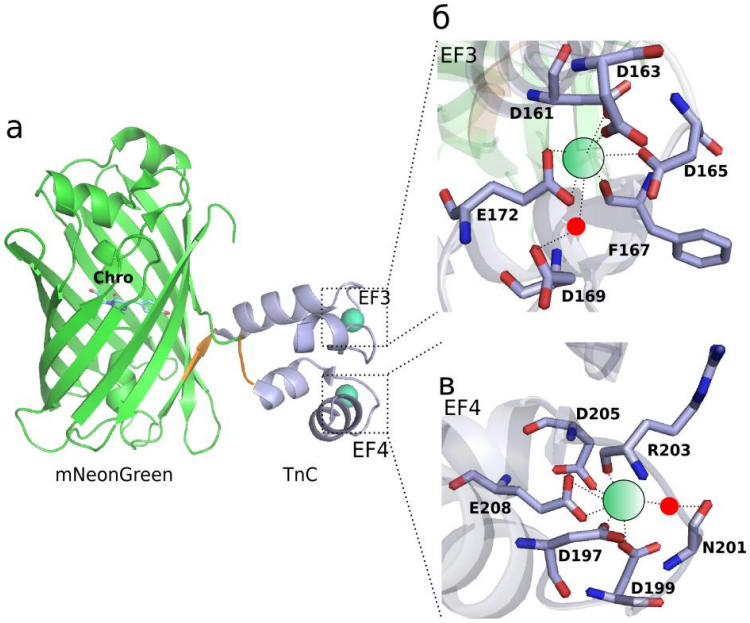

Рисунок 4. Кристаллическая структура индикатора NTnC в Ca^{2+}-связанном состоянии (PDB 5mwc). (а) Кристаллическая структура NTnC. **(б, в)** Ca^{2+}-связывающие мотивы 3 и 4 (EF3 и EF4). Ионы Ca^{2+} представлены в виде зеленых сфер, молекулы воды – в виде красных сфер, Chro – хромофор; TnC – тропонин С. Разрешение структуры 2,45 Å.

Основываясь на анализе кристаллической структуры комплекса NTnC с ионами Ca^{2+}, мы разработали его версию с блокированным сродством к ионам Ca^{2+} для проверки специфичности реакции кальциевого индикатора NTnC. Для этого мы решили вставить два дополнительных остатка E в позиции 166 и 203 в Ca^{2+}-связывающие мотивы EF3 и EF4 (NTnC/166E+/203E+). Эти позиции были выбраны с расчетом, что вставленные остатки E будут увеличивать расстояния между ионами Ca^{2+} и координирующими аминокислотными остатками внутри Ca^{2+}-связывающей петли, нарушая тем самым взаимодействия координирующих а.о. с ионами Ca^{2+}, и вместе с тем будут направлены в сторону растворителя, чтобы не препятствовать сворачиваемости белка. При анализе флуоресценции мутанта NTnC/166E+/203E+, экспрессированного в клетках *E.coli*, оказалось, что введенные мутации не препятствуют сворачиваемости белка, так как полученный мутант был флуоресцентен, а флуоресценция индикатора возможна только в присутствии полностью сформированного хромофора и правильно свернутого белка. При анализе очищенного белка

NTnC/166E+/203E+ при [Ca^{2+}] в пределах 0-39 мкМ изменения интенсивности его флуоресценции не происходит, то есть он не связывает ионы Ca^{2+} (Рис. 3б).

4. Ответ индикатора NTnC на добавление внешнего кальция к культуре клеток HeLa

Для характеристики поведения разработанного кальциевого индикатора NTnC в клетках млекопитающих мы клонировали его в вектор для эукариотической экспрессии (pAAV-*CAG*-NTnC), экспрессировали его в цитоплазме клеток HeLa вместе с контрольным красным индикатором R-GECO1 и анализировали изменение уровней флуоресценции индикаторов в ответ на добавление насыщающих концентраций ионов Ca^{2+}. При добавлении 2 мМ $CaCl_2$ с 5 мкМ иономицином, необходимым для увеличения эффективности проникновения ионов Ca^{2+} через мембрану, наблюдали двукратное падение интенсивности флуоресценции NTnC в течение 2 минут и одновременное увеличение интенсивности флуоресценции экспрессированного в тех же клетках R-GECO1 (Рис. 5а).

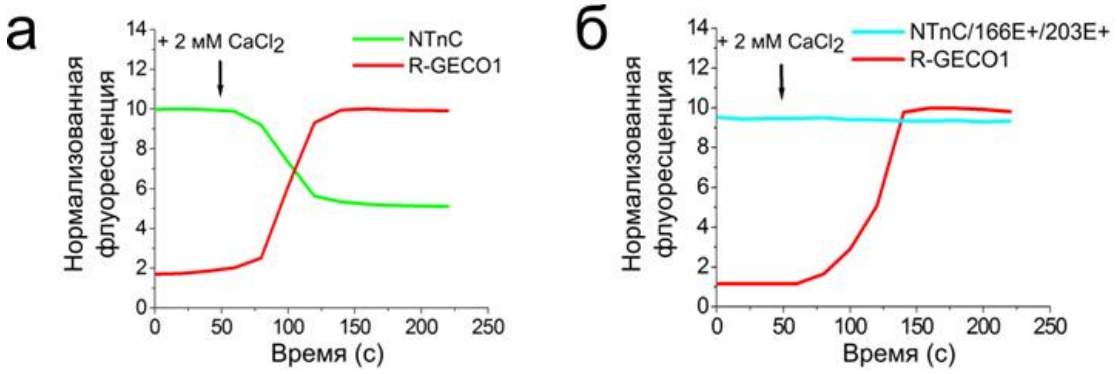

Рисунок 5. Ответ индикатора NTnC (а) и мутанта NTnC/166E+/203E+ (б) в культуре клеток HeLa на добавление 2 мМ $CaCl_2$/5 мкМ иономицина.

При экспрессии мутанта NTnC/166E+/203E+ в цитоплазме клеток HeLa интенсивность его зеленой флуоресценции не меняется при добавлении 2 мМ $CaCl_2$ и 5 мкМ иономицина (Рис. 5б). Таким образом, наши данные подтверждают специфичную реакцию индикатора NTnC на изменение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме культивируемых клеток млекопитающих и показывают, что его мутант NTnC/166E+/203E+ может быть использован в качестве контроля для оценки влияния изменения pH и других факторов на изменение флуоресценции NTnC.

5. Визуализация спонтанной активности в культуре нейронов с помощью кальциевого индикатора NTnC

Для экспрессии кальциевого индикатора NTnC в культуре нейронов вначале получали рекомбинантные адено-ассоциированные вирусные частицы (rAAV), несущие кальциевые индикаторы NTnC или R-GECO1. Вирусными частицами трансдуцировали диссоциированную нейрональную культуру, выделенную из коры головного мозга мышей линии C57/Bl6 возрастом P0-P2. В процессе спонтанной активности нейронов, зарегистрированной спустя 2-3 недели культивирования, наблюдали уменьшение интенсивности флуоресценции в среднем на 20% в случае NTnC и увеличение флуоресценции на 60% в случае R-GECO1 (Рис. 6а, Табл. 1).

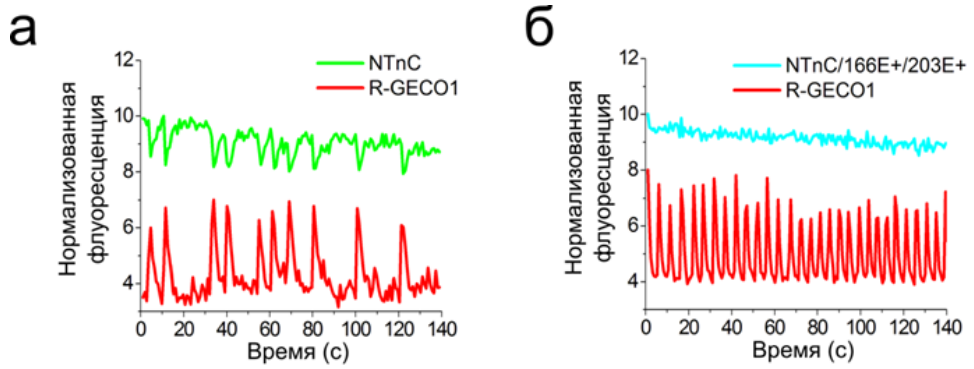

Рисунок 6. Ответ индикатора NTnC (а) и мутанта NTnC/166E+/203E+ (б) в цитоплазме культивируемых нейронов.

Уровень флуоресценции мутанта NTnC/166E+/203E+, не способного связывать ионы Ca^{2+} при концентрации 0-39 мкМ, не менялся в культуре при спонтанной активности нейронов (Рис. 6б). Таким образом, наши данные доказывают, что индикатор NTnC отражает специфичные изменения концентрации ионов Ca^{2+} при спонтанной активности нейронов мыши в культуре.

6. Визуализация активности нейронов мыши с помощью индикатора NTnC *in vivo*

Для того чтобы проверить, применим ли индикатор NTnC для регистрации нейрональной активности в мозге *in vivo*, трансдуцировали слой 2/3 первичной зрительной коры (V1) мозга мышей линии C57/Bl6 полученными нами вирусными частицами (rAAV), несущими индикатор NTnC. Через 60-65 дней после введения вирусных частиц трансдуцированный участок мозга снимали с помощью двухфотонного микроскопа (Рис. 7а). Работа выполнена совместно с отделом нейронаук НИЦ «Курчатовский институт» (Рощина М.А., Сотсков В.П.).

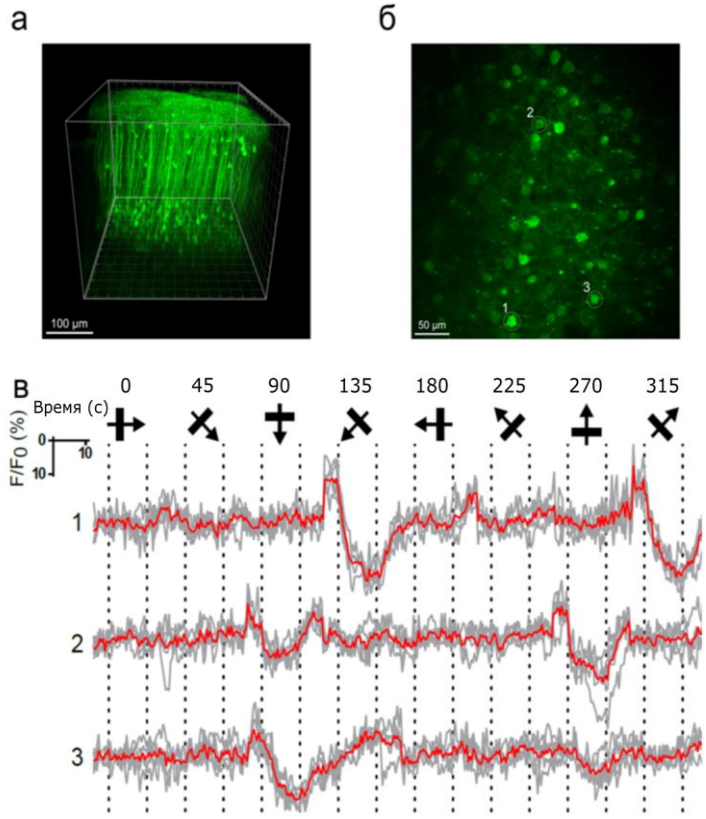

Рисунок 7. Активность нейронов, вызванная зрительными стимулами, в коре мозга мыши, визуализированная с помощью индикатора NTnC и двухфотонного микроскопа. (а) Трехмерная реконструкция изображения зоны V1 в коре головного мозга мыши возрастом 11 недель после введения вирусных частиц (AAV-*CAG*-NTnC). **(б)** Изображение клеток в зрительной коре мыши, экспрессирующих индикатор NTnC, полученное с помощью двухфотонного микроскопа *in vivo*. **(в)** Зависимость $\Delta F/F_0$ от времени для нейронов 1 – 3, выделенных на **(б)** при стимуляции с помощью предъявления двигающихся полос (8 направлений, 5 повторов). Показаны направления движения полос; серые линии – индивидуальный сигнал, красные – средний сигнал по 5 повторам.

Для подтверждения того, что индикатор NTnC отражает изменение активности нейронов *in vivo*, мы использовали модель зрительной стимуляции, которая широко применяется для изучения специфичного ответа нейронов, экспрессирующих кальциевые индикаторы, в частности, GCaMP6 (Chen *et al.*, 2013). Животным предъявляли полосы, движущиеся в 8 разных ориентациях, и одновременно снимали область зрительной коры, изображенную на рисунке 7б, с помощью двухфотонного микроскопа. Флуоресцентные изменения в телах нейронов зависели от ориентации полос и воспроизводились в пяти попытках (Рис. 7в). Аналогичную активность нейронов в зависимости от ориентации полос в идентичной экспериментальной модели ранее наблюдали для индикатора GCaMP6s (Chen *et al.*, 2013).

Мы также устанавливали минимикроскоп nVista HD на голову мышам с введенными в область зрительной коры вирусными частицами с индикатором NTnC или контрольным индикатором GCaMP6s. Мышей помещали в клетку с новой для них обстановкой и снимали кальциевую активность в течение 5 мин. Важно отметить, что при установке микроскопа интенсивность флуоресценции контрольного индикатора GCaMP6s резко уменьшалась из-за введения животным анестезии. Повышенная яркость и обратный фенотип разработанного нами индикатора NTnC существенно облегчали установку минимикроскопа, так как позволяли визуализировать неактивные нейроны с пониженной концентрацией ионов Ca^{2+} в нужной области мозга. Средняя величина ответа $\Delta F/F_0$ для NTnC была в 2,5 раза меньше, чем для GCaMP6s (0,012±0,004 для NTnC и 0,03±0,02 для GCaMP6s). Другая ключевая характеристика – отношение сигнал/шум (SNR) – величина, отражающая способность индикатора детектировать изменение концентрации ионов Ca^{2+} относительно флуктуаций интенсивности фоновой флуоресценции была практически идентична для обоих индикаторов (4,4±1,1 для NTnC и 4,7±1,8 для GCaMP6s), вероятно, благодаря повышенной яркости индикатора NTnC.

Таким образом, нам удалось разработать и охарактеризовать кальциевый индикатор NTnC с новым дизайном на основе С-концевого домена тропонина С и одного флуоресцентного белка mNeonGreen *in vitro* и *ex vivo*. С помощью индикатора NTnC визуализировали кальциевую активность в мозге мыши в ответ на зрительную стимуляцию, а также спонтанную активность в мозге свободноподвижного животного с установленным минимикроскопом nVista HD.

7. Разработка улучшенной версии NTnC-подобного индикатора на основе белка EYFP, его характеристика *in vitro*, в культуре клеток HeLa и в культуре нейронов мыши

Несмотря на высокую яркость и небольшой размер, основным недостатком разработанного нами кальциевого индикатора NTnC является его ограниченный контраст в ответ на изменение концентрации ионов Ca^{2+}, который может затруднять визуализацию активности нейронов *in vivo*. Мы решили увеличить контраст индикатора NTnC и для этого заменили флуоресцентный белок mNeonGreen на EYFP, так как ранее на основе EYFP был разработан кальциевый индикатор camgaroo-1 с контрастом выше, чем у индикатора NTnC

(Baird *et al.*, 1999). Было создано три библиотеки генов индикатора, в которых последовательность С-концевого домена тропонина С из индикатора NTnC вставляли в последовательность EYFP между остатками 144 и 146 (библиотека L1), 144 и 145 (библиотека L2) или 147 и 149 (библиотека L3). Эти позиции выбирали исходя из данных, полученных при создании кальциевого индикатора camgaroo-1, показывающих возможность вставки Ca^{2+}-связывающей части в определенные позиции последовательности флуоресцентного белка без потери его флуоресцентных свойств (Baird *et al.*, 1999). N-конец Ca^{2+}-связывающей части соединяли с флуоресцентной частью линкером длиной три произвольных а.о., С-конец – линкером длиной два произвольных а.о.

Полученные библиотеки генов индикаторов с рандомизированными линкерами клонировали в вектор pBAD/HisB-TorA, экспрессировали их в клетках бактерий *E.coli* штамма BW25113 и анализировали, как было описано выше для индикатора NTnC. После трехэтапного скрининга на яркость и контраст в одной из библиотек (библиотека L1) был обнаружен клон, реагирующий на понижение концентрации ионов Ca^{2+} увеличением интенсивности флуоресценции в 2,5 раза, что было больше, чем ответ исходного индикатора NTnC. Найденный клон взяли для дальнейшего случайного мутагенеза, который проводили, как было описано для индикатора NTnC. После 4 раундов случайного мутагенеза и скрининга на яркость и контраст нами был получен индикатор iYTnC (inverse EYFP derived TnC-based calcium indicator). Обнаружили, что контраст iYTnC *in vitro* в 7 раз выше, чем контраст исходного индикатора NTnC (контраст для iYTnC 14±1; для NTnC 2,0±0,3). Однако на культуре нейронов мыши не наблюдали улучшения величины ответа iYTnC относительно NTnC во время спонтанной активности. Кроме того, контраст индикатора iYTnC *in vitro* при добавлении ионов Ca^{2+} существенно зависел от присутствия ионов Mg^{2+} (контраст для iYTnC в присутствии ионов Mg^{2+} 4,1±0,2; для NTnC 2,0±0,7).

Проанализировав аминокислотную последовательность полученного кальциевого индикатора iYTnC, мы обнаружили две случайные мутации в Ca^{2+}-связывающей части iYTnC относительно последовательности NTnC (C155Y и D194G). Мутации располагались в непосредственной близости от Ca^{2+}-связывающих мотивов и могли привести к появлению зависимости контраста индикатора iYTnC в ответ на добавление ионов Ca^{2+} от присутствия ионов Mg^{2+}. Мы решили вернуть два аминокислотных остатка в позициях 155 и 194 из последовательности индикатора NTnC, то есть сделать замены G194D и Y155C в iYTnC. Для того чтобы избежать возможного окисления остатка C155 и его посттрансляционных модификаций в клетках млекопитающих, мы заменили его на S155. Полученный в результате индикатор был назван iYTnC2.

Очищенный на никель-содержащей смоле белок iYTnC2, как и NTnC, обладает обратным фенотипом: интенсивность его флуоресценции падает при связывании ионов Ca^{2+}. В Ca^{2+}-свободном состоянии при pH 7,2 наблюдали два максимума поглощения (при 413 нм и 499 нм) и два максимума эмиссии (при 516 и 518 нм) (Табл. 1). Яркость флуоресценции формы iYTnC2 с пиком поглощения при 499 нм в 6 раз ниже яркости индикатора NTnC в отсутствие ионов Ca^{2+} (Табл. 1), что является недостатком индикатора iYTnC2, особенно при

его экспрессии *in vivo*, однако максимальный контраст флуоресценции iYTnC2 (8,1±0,4) в 4 раза больше, чем у исходного индикатора NTnC (2,0±0,3), что может компенсировать пониженную яркость iYTnC2 при его экспрессии в нейронах.

В соответствии с кривыми титрования $К_д$ индикатора iYTnC2 составила 295±9 нМ, что в 3,5 раза больше, чем $К_д$ индикатора NTnC ($К_д$ = 84±6 нМ) и близка к $К_д$ контрольного индикатора GCaMP6f ($К_д$ = 370±8).

Изменение концентрации ионов Ca^{2+} во время активности нейронов происходит в течение сотен миллисекунд, поэтому для того чтобы понять, насколько быстро ионы Ca^{2+} диссоциируют от индикатора iYTnC2 и подходит ли он для изучения активности нейронов, кинетику диссоциации iYTnC2 и ионов Ca^{2+} изучали с помощью метода флуориметрии остановленного потока. Обнаружили, что полувремя диссоциации ионов Ca^{2+} для iYTnC2 было в 5 раза меньше, чем для комплекса NTnC-Ca^{2+} и в 1,7 раз больше, чем для контрольного индикатора GCaMP6f ($t_{1/2}^{iYTnC2}$=0,58 с, $t_{1/2}^{NTnC}$=3 с, $t_{1/2}^{GCaMP6f}$ =0,35 с, Рис. 8, Табл. 1). Таким образом, скорость диссоциации ионов Ca^{2+} в случае индикатора iYTnC2 в 5 раз быстрее, чем аналогичная скорость для ранее разработанного NTnC, что является существенным преимуществом iYTnC2 для визуализации быстрой активности нейронов.

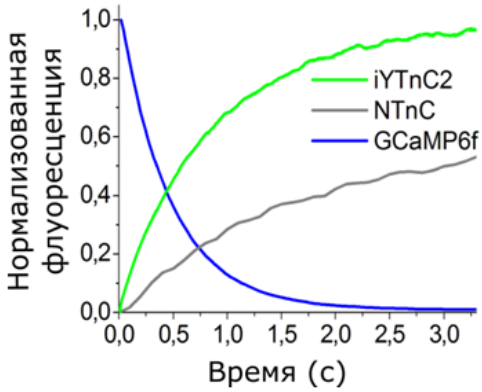

Рисунок 8. Кинетика диссоциации индикаторов iYTnC2, NTnC и GCaMP6f и ионов Ca^{2+}.

Индикатор iYTnC2 клонировали в вектор для экспрессии в животных клетках (pAAV-*CAG*-iYTnC2) и экспрессировали его в культуре клеток HeLa. При добавлении раствора 2 мМ $CaCl_2$/2,5 мкМ иономицин к культурам клеток HeLa, экспрессирующим iYTnC2, наблюдали падение интенсивности флуоресценции индикатора iYTnC2 в среднем в 4,2 раз, что в 2,7 раз больше, чем относительный контраст индикатора NTnC в тех же условиях и всего в 1,3 раза меньше, чем контраст красного индикатора R-GECO1, экспрессированного в тех же клетках.

Для оценки поведения индикатора iYTnC2 в нейронах выделяли рекомбинантные адено-ассоциированные вирусные частицы (rAAV), несущие индикатор iYTnC2, и сравнивали его ответ во время спонтанной активности в диссоциированной культуре нейронов с ответом индикаторов NTnC и R-GECO1. Нормализованные относительно изменения интенсивности индикатора R-GECO1 величины $\Delta F/F_0$ достигали 96±31% в случае iYTnC2 и 22,7±3,4% в случае NTnC (Табл. 1). Таким образом, заменив флуоресцентный белок mNeonGreen на EYFP в индикаторе NTnC нам удалось разработать новый индикатор на основе одного флуоресцентного белка и С-концевого домена тропонина С, iYTnC2, ответ

которого в культуре клеток HeLa и в культуре нейронов, соответственно, в 2,7 и 4 раза выше ответа исходного индикатора NTnC.

8. Визуализация активности нейронов гиппокампа свободноподвижной мыши с помощью минимикроскопа nVista и кальциевого индикатора iYTnC2

Быстрая скорость диссоциации ионов Ca^{2+} индикатором iYTnC2 является существенным преимуществом для применения индикатора в моделях *in vivo*, однако пониженная яркость индикатора *in vitro* может затруднять его использование в мозге животных. Для того чтобы проверить, насколько индикатор iYTnC2 применим в экспериментах *in vivo*, мы вводили вирусные частицы (rAAV), несущие iYTnC2, в CA1 зону гиппокампа мышей. Гиппокамп – часть системы мозга, участвующей в консолидации памяти, то есть в переходе кратковременной памяти в долговременную. Кроме того, в гиппокампе располагаются так называемые нейроны места (place cells), участвующие в формировании пространственных карт мозга у грызунов. Работа выполнена совместно с отделом нейронаук НИЦ «Курчатовский институт» (Сотсков В.П.).

После введения вирусных частиц мышам устанавливали минимикроскоп nVista HD и выпускали их исследовать обстановку «открытое поле», предназначенную для изучения поведения грызунов в новых условиях. Нам удалось идентифицировать трансдуцированные индикатором iYTnC2 нейроны, интенсивность флуоресценции которых уменьшалась во время спонтанной активности. Величины усредненного ответа ($\Delta F/F_0$) и отношения сигнал/шум (SNR) для индикатора iYTnC2 оказались сравнимы с аналогичными параметрами, ранее полученными при спонтанной активности нейронов зрительной коры для индикатора NTnC с помощью минимикроскопа nVista ($\Delta F/F_0 = 0{,}01 \pm 0{,}002$ и SNR = 6,5±1,8 для iYTnC2 в нейронах гиппокампа; $\Delta F/F_0 = 0{,}012 \pm 0{,}004$ и SNR = 4,1±1,1 для NTnC в нейронах зрительной коры).

Таким образом, нам удалось визуализировать спонтанную активность нейронов в мозге мыши *in vivo* с помощью разработанного нами кальциевого индикатора iYTnC2. Хотя яркость iYTnC2 *in vitro* меньше, чем яркость NTnC, оба индикатора продемонстрировали одинаковую величину ответа при активности нейронов *in vivo*, возможно из-за повышенного контраста iYTnC2. Мы надеемся, что дальнейшее улучшение яркости и динамического диапазона, а также использование в качестве флуоресцентной части белков других цветов (помимо зеленого и желтого) позволит более широко применять разработанные нами NTnC-подобные кальциевые индикаторы для изучения процессов активности мозга, лежащих в основе поведения животных.

9. Разработка генетически кодируемого кальциевого индикатора на основе кальмодулинов и киназ грибов

Преимуществами разработанных ранее индикаторов NTnC и iYTnC2 является их уникальный дизайн, небольшой размер, а также входящий в их состав в качестве Ca^{2+}-связывающей части С-концевой домен тропонина С, который, в отличие от кальмодулина позвоночных животных, не приводит к взаимодействию данных индикаторов с

внутриклеточными компонентами. Однако основным недостатком индикаторов NTnC и iYTnC2 является их ограниченный контраст или яркость и отсутствие второй флуоресцентной формы, которая позволяла бы количественное определение ионов Ca^{2+}.

Поэтому мы решили создать кальциевый индикатор на основе кальмодулина и M13-подобного пептида из царства грибов, чтобы, с одной стороны, избежать взаимодействия индикатора с компонентами внутри клетки, а, с другой стороны, создать индикатор с новыми свойствами.

Для создания такого индикатора мы проанализировали ряд нуклеотидных последовательностей кальмодулина и M13-подобного пептида из двух видов грибов *Aspergillus niger* и *Aspergillus fumigatus* и одного вида дрожжей *Komagataella pastoris,* гомологичных Ca^{2+}-связывающим белкам позвоночных. При сборке исходных библиотек генов индикатора использовали последовательности белков кальмодулинов, выделенные из гриба *A. niger* и дрожжей *K. pastoris*, а также последовательности M13-подобных пептидов или CaM-связывающих участков кальцинейринов из гриба *A. fumigatus* и дрожжей *K. pastoris*. CaM-связывающие участки кальцинейринов в данном случае служили аналогом M13-подобных пептидов. Перечисленные белки грибов и дрожжей гомологичны соответствующим белкам позвоночных (66-85% идентичность для CaM, 25-40% идентичность для M13-подобных пептидов, 56,5% идентичность для CaM-связывающих участков кальцинейринов). Для сборки библиотек индикатора выделяли мРНК из вышеупомянутых организмов и затем амплифицировали кДНК кальмодулинов с помощью ПЦР и обратной транскриптазы со специфичными праймерами. Нуклеотидные последовательности M13-подобных пептидов и CaM-связывающих участков кальцинейринов синтезировали из олигонуклеотидов с помощью ПЦР с перекрывающимися фрагментами.

В качестве флуоресцентной части использовали белок cpEGFP из широко используемого кальциевого индикатора GCaMP6f или mNeonGreen из индикатора NTnC. Последовательность белка cpEGFP или mNeonGreen вставляли между последовательностями M13-подобного пептида/CaM-связывающего участка кальцинейрина и кальмодулина аналогично серии индикаторов GCaMP (Chen *et al.*, 2013) (Рис. 9). M13-подобный пептид или CaM-связывающий участок кальцинейрина располагался на N-конце, а CaM – на C-конце, соответственно. C-конец M13-подобного пептида/CaM-связывающего участка кальцинейрина соединяли с флуоресцентной частью линкером длиной 2 произвольных а.о., N-конец CaM – линкером длиной 3 произвольных а.о. (Рис. 9). Всего было создано восемь библиотек генов индикатора с разными Ca^{2+}-связывающими и флуоресцентными частями.

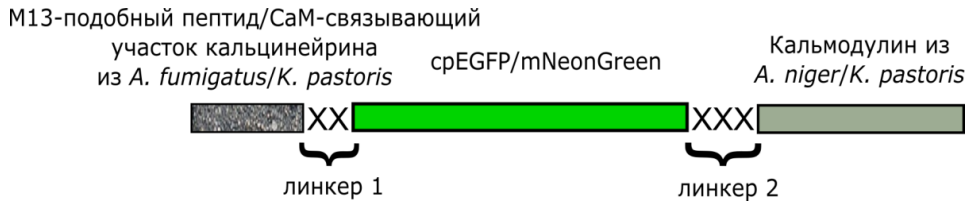

Рисунок 9. Схематичное изображение исходной библиотеки генов индикатора FGCaMP.

Исходные библиотеки генов индикатора с рандомизированными линкерами клонировали в вектор pBAD/HisB-TorA, экспрессировали их в клетках бактерий *E.coli* штамма BW25113 и анализировали, как было описано выше для индикатора NTnC. После анализа клонов на бактериальных суспензиях наибольшее изменение флуоресценции при добавлении ионов Ca^{2+} (на 68%) наблюдали в случае библиотеки с парой белков [CaM из *A. niger*/M13-подобный пептид из *A. fumigatus*]. Данный вариант далее подвергали трем раундам случайного мутагенеза и отбора на яркость и контраст, которые проводили, как было описано для индикатора NTnC. Окончательный вариант ГККИ был назван FGCaMP (сокращенно от fungi green CaM-based protein).

10. Характеристика кальциевого индикатора FGCaMP *in vitro*

Анализ полученных в работе спектров очищенного белка FGCaMP показал, что он отличается двумя пиками поглощения: при 402 нм и 493 нм (Рис. 10а, Табл. 1) и одним пиком эмиссии в области 516 нм (Рис. 10б, Табл. 1). Связывание ионов Ca^{2+} с индикатором FGCaMP приводит к увеличению интенсивности флуоресценции в 14,7 раз при возбуждении индикатора в области 493 нм и падению интенсивности флуоресценции в 6,9 раз при возбуждении индикатора в области 402 нм. Таким образом, FGCaMP является рациометрическим кальциевым индикатором, который позволяет количественно определять концентрацию ионов Ca^{2+}.

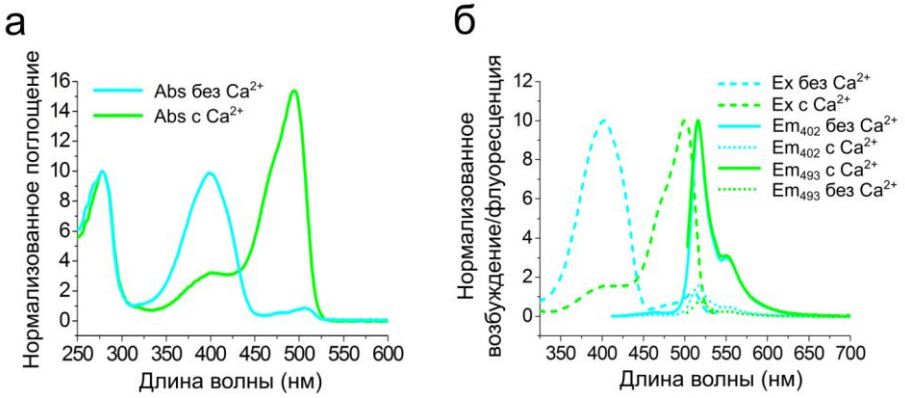

Рисунок 10. Спектры поглощения (а), возбуждения и эмиссии (б) индикатора FGCaMP.

В результате измерения равновесных $К_д$ было обнаружено, что связывание ионов Ca^{2+} индикатором FGCaMP при возбуждении 493 нм представляет собой двухступенчатый процесс с двумя константами диссоциации: $К_{д1}$ 273±7 нМ и $К_{д2}$ 4,7±0,2 мкМ (Рис. 11, Табл. 1). При возбуждении индикатора FGCaMP длиной волны 402 нм кривая связывания ионов Ca^{2+} монофазна с $К_д$ 276±9 нМ, что практически совпадает с $К_{д1}$ при возбуждении FGCaMP 493 нм (Рис. 11). Таким образом, при низких концентрациях ионов Ca^{2+} около 0-500 нМ FGCaMP ведет себя как рациометрический индикатор, при концентрации ионов Ca^{2+} выше 500 нМ индикатор можно считать интенсиометрическим.

Исходный гибридный белок M13-пептид/CaM без флуоресцентной части также демонстрировал двухфазное связывание ионов Ca^{2+} с двумя $К_д$, составляющими 2 мкМ и 80 нМ и характеризующими независимое связывание ионов Ca^{2+} с N-концом (Ca^{2+}-

связывающие домены EF 1-2) и С-концом (Ca^{2+}-связывающие домены EF 3-4) кальмодулина, соответственно. Таким образом, вероятно, в случае индикатора FGCaMP компоненты с высоким и низким сродством к ионам Ca^{2+} также могут соответствовать связыванию ионов Ca^{2+} с С- и N-концами белка. Можно предположить, что в первую очередь ионы Ca^{2+} связываются с Ca^{2+}-связывающими руками 3-4, что ведет к падению интенсивности флуоресценции формы FGCaMP с пиком поглощения при 402 нм и увеличению флуоресценции формы с пиком поглощения при 493 нм. Затем ионы Ca^{2+} связываются с Ca^{2+}-связывающими руками 1-2, и это приводит только к увеличению интенсивности флуоресценции формы индикатора с максимумом поглощения при 493 нм.

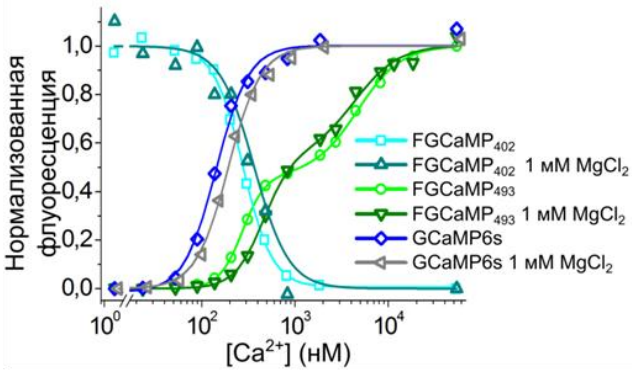

Рисунок 11. Кривые титрования ионами Ca^{2+} для индикаторов FGCaMP и GCaMP6s.

Таблица 1. Основные свойства индикаторов NTnC, iYTnC2, FGCaMP и GCaMP6s

Свойства	Индикаторы			
	NTnC (-Ca^{2+})	**iYTnC2 (-Ca^{2+})**	**FGCaMP (+Ca^{2+})**	**GCaMP6s (+Ca^{2+})**
Ca^{2+}-связывающая часть	С-концевой домен TnC из *O.tau*	С-концевой домен TnC из *O.tau*	M13-подобный пептид из *A.fumigatus*, CaM из *A.niger*	M13-пептид и CaM из *M.musculus*
Флуоресцентная часть	mNeonGreen	EYFP	cpEGFP	cpEGFP
Максимум поглощения/эмиссии (нм)	505/518	499 (413)/ 518 (516)	493/516	500/515
Яркость (%) [а]	163	26 (1,3)	104	100
Контраст *in vitro*	2,0±0,3	8,1±0,4	14,7±0,6	44±6
$K_д$ (нМ) [б]	84±6 [n=2,5±0,6]	295±9 [n=1,7±0,1]	273±7 [n_1=3,5±0,3]; 4700±200 [n_2=1,9±0,2]	144±9 [n=4,0±0,6]
$t_{1/2}^{off}$ (с)	3,00±0,05	0,58±0,01	0,66±0,01	0,88±0,01
Контраст в HeLa	2,0±0,2	4,2±1,0	14±2	6,0±1,5
$\Delta F/F_0$ (%) [в]	22,7±3,4	96±31	32±3	100±20

[а] Яркость определяли как произведение квантового выхода и коэффициента экстинкции. [б] Коэффициент Хилла указан в квадратных скобках. [в] $\Delta F/F_0$ определяли в культуре нейронов. $\Delta F/F_0$ указан относительно $\Delta F/F_0$ коэкспрессированного в тех же клетках индикатора R-GECO1. TnC – тропонин С, CaM – кальмодулин.

11. Экспрессия кальциевого индикатора FGCaMP в культуре клеток HeLa

При добавлении раствора 2 мМ $CaCl_2$/5 мкМ иономицин к культуре клеток HeLa, экспрессирующих FGCaMP, наблюдали 4-х кратное уменьшение интенсивности

флуоресценции формы FGCaMP с пиком поглощения 402 нм и 14-ти кратное увеличение интенсивности флуоресценции формы FGCaMP с пиком поглощения 493 нм. То есть индикатор FGCaMP сохраняет свойство рациометричности в культуре клеток HeLa.

Принципиальным отличием разработанного нами индикатора FGCaMP является использование в качестве Ca^{2+}-связывающей части Ca^{2+}-связывающих белков из гриба рода *Aspergillus*. Это может препятствовать взаимодействию индикатора FGCaMP и белков внутри клеток млекопитающих. Для того чтобы оценить возможное взаимодействие индикатора FGCaMP с внутриклеточными белками, участок цитоплазмы клеток HeLa площадью около 1 мкм^2, экспрессирующий индикатор FGCaMP или контрольные индикаторы на основе кальмодулина позвоночных GCaMP6s и G-GECO1.2, выжигали лазером с возбуждением 488 нм и мощностью 100% при физиологических условиях и затем наблюдали восстановление флуоресценции (Рис. 12). В случае индикатора FGCaMP флуоресценция полностью восстанавливалась до исходного уровня в течение 50 мс после выжигания (Рис. 12а). Флуоресценция контрольных индикаторов GCaMP6s и G-GECO1.2 в тех же условиях восстанавливалась до уровня 70-74% от исходных значений (Рис. 12б, в). Полученные данные говорят в пользу того, что около 30% белков GCaMP6s и G-GECO1.2, в состав которых входит кальмодулин позвоночных животных, немобильны в цитоплазме клеток при физиологических концентрациях ионов Ca^{2+} и могут взаимодействовать с кальмодулином клетки или другими белками, в то время как FGCaMP на основе кальмодулина гриба *A. niger* полностью подвижен в цитоплазме клеток линии HeLa.

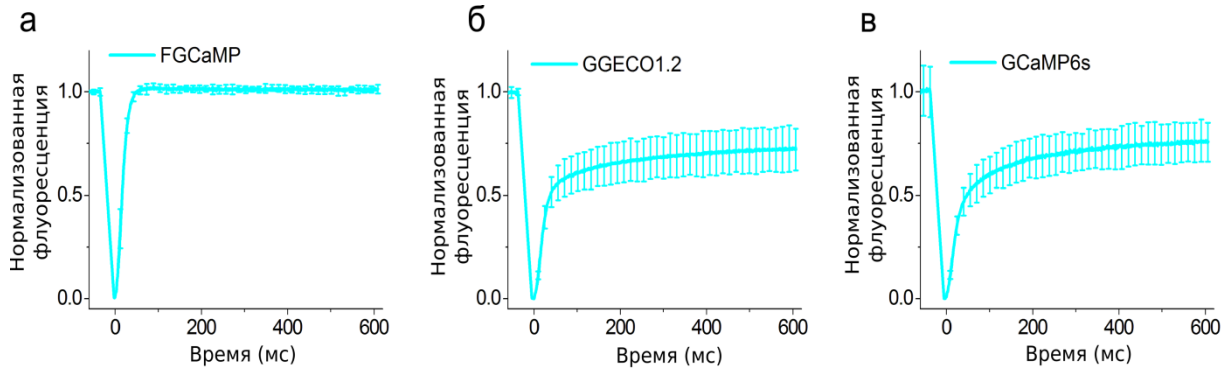

Рисунок 12. Восстановление флуоресценции после фотовыжигания (FRAP) для индикаторов FGCaMP (а), G-GECO1.2 (б) и GCaMP6s (в).

12. Визуализация спонтанной активности в культуре нейронов с помощью FGCaMP

Для изучения спонтанной активности нейронов с помощью индикатора FGCaMP получали вирусные частицы (rAAV) с индикатором FGCaMP и контрольным красным индикатором R-GECO1 и трансдуцировали ими диссоциированные культуры нейронов, выделенные из мышей линии C57/Bl6 возрастом P0-P2. На 14-21-й день *in vitro* во время спонтанной активности нейронов интенсивность флуоресценции FGCaMP падала на 16% при возбуждении 405 нм, в то время как при возбуждении 493 нм интенсивность флуоресценции увеличивалась на 14%. Изменение рациометрического сигнала $\Delta R/R_0$ для FGCaMP составило 31%, что всего в 1,4 раза меньше, чем ответ $\Delta F/F_0$ для контрольного индикатора R-GECO1,

равный 44%. Времена увеличения и падения флуоресценции для FGCaMP и R-GECO1 в одной и той же клетке были практически одинаковыми. Таким образом, разработанный нами кальциевый индикатор FGCaMP сохраняет свойство рациометричности и отражает спонтанную активность нейронов в культуре.

13. Визуализация активности нейронов с помощью индикатора FGCaMP в мозге личинки *Danio rerio in vivo*

Для того чтобы оценить возможность использования кальциевого индикатора FGCaMP *in vivo*, мы изучали кальциевую активность в модели трансгенных личинок *Danio rerio*, чьи нейроны экспрессировали разработанный нами FGCaMP или контрольный индикатор GCaMP6f. Работа была выполнена совместно с Массачусетским технологическим институтом (Юнг Э., Петкевич К.Д.).

Для стимуляции активности нейронов в трансгенные личинки данио, экспрессирующие FGCaMP или GCaMP6f, вводили блокатор калиевых каналов 4-аминопиридин (4-AP). Анализ полученных данных показал, что среднее значение ответа $\Delta F/F_0$ для индикатора FGCaMP при возбуждении 488 нм составило 77%, что в 2,1 раз меньше, чем ответ контрольного индикатора GCaMP6f (161,7%). В то же время значение отношения сигнала к шуму (SNR) для FGCaMP оказалось схоже со значением SNR для GCaMP6f (данные по 43 нейронам в 5 рыбках для FGCaMP и 26 нейронам в 3 рыбках для GCaMP6f).

Таким образом, нам удалось визуализировать химически вызванную активность нейронов в мозге *Danio rerio* с помощью разработанного нами генетически кодируемого кальциевого индикатора FGCaMP *in vivo*. В целом, показатели $\Delta F/F_0$ и SNR оказались сравнимы для разработанного нами индикатора FGCaMP и контрольного индикатора GCaMP6f. Это делает перспективным дальнейшее улучшение индикатора FGCaMP и разработку подобных индикаторов на основе Ca^{2+}-связывающих частей из грибов или других организмов, последовательность Ca^{2+}-связывающих белков которых отличается от последовательности Ca^{2+}-связывающих белков позвоночных.

14. Анализ кристаллической структуры индикатора FGCaMP, структурно-направленная оптимизация его Ca^{2+}-связывающих доменов.

Совместно с коллегами из НИЦ «Курчатовский Институт» в данной работе была получена кристаллическая структура комплекса индикатора FGCaMP с ионами Ca^{2+} и проведен ее рентгеноструктурный анализ. Структура индикатора FGCaMP включает β-бочонок, состоящий из 11 β-цепей флуоресцентного белка cpEGFP с расположенным внутри хромофором, а также M13-подобный пептид и кальмодулин, координирующий четыре иона Ca^{2+} (Рис. 13а). Кальмодулин индикатора FGCaMP состоит из 8 α-спиралей, которые образуют 4 Ca^{2+}-связывающих мотива (EF1-EF4). EF1-4 координируют ион Ca^{2+} шестью аминокислотными остатками. Один из а.о. в EF-мотивах 1, 3 и 4 предположительно координирует ион Ca^{2+} через молекулу воды (Рис.13б, в).

Основываясь на данных кристаллической структуры FGCaMP мы попытались улучшить контраст и сродство индикатора FGCaMP к ионам Ca^{2+} путем оптимизации M13-

подобного пептида и кальмодулина из гриба рода *Aspergillus*, входящих в состав FGCaMP, с помощью направленного мутагенеза. Проанализировав кристаллическую структуру индикатора FGCaMP (Рис. 13), мы предположили, что замена N97D в Ca^{2+}-связывающем мотиве 3 может усилить взаимодействие с ионом Ca^{2+} и улучшить сродство кальциевого индикатора к ионам Ca^{2+} за счет внесения отрицательного заряда карбоксильной группы D97. При анализе кривых титрования мутанта FGCaMP/N97D обнаружили, что мутация N97D улучшает сродство высокоаффинной компоненты FGCaMP к ионам Ca^{2+} в 1,7 раз (уменьшает $К_{д1}$). Противоположная замена D137N в Ca^{2+}-связывающем мотиве EF4 FGCaMP, обнаруженная также в индикаторе GCaMP6s, ухудшала сродство высокоаффинной компоненты FGCaMP к ионам Ca^{2+} в 1,4 раз.

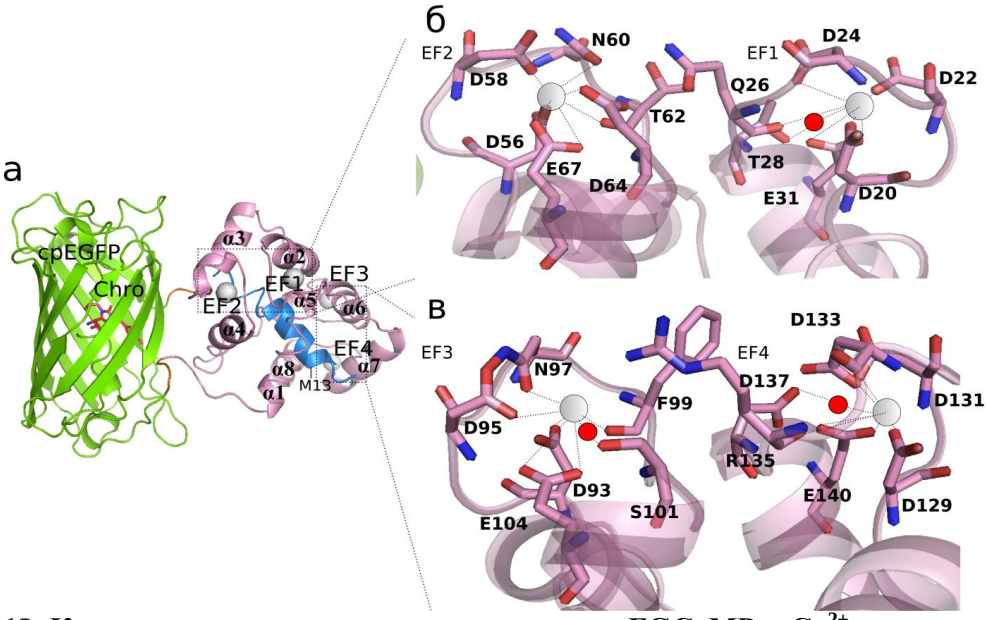

Рисунок 13. Кристаллическая структура индикатора FGCaMP в Ca^{2+}-связанном состоянии. (а) Кристаллическая структура FGCaMP. Chro – хромофор. **(б)** Ca^{2+}-связывающие мотивы 1 и 2 (EF1, EF2). **(в)**. Ca^{2+}-связывающие мотивы 3 и 4 (EF3, EF4). Ионы Ca^{2+} представлены в виде серых сфер, ионы воды – в виде красных сфер. Разрешение структуры 3,3 Å. **(б, в)**

Дополнительно в последовательность кальмодулина FGCaMP вводили известные мутации, улучшающие свойства других ГККИ: (N60D, D78Y/T79R и M36L), а также ранее обнаруженную в индикаторах NTnC и GCaMP6s мутацию Q26T, расположенную в мотиве EF1. Мы обнаружили, что несмотря на удаленность от хромофора (13.8-16.6 Å), двойная мутация D78Y/T79R в мутанте FGCaMP2 (FGCaMP/N60D/D78Y/T79R/N97D) уменьшает контраст компоненты FGCaMP с низким сродством к ионам Ca^{2+} (Рис. 14). Это согласуется с ранее полученными данными для индикаторов GCaMP5G и GCaMP6.

Как видно из кристаллической структуры индикатора FGCaMP, при связывании ионов Ca^{2+} поверхность M13-подобного пептида расположена вблизи поверхности 1-й, 5-й, 7-й и 8-й α-спиралей кальмодулина (Рис. 13). Мы решили выяснить, как свойства FGCaMP зависят от замен в последовательности M13-подобного пептида. Для этого были созданы две бактериальные библиотеки генов с рандомизированными последовательностями в позициях M13-подобного пептида (3T/4L/5H и 8I/9D/10T), боковые цепи которых ориентированы в

сторону α-спиралей кальмодулина. В результате был найден клон FGCaMP2/S101D/T3L/H5K (FGCaMP4), отличающийся повышенным сродством к ионам Ca^{2+}, с $K_д$ 93 нМ при возбуждении 493 нм, что в 2,9 раз меньше аналогичной $K_д$ FGCaMP (Рис. 14).

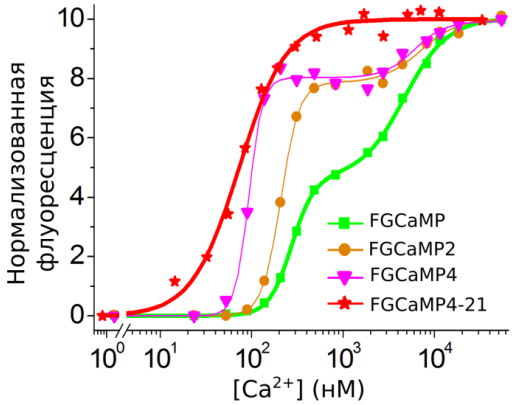

Рисунок 14. Кривые титрования индикатора FGCaMP и его мутантов FGCaMP2, FGCaMP4 и FGCaMP4-21 ионами Ca^{2+} при возбуждении 493 нм.

Для дальнейшего улучшения индикатора FGCaMP было проведено 6 раундов случайного мутагенеза варианта FGCaMP4. При отборе мутантов мы элиминировали компоненту с низким сродством к ионам Ca^{2+}, для чего отбирали белки с минимальным отношением интенсивностей флуоресценции при 10 мМ Ca-ЭГТА ([Ca^{2+}] = 39 мкМ) к 9 мМ Ca-ЭГТА ([Ca^{2+}] = 1,35 мкМ) при возбуждении 493 нм. В результате был получен мутант FGCaMP4-21 (Кд 73 нМ при возбуждении 493 нм) с монофазной кривой связывания ионов Ca^{2+} (Рис. 14), контраст которого был в 2,4 раза выше по сравнению с контрастом исходного индикатора FGCaMP. Анализ аминокислотных последовательностей полученных мутантов показал, что элиминирование низкоафинной компоненты, возможно, произошло в результате замен K75E/S81T, расположенных вблизи ранее мутированных остатков кальмодулина в позициях 78 и 79. Мы также успешно экспрессировали мутант FGCaMP4-21 в культуре нейронов мыши вместе с контрольным индикатором R-GECO1. Ответ $\Delta F/F_0$ для мутанта FGCaMP4-21 составил 62±22% относительно ответа R-GECO1. Таким образом, FGCaMP4-21 в диссоциированной культуре нейронов мыши показывает улучшение величины ответа по сравнению с индикатором FGCaMP.

Таким образом, с помощью анализа кристаллической структуры индикатора FGCaMP нам удалось обнаружить несколько позиций в кальмодулине *A. niger* и M13-подобном пептиде из киназы *A. fumigatus*, замена которых позволяет варьировать контраст и сродство индикатора FGCaMP к ионам Ca^{2+}.

ВЫВОДЫ

1. Впервые предложен подход к разработке генетически кодируемого кальциевого индикатора на основе C-концевого домена тропонина C и одного флуоресцентного белка mNeonGreen. Разработанный индикатор NTnC обладает маленьким размером, повышенной яркостью и, в отличие от кальциевых индикаторов семейства GCaMP, связывает два иона кальция, а не четыре. Продемонстрирована возможность использования индикатора NTnC в

культурах раковых клеток и нейронов, а также в зрительной коре мозга мыши *in vivo*. Получена кристаллическая структура комплекса NTnC с ионами кальция, на основе анализа которой создан вариант индикатора, не связывающий ионы кальция, для использования его в качестве контроля специфичности ответа NTnC.

2. Показано, что замена флуоресцентного белка mNeonGreen в NTnC на EYFP позволяет получить NTnC-подобный кальциевый индикатор iYTnC2 с б*о*льшим динамическим диапазоном и увеличенной скоростью диссоциации ионов кальция. Индикатор iYTnC2 был успешно использован для детекции изменений концентрации ионов кальция в культуре клеток млекопитающих, в культуре нейронов, а также для визуализации активности нейронов в гиппокампе мозга мыши *in vivo*.

3. Впервые был предложен оригинальный подход по использованию кальмодулина и киназы из грибов *Aspergillus niger* и *Aspergillus fumigatus* для разработки генетически кодируемого кальциевого индикатора с улучшенными свойствами. Полученный индикатор FGCaMP обладает рациометрическим фенотипом и, в отличие от GCaMP-подобных индикаторов на основе кальмодулина и киназы из позвоночных животных, мобилен в цитоплазме клеток млекопитающих, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия индикатора FGCaMP с белками клетки. Показана применимость индикатора FGCaMP для визуализации активности нейронов в культуре и в модели рыбок *Danio rerio in vivo*.

4. Получена кристаллическая структура индикатора FGCaMP. На основе анализа кристаллической структуры FGCaMP найдены позиции, замена которых влияет на контраст и сродство индикатора FGCaMP к ионам кальция.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Научные статьи в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

1. **Barykina N. V.**, Subach O. M., Doronin D. A., Sotskov V. P., Roshchina M. A., Kunitsyna T. A., Malyshev A. Y., Smirnov I. V., Azieva A. M., Sokolov I. S., Piatkevich K. D., Burtsev M. S., Varizhuk A. M., Pozmogova G. E., Anokhin K. V., Subach F. V., Enikolopov G. N. A new design for a green calcium indicator with a smaller size and a reduced number of calcium-binding sites // Scientific reports. – 2016. – V. 6. – P. 34447.
2. **Barykina N. V.**, Subach O. M., Piatkevich K. D., Jung E. E., Malyshev A. Y., Smirnov I. V., Bogorodskiy A. O., Borshchevskiy V. I., Varizhuk A. M., Pozmogova G. E., Boyden E. S., Anokhin K. V., Enikolopov G. N., Subach F. V. Green fluorescent genetically encoded calcium indicator based on calmodulin/M13-peptide from fungi // PloS one. – 2017. – V. 12. – No. 8. – P. e0183757.
3. Doronin D. A., **Barykina N. V.**, Subach O. M., Sotskov V. P., Plusnin V. V., Ivleva O. A., Isaakova E. A., Varizhuk A. M., Pozmogova G. E., Malyshev A. Y., Smirnov I. V., Piatkevich K. D., Anokhin K. V., Enikolopov G. N., Subach F. V. Genetically encoded calcium indicator with NTnC-like design and enhanced fluorescence contrast and kinetics // BMC biotechnology. – 2018. – V. 18. – No. 1. – P. 10.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Barykina N.**, Subach O., Malyshev A., Azieva A., Sokolov I., Burtsev M., Subach F., Enikolopov G. Novel Calcium Troponin C-based Indicator for Neuronal Imaging // EMBO Conference «Imaging the Brain». – 2016.

2. **Барыкина Н.В**., Субач О.М., Малышев А.Ю., Доронин Д.А., Сотсков В.П., Рощина М.А., Куницына Т.А., Субач Ф.В. Новый кальциевый индикатор на основе тропонина С для визуализации нейрональной активности // Acta Naturae, Спецвыпуск, Научные труды V Съезда биохимиков России. – 2016. – Т. 2. – С. 107.
3. Чефанова Е.С., **Барыкина Н.В.**, Субач О.М., Ениколопов Г.Н, Субач Ф.В. Разработка кальциевых индикаторов, имеющих в качестве новой сенсорной части кальмодулин из дрожжей // Сборник аннотаций XIV Курчатовской междисциплинарной молодежной научной школы. – 2016. – С. 107.
4. Доронин Д.А., Субач Ф.В., **Барыкина Н.В.**, Субач О.М. Разработка новых генетически кодируемых кальциевых индикаторов, основанных на тропонине С // Сборник аннотаций XIV Курчатовской междисциплинарной молодежной научной школы. – 2016. – С. 75.
5. **Барыкина Н.В.**, Ениколопов Г.Н., Субач О.М., Субач Ф.В., Чефанова Е.С. Разработка красного флуоресцентного кальциевого индикатора, имеющего в качестве новой сенсорной части кальмодулин из грибов *S. pombe* // Сборник аннотаций XV Курчатовской междисциплинарной молодежной научной школы. – 2017. – С. 103.
6. Чефанова Е.С., **Барыкина Н.В.**, Субач О.М., Ениколопов Г.Н, Субач Ф.В. Разработка красного кальциевого индикатора, имеющего в качестве новой сенсорной части кальмодулин из грибов *S. cerevisiae* // Труды 60-й Всероссийской научной конференции МФТИ. – 2017. – С. 32.
7. Чефанова Е.С., Субач Ф.В., **Барыкина Н.В.**, Субач О.М. Новый зеленый кальциевый индикатор с одним участком связывания кальция // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2018». – 2018. – С. 61.
8. **Barykina N.V.**, Subach O.M., Piatkevich K.D., Jung E.E., Malyshev A.Y., Smirnov I.V., Bogorodskiy A.O., Borshchevskiy V.I., Varizhuk A.M., Pozmogova G.E., Boyden E.S., Anokhin K.V., Enikolopov G.N., Subach F.V. Ratiometric Green Fluorescent Genetically Encoded Calcium Indicator Based on Ca^{2+}-binding Domains from Fungi // Abstract book of 11th FENS Forum of Neuroscience. – 2018. – P. 4453.