



## 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\*.<sup>#</sup>

\*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).

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

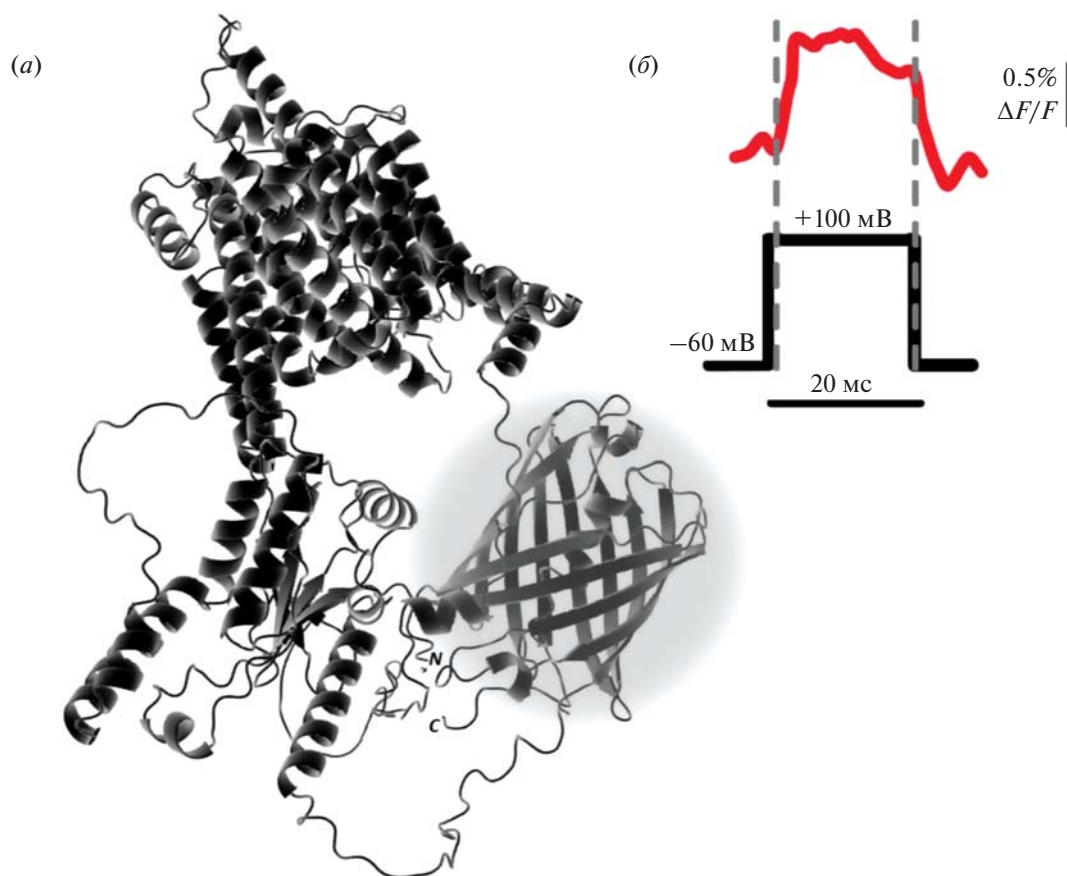
Престин – электроподвижный белок латеральной мембраны внешних волосковых клеток млекопитающих, конформационные изменения которого в ответ на изменения электрохимического потенциала происходят в субмиллисекундной временной шкале [2, 3]. Недавно была также выявлена роль престина в работе сердечной мускулатуры [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. 2.** (а) — Модель пространственной структуры ГКИМП Prestin-5, полученная с помощью онлайн-ресурса AlphaFold2. Трансмембранный домен престилина 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 престилина 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 престилина 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].

Транзиентную 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 перемутированный 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\*<sup>\*,#</sup>

<sup>#</sup>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., Sihn 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>