



## ЭЛЕКТРОПОДВИЖНЫЙ БЕЛОК ПРЕСТИН КАК ЧУВСТВИТЕЛЬНОЕ ЯДРО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИНДИКАТОРА МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА

© 2022 г. Л. А. Кост\*, В. А. Юнусова\*, В. О. Иванова\*\*, Е. С. Никитин\*\*,  
К. А. Лукьянов\*, А. М. Богданов\*.#

\*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,  
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*ФГБУН “Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии” РАН,  
Россия, 117485 Москва, ул. Бутлерова, 5А

Поступила в редакцию 10.08.2021 г.

После доработки 20.08.2021 г.

Принята к публикации 21.08.2021 г.

В настоящей работе мы впервые применили престин – электроподвижный белок слухового анализатора млекопитающих – в качестве потенциал-чувствительного ядра генетически кодируемого индикатора мембранного потенциала. Prestin-5 – один из вариантов химерного белка, полученного нами путем слияния полипептидных цепей престина и флуоресцентного репортера FusionRed, – при электрофизиологическом тестировании продемонстрировал флуоресцентный ответ на изменение мембранного потенциала, характеризующийся субмиллисекундной кинетикой. Таким образом, мы показали работоспособность престина в составе флуоресцентных потенциал-чувствительных конструкций.

*Ключевые слова:* индикатор мембранного потенциала, флуоресцентный биосенсор, нейробиология, флуоресцентные белки, престин

DOI: 10.31857/S0132342322030095

### ВВЕДЕНИЕ

Перспективный подход к мониторингу электрической активности нервных клеток – использование генетически кодируемых индикаторов мембранного потенциала (ГКИМП) [1], которые представляют собой химерные белки с трансмембранным доменом. Индикаторы разной структурной организации объединяет наличие у них двух функциональных активностей: чувствительности к мембранному потенциалу и способности реагировать на его колебания изменением своих оптических свойств. В большинстве ГКИМП эти функциональные активности реализуются структурно различающимися белковыми доменами, потенциал-чувствительным (ПЧД) и репортерным (чаще всего представлен вариантом флуоресцентного белка). Имеющийся репертуар ПЧД сравнительно беден [1], и поиск новых кандидатов на эту роль представляется актуальной научной задачей.

Сокращения: ГКИМП – генетически кодируемые индикаторы мембранного потенциала; ПЧД – потенциал-чувствительный домен; FP – флуоресцентный белок (fluorescent protein); cpFP – циркулярный пермутант флуоресцентного белка (circularly permuted fluorescent protein).

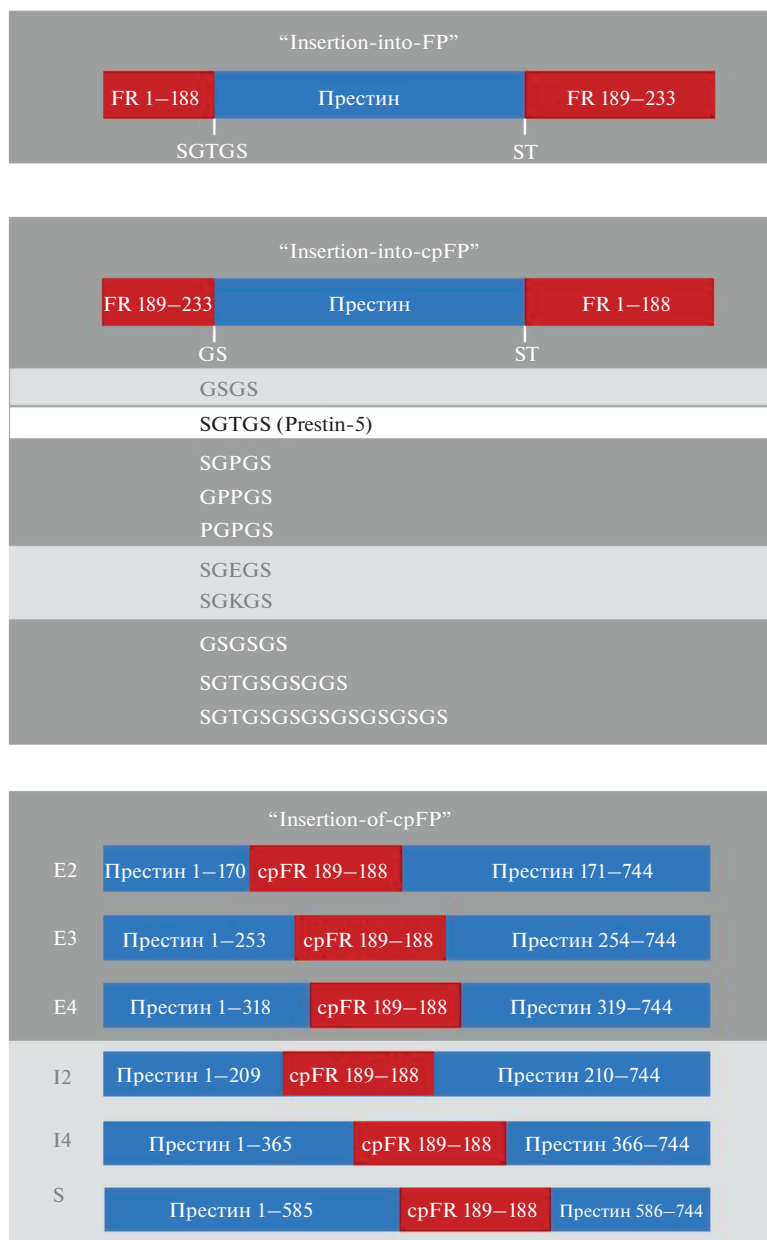
# Автор для связи: (тел.: +7 (903) 746-08-49; эл. почта: noobissat@ya.ru).

Престин – электроподвижный белок латеральной мембраны внешних волосковых клеток млекопитающих, конформационные изменения которого в ответ на изменения электрохимического потенциала происходят в субмиллисекундной временной шкале [2, 3]. Недавно была также выявлена роль престина в работе сердечной мускулатуры [4]. Цель настоящей работы – определить, возможно ли использование престина в роли потенциал-чувствительного домена ГКИМП.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным компьютерного моделирования [5], молекула престина состоит из 14 трансмембранных сегментов и цитоплазматического STAS-домена. Принимая во внимание крупный размер и сложность организации молекулы престина, мы предложили три топологических варианта молекулы индикатора: “insertion-into-FP”, “insertion-into-cpFP”, а также “insertion-of-cpFP” (рис. 1). В качестве репортерного домена был взят красный флуоресцентный белок FusionRed, потенциально пригодный для визуализации индикатора *in vivo*.

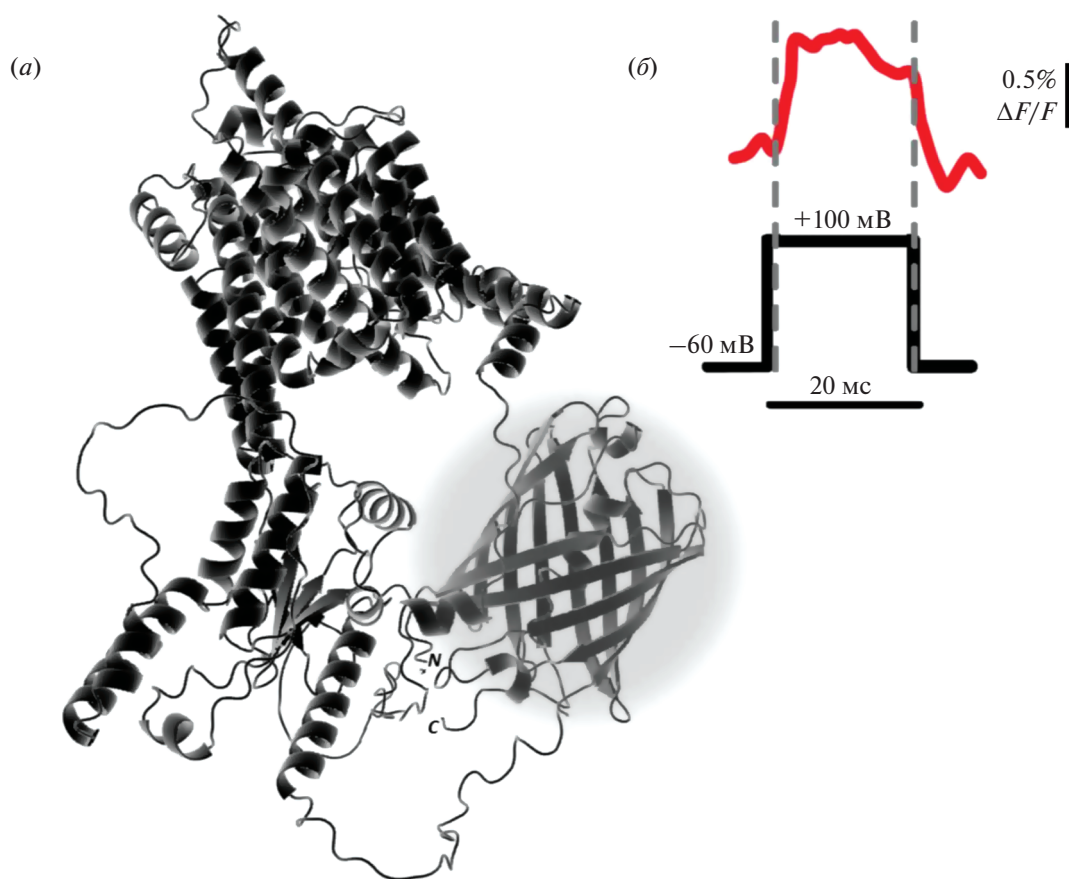
Первый вариант предполагает вставку гена чувствительного ядра (престина) внутрь гена флуоресцентного белка с сохранением “нативно-



**Рис. 1.** Линейные схемы химерных белков на основе престины (синий) и флуоресцентного белка FusionRed (красный). Прямоугольниками обозначены фрагменты полипептидных цепей доменов, входящих в состав индикатора (нумерация аминокислот представлена в соответствии с нативной первичной структурой). Под вертикальными линиями, разделяющими функциональные домены, указаны последовательности аминокислотных линкеров в однобуквенном коде. В конструкциях “insertion-of-cpFP” состав линкеров стандартный: N-концевой GS, C-концевой GT. На белом фоне представлен функциональный вариант ГКИМП, на светло-сером – варианты, прошедшие первичное тестирование, на темно-сером – остальные химерные молекулы. FR – FusionRed, cpFR – циркулярно пермутированный FusionRed.

го” порядка следования аминокислот FusionRed, но с фрагментацией его последовательности. Второй вариант представляет собой вставку гена престины внутрь гена циркулярного пермутанта флуоресцентного белка cpFusionRed 189–188. Выбор положения вставки чувствительного ядра обоснован успешным применением этого способа организации химерного гена в ГКИМП семейства VSDFR 189–188, описанных нами ранее [6, 7].

Третий вариант, топология “insertion-of-cpFP”, основан на inserции кодирующей последовательности cpFusionRed 189–188 в последовательность чувствительного ядра (престины). Для inserции были выбраны три петельных участка, локализованных во внеклеточном пространстве (E2, E3, E4), два петельных участка во внутриклеточном пространстве (I2, I4) и участок, соединяющий трансмембранный домен I4 и STAS-домен (S).



**Рис. 2.** (а) – Модель пространственной структуры ГКИМП Prestin-5, полученная с помощью онлайн-ресурса AlphaFold2. Трансmemбранный домен престина сверху; (б) – усредненное изменение интенсивности флуоресцентного сигнала Prestin-5 (красная кривая) в клетках линии НЕК293Т ( $n = 6$ ) при изменении мембранного потенциала от  $-60$  мВ до  $+100$  мВ (черная кривая).

Всего было сконструировано 18 вариантов индикатора (рис. 1), каждый из которых включен в соответствующий ДНК-вектор для экспрессии в клетках эукариот.

При экспрессии в клетках линии НЕК293Т оценивали корректность мембранной локализации, склонность к агрегации и интенсивность флуоресцентного сигнала индикаторов. Восемь конструкций, продемонстрировавших удовлетворительные результаты этого первичного тестирования (рис. 1), были направлены на функциональное тестирование методом whole-cell voltage clamp, которое представляло собой непрерывное измерение интенсивности флуоресценции при циклически запрограммированных сдвигах мембранного потенциала от удерживающего потенциала ( $-60$  мВ) до  $+100$  мВ.

Один из вариантов в топологической группе “insertion-into-cpFP” – Prestin-5 – при электрофизиологическом тестировании продемонстрировал индикаторные свойства (рис. 2). Его флуоресцентный ответ на изменение мембранного потенциала характеризуется динамическим диапазоном

$1.23\% \Delta F/F$ , временем активации флуоресцентного ответа индикатора  $\tau_{\text{on}} = 0.57$  мс и временем его инактивации  $\tau_{\text{off}} = 1.50$  мс (рис. 2б). Prestin-5 был успешно экспрессирован нами в первичной эмбриональной культуре нейронов мыши, что показывает возможность использования данного ГКИМП в модельной системе, релевантной для задач нейробиологии.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессионные векторы содержали кодирующую последовательность гена престина монгольской песчанки *Meriones unguiculatus* (UniProt ID: Q9JKQ2, любезно предоставлена Peter Dallos) и фрагменты красного флуоресцентного белка FusionRed (Евроген, Россия). Упомянутые последовательности амплифицировали методом ПЦР, используя праймеры, содержащие сайты узнавания эндонуклеазы рестрикции BsaI и участки, гомологичные последовательностям престина и FusionRed, температура отжига  $60^\circ\text{C}$ , элонгация 20–120 с, 18–25 циклов. ПЦР-фрагменты вставля-

ли в вектор pICH47742 (Addgene, США) методом модульного клонирования Golden Gate [8].

Транзientную трансфекцию клеток НЕК293Т (из коллекции АТСС) и первичных эмбриональных нейронов мыши проводили методом липофекции с использованием FuGene HD (Promega, США) согласно протоколу производителя. Флуоресцентный сигнал оценивали спустя 48 ч после трансфекции на флуоресцентном микроскопе BioRevo BZ-9000 (Keyence, Япония) с использованием светофильтров TxRed (возбуждение 562/40 нм, эмиссия 624/40 нм). Электрофизиологическое тестирование методом локальной фиксации потенциала в конфигурации whole cell проводили на клетках линии НЕК293Т. Сигнал усиливали при помощи стандартного внутриклеточного усилителя Axoclamp 2B (Axon Instruments, США) в режиме фиксации потенциала.

Флуоресцентный ответ на изменение мембранного потенциала регистрировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM 5 live (Zeiss, Германия), объектив 63× W.I. NA 1.0 IR DIC (Zeiss, Германия).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы получена химерная конструкция Prestin-5, представляющая собой циркулярно пермутированный красный флуоресцентный белок FusionRed со вставкой полипептидной цепи престины внутри молекулы и демонстрирующая индикаторные свойства. Кинетические характеристики этого варианта индикатора ставят его в один ряд с наиболее “быстрыми” ГКИМП на основе прокариотических опсинов. Таким образом, мы показали, что престин пригоден для использования в качестве потенциал-чувствительного ядра ГКИМП.

## ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-34-90140).

## The Electromotive Protein Prestin as a Sensitive Core of the Fluorescent Voltage Indicator

L. A. Kost\*, V. A. Iunusova\*, V. O. Ivanova\*\*, E. S. Nikitin\*\*, K. A. Lukyanov\*, and A. M. Bogdanov\*.,#

#Phone: +7 (903) 746-08-49; e-mail: noobissat@ya.ru

\*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology RAS, ul. Butlerova 5A, Moscow, 117485 Russia

In this study, we first used prestin, an electromotive protein of the mammalian auditory analyzer, as a voltage-sensitive core of a genetically encoded voltage indicator. Prestin-5, one of the chimeric proteins obtained as a fusion of prestin and the fluorescent reporter FusionRed, demonstrated a fluorescent response to change in membrane potential, characterized by submillisecond kinetics. Thus, we demonstrate the performance of prestin in fluorescent voltage-sensitive constructs.

*Keywords: voltage indicator, fluorescent biosensor, neurobiology, fluorescent proteins, prestin*

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bando Y., Grimm C., Cornejo V.H., Yuste R. // BMC Biol. 2019. V. 17. P. 71. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0682-0>
2. Zheng J., Shen W., He D.Z., Long K.B., Madison L.D., Dallos P. // Nature. 2000. V. 405. P. 149–155. <https://doi.org/10.1038/35012009>
3. Santos-Sacchi J., Tan W. // J. Neurosci. 2018. V. 38. P. 5495–5506. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0425-18.2018>
4. 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. // Cell Rep. 2021. V. 35. P. 109097. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109097>
5. Geertsma E.R., Chang Y.-N., Shaik F.R., Shaik F.R., Neldner Y., Pardon E., Steyaert J., Dutzler R. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2015. V. 22. P. 803–808. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3091>
6. 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. // PLoS One. 2017. V. 12. P. e0184225. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184225>
7. Kost L.A., Ivanova V.O., Balaban P.M., Lukyanov K.A., Nikitin E.S., Bogdanov A.M. // Sensors. 2019. V. 19. P. 2982. <https://doi.org/10.3390/s19132982>
8. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e16765. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>