

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

Николаев Дмитрий Михайлович

**РАЗРАБОТКА ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИ
КОДИРУЕМЫХ СЕНСОРОВ КЛЕТОЧНОГО
МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА НА ОСНОВЕ
АРХЕОРОДОПСИНА-3**

Научная специальность 1.4.4. Физическая химия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д-р хим. наук, доцент
Рязанцев Михаил Николаевич

Санкт-Петербург — 2025

Оглавление

	Стр.
Введение	4
Глава 1. Обзор литературы	15
1.1 Общие сведения о флуоресцентных генетически кодируемых сенсорах клеточного мембранного потенциала	15
1.2 Флуоресцентные сенсоры мембранного потенциала на основе микробных родопсинов	20
1.3 Анализ литературных данных о флуоресценции в микробных родопсинах	30
Глава 2. Методы	38
2.1 Общий подход	38
2.2 Методы компьютерного моделирования	39
2.2.1 Конструирование трехмерных моделей изучаемых микробных родопсинов и их мутантных вариантов. Расчет спектральных характеристик белков	40
2.2.2 Учет подвижности белкового окружения при конструировании трехмерной модели и расчете спектральных свойств белков	44
2.3 Экспериментальные методы	46
Глава 3. Определение структурного фактора, отвечающего за значительное увеличение яркости флуоресцентного сигнала в генетически кодируемых сенсорах мембранного потенциала на основе археородопсина-3 из группы Archers по сравнению с археородопсином-3 дикого типа	49
3.1 Введение	49
3.2 Различия спектральных свойств археородопсина-3 дикого типа и мутантных вариантов археородопсина-3 из группы Archers	49

3.3	Определение структурной характеристики, изменение которой приводит к увеличению флуоресценции в мутантных вариантах археородопсина-3 из группы Archers относительно белка дикого типа	56
Глава 4. Разработка методом направленного дизайна новых флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3 с увеличенной яркостью флуоресцентного сигнала		65
4.1	Структурная характеристика, определяющая чувствительность флуоресценции к изменениям мембранного потенциала в археородопсине-3 и его вариантах с аминокислотными заменами .	65
4.2	Результаты направленного дизайна.	66
Заключение		73
Список литературы		74

Введение

Актуальность темы исследования. Изучение биологических процессов на клеточном уровне требует наличия инструментов и методов для регистрации изменений физических характеристик клеток. Одной из важных характеристик биологических клеток является мембранный потенциал – разность электрических потенциалов между внутренней и внешней сторонами клеточной мембраны. Клетки в здоровом состоянии поддерживают постоянное значение мембранного потенциала, отличное от нуля – потенциал покоя. Изменения мембранного потенциала происходят в большом количестве биологических процессов, включая активность электровозбудимых клеток [1], переходы между фазами клеточного цикла [2], трансформацию клеток в опухолевое состояние [3], гибель клеток и многие другие клеточные процессы [4].

Для регистрации изменений клеточного мембранного потенциала на сегодняшний день все чаще используются генетически кодируемые сенсоры на основе белков, интенсивность флуоресценции которых зависит от величины внешнего электрического поля [5–7]. При помощи методов генетической инженерии такие сенсоры вводятся в изучаемые клетки. Во время эксперимента регистрируется интенсивность флуоресценции клеток, экспрессирующих сенсоры – изменения флуоресценции вызываются изменениями мембранного потенциала клеток. Этот подход активно применяется для визуализации изменений мембранного потенциала в биологических процессах, в основном для изучения активности нейронов и кардиомиоцитов [8–10].

Основные характеристики, которые определяют применимость флуоресцентных сенсоров мембранного потенциала, включают яркость флуоресцентного сигнала, скорость роста и затухания амплитуды сигнала в ответ на изменение потенциала, потенциал-чувствительность флуоресценции, которая оценивается как процентное изменение интенсивности флуоресценции при изменении потенциала на 100 мВ, а также близость полосы спектра поглощения сенсора к окну оптической прозрачности биологических тканей, которое расположено приблизительно в диапазоне длин волн от 650 нм до 900 нм [11]. Перспективным классом генетически кодируемых сенсоров, которые характеризуются высокой скоростью роста и затухания амплитуды сигнала в ответ на изменение потен-

циала, высокой чувствительностью сигнала к изменениям потенциала, отсутствием влияния на электрофизиологические характеристики клетки, высокой фотостабильностью, высоким уровнем экспрессии и локализации в мембране клеток, а также полосами поглощения с максимумами на длинах волн более 580 нм, являются сенсоры на основе микробного родопсина археородопсина-3 [12]. Основным недостатком этих сенсоров является низкая интенсивность флуоресцентного сигнала, и на сегодняшний день продолжаются исследования по поиску новых более ярких вариантов [9; 13–15]. Разработка новых сенсоров затрудняется отсутствием данных о молекулярном механизме, регулирующем интенсивность флуоресценции в микробных родопсинах. По этой причине изучение механизма, определяющего увеличение яркости флуоресценции в этом классе белков, а также создание новых более ярких сенсоров мембранного потенциала на основе микробных родопсинов является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования. На сегодняшний день все флуоресцентные генетически кодируемые сенсоры мембранного потенциала на основе микробных родопсинов являются мутантными вариантами археородопсина-3. Археородопсин-3 – микробный родопсин, для которого был показан высокий уровень экспрессии и локализации в мембране эукариотических клеток, в частности, нейронов. Для белка была зарегистрирована линейная зависимость интенсивности флуоресцентного сигнала от величины мембранного потенциала в диапазоне напряжений от -150 мВ до +150 мВ [16]. При увеличении потенциала на 100 мВ зарегистрированное процентное увеличение интенсивности флуоресценции составило 30% [12]. Зарегистрированное время отклика флуоресценции белка на изменения мембранного потенциала составило около 0.6 мс [16]. Благодаря указанным характеристикам археородопсин-3 был выбран в качестве перспективного белка для создания на его основе молекулярных инструментов для визуализации изменений мембранного потенциала в биологических процессах. Однако у археородопсина-3 дикого типа как сенсора мембранного потенциала было также выявлено три существенных недостатка. 1. Низкая интенсивность флуоресцентного сигнала, зарегистрированное значение квантового выхода потенциал-зависимой флуоресценции белка составило всего 0.01% [17]. 2. Полоса спектра поглощения белка не перекрывается с областью оптической прозрачности биологических тканей – максимум полосы поглощения археородопсина-3 находится на 556 нм [12]. 3. Под действием света

белок переносит протоны через клеточную мембрану, что приводит к заметным изменениям мембранного потенциала [16].

С момента открытия потенциал-зависимости флуоресценции археородопсина-3 исследования нескольких научных групп были направлены на поиск новых вариантов археородопсина-3, обладающих более оптимальными характеристиками для применений в качестве сенсоров мембранного потенциала, в первую очередь, более яркой флуоресценцией [9; 13; 14; 18]. В связи с отсутствием детальной информации о молекулярном механизме, отвечающем за увеличение яркости, метод направленного дизайна не применялся. При разработке новых сенсоров на основе археородопсина-3 использовался только метод направленной эволюции, который не требует данных о пространственной структуре белка и о молекулярных механизмах регулировки свойств белка. В методе направленной эволюции поиск мутантных вариантов белка с улучшенными характеристиками проводится итеративно путем последовательной генерации библиотек мутантных вариантов белка со стохастическим распределением аминокислотных замен и выбора лучших вариантов белка в поколении для генерации следующей библиотеки мутантных вариантов на их основе. В результате был получен набор вариантов археородопсина-3, которые обладают усиленным потенциал-зависимым флуоресцентным сигналом. Зарегистрированные значения максимумов полос спектров поглощения полученных белков находятся в диапазоне 580-633 нм, а зарегистрированные значения квантовых выходов флуоресценции этих белков не превышают 0.8% [19]. По этой причине необходимы дальнейшие исследования по разработке новых мутантных вариантов археородопсина-3, обладающих улучшенными характеристиками, в первую очередь, увеличенной интенсивностью флуоресцентного сигнала.

Целью данной работы является разработка новых флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров клеточного мембранного потенциала на основе археородопсина-3 с увеличенной яркостью флуоресцентного сигнала.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. Разработка надежных компьютерных моделей родопсинов, которые позволяют на основе аминокислотной последовательности получить

пространственную структуру этих белков и рассчитать максимум спектра поглощения.

2. Определение механизма, отвечающего за значительное увеличение яркости флуоресцентного сигнала в генетически кодируемых сенсорах мембранного потенциала на основе археородопсина-3 из группы Archers относительно археородопсина-3 дикого типа.
3. Проведение направленного дизайна новых флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала археородопсина-3 с увеличенной яркостью флуоресценции.

Научная новизна.

1. Новые мутантные варианты археородопсина-3, обладающие увеличенной яркостью потенциал-зависимой флуоресценции по сравнению с известными вариантами из группы Archers. Максимумы полос поглощения новых белков находятся ближе всего к окну оптической прозрачности биологических тканей по сравнению со всеми опубликованными флуоресцентными генетически кодируемыми сенсорами мембранного потенциала на основе археородопсина-3.
2. Впервые было доказано, что в белках из группы Archers введенные аминокислотные замены приводят к стабилизации формы белка с протонированным противоионом D222, что вызывает значительное увеличение флуоресценции Archers по сравнению с археородопсином-3 дикого типа.
3. Разработана и представлена в виде программного кода новая адаптация метода построения квантово-механических / молекулярно-механических моделей белка, в которых аминокислотное окружение описываемого методами квантовой механики кофактора строится с учетом усреднения по существующим в термодинамическом равновесии конфигурациям.

Теоретическая и практическая значимость. Разработанные флуоресцентные генетически кодируемые сенсоры мембранного потенциала на основе археородопсина-3 могут использоваться в качестве инструментов для исследования электрической активности биологических клеток. Полученные данные о молекулярном механизме, определяющем значительное увеличение интенсивности флуоресценции мутантных вариантов археородопсина-3 из группы Archers по сравнению с археородопсином-3 дикого типа, могут использоваться для созда-

ния новых флуоресцентных сенсоров мембранного потенциала на основе микробных родопсинов. Разработанные в рамках работы методы для создания улучшенных компьютерных моделей родопсинов и соответствующий программный код могут использоваться для изучения широкого класса различных белков.

Апробация результатов и публикации. Основные результаты диссертационной работы представлены в 6 статьях, опубликованных в рецензируемых научных изданиях:

1. **Nikolaev, D. M.**, Mironov, V. N., Metelkina, E. M., Shtyrov, A. A., Mereshchenko, A. S., Demidov, N. A., Vyazmin S. Yu., Tennikova T.B., Moskalenko S.E., Bondarev S.A., Zhouravleva G.A., Vasin A.V., Panov M.S., Ryazantsev, M. N. (2024). Rational Design of Far-Red Archaelhodopsin-3-Based Fluorescent Genetically Encoded Voltage Indicators: from Elucidation of the Fluorescence Mechanism in Archers to Novel Red-Shifted Variants. *ACS Physical Chemistry Au*: 347-362. <https://doi.org/10.1021/acspphyschemau.3c00073>. Квартиль журнала – Q1, импакт фактор журнала – 3.7.
2. **Nikolaev, D. M.**, Shtyrov, A. A., Vyazmin, S. Y., Vasin, A. V., Panov, M. S., Ryazantsev, M. N. (2023). Fluorescence of the retinal chromophore in microbial and animal rhodopsins. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24), 17269. <https://doi.org/10.3390/ijms242417269> Квартиль журнала – Q1, импакт фактор журнала – 6.2.
3. **Nikolaev, D. M.**, Mironov, V. N., Shtyrov, A. A., Kvashnin, I. D., Mereshchenko, A. S., Vasin, A. V., Panov M.S. Ryazantsev, M. N. (2023). Fluorescence Imaging of Cell Membrane Potential: From Relative Changes to Absolute Values. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2435. DOI: 10.3390/ijms24032435 Квартиль журнала – Q1, импакт фактор журнала – 6.2.
4. **Nikolaev, D. M.**, Manathunga, M., Orozco-Gonzalez, Y., Shtyrov, A. A., Guerrero Martínez, Y. O., Gozem, S., Ryazantsev M.N., Coutinho K., Canuto S., Olivucci, M., 2021. Free Energy Computation for an Isomerizing Chromophore in a Molecular Cavity via the Average Solvent Electrostatic Configuration Model: Applications in Rhodopsin and Rhodopsin-Mimicking Systems. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 17(9), pp.

- 5885–5895. DOI: 10.1021/acs.jctc.1c00221. Квартиль журнала – Q1, импакт фактор журнала – 6.0.
5. Shtyrov, A. A., **Nikolaev, D. M.**, Mironov, V. N., Vasin, A. V., Panov, M. S., Tveryanovich, Y. S., Ryazantsev, M. N., 2021. Simple Models to Study Spectral Properties of Microbial and Animal Rhodopsins: Evaluation of the Electrostatic Effect of Charged and Polar Residues on the First Absorption Band Maxima. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), p. 3029. DOI: 10.3390/ijms22063029. Квартиль журнала – Q1, импакт фактор журнала – 6.2.
 6. **Nikolaev, D. M.**, Shtyrov, A. A., Mereshchenko, A. S., Panov, M. S., Tveryanovich, Y. S., Ryazantsev, M. N., 2020. An assessment of water placement algorithms in quantum mechanics/molecular mechanics modeling: the case of rhodopsins' first spectral absorption band maxima. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 22 (32), pp. 18114-18123. DOI: 10.1039/D0CP02638G. Квартиль журнала – Q2, импакт фактор журнала – 3.7.

Основные результаты были доложены и обсуждены на 1 международной конференции и 1 всероссийской конференции с международным участием:

- Николаев Д.М., Рязанцев М.Н. (2024) Рациональный дизайн новых флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала клетки на основе археородопсина-3. Ломоносов-2024, 12-26 апреля 2024 года, Москва (стендовый доклад).
- Николаев Д.М., Метелкина Е.М., Панов М.С., Рязанцев М.Н. (2025) Рациональный дизайн флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3. Оптогенетика+ 2025, 3-5 марта 2025 года, Санкт-Петербург (стендовый доклад).

Методология и методы исследования. Для создания новых сенсоров клеточного мембранного потенциала использовался подход, объединяющий методы направленной эволюции и направленного дизайна. Направленный дизайн – подход в белковой инженерии, в котором выбор аминокислотных замен для модификации свойств или функций белка проводится на основании данных о пространственной структуре белка и молекулярных механизмах, определяющих его свойства или функции. Направленная эволюция – подход в белковой инженерии, в котором модификация свойств белка проводится путем имитации

процесса природной эволюции. Генерируется библиотека вариантов белка со стохастическим распределением аминокислотных замен. На основании скрининга полученной библиотеки отбираются те варианты белка, которые характеризуются наибольшим улучшением модифицируемых свойств, они используются в качестве основы для генерации новой библиотеки вариантов белка. Процесс проводится итеративно и прекращается, когда переход к новой библиотеке не приводит к улучшению свойств белка в течение нескольких итераций.

Методы направленного дизайна и направленной эволюции обладают преимуществами и недостатками. Преимуществом метода направленного дизайна является эффективность – небольшое число выбранных на основании анализа структуры и механизмов аминокислотных замен вводится методом сайт-направленного мутагенеза и приводит к искомой модификации свойств белка. Недостатком метода направленного дизайна является сложность его реализации в большинстве случаев. Требуются высокоточные компьютерные модели белка для определения молекулярного механизма, отвечающего за изменение свойств белка. В свою очередь, метод направленной эволюции не требует никакой предварительной информации помимо аминокислотной последовательности белка, однако требует перебора слишком большого количества вариантов. При этом вероятность нахождения наиболее оптимальной комбинации аминокислотных замен для искомого улучшения свойств белка методом направленной эволюции не очень высока.

Комбинация методов направленного дизайна и направленной эволюции белков, объединяющая их сильные стороны, была реализована следующим образом. Набор полученных в качестве результата направленной эволюции белков разделяется на две группы – обладающих и не обладающих улучшенными свойствами. Затем при помощи экспериментальных методов и компьютерного моделирования проводится сравнительный анализ двух групп белков и определяется структурная характеристика, изменение которой приводит к улучшению свойств белков из второй группы. Полученная информация позволяет вводить аминокислотные замены, необходимые для изменения конкретной структурной характеристики и, соответственно, оптимизируемого свойства белка – проводить направленный дизайн. В работе использовались как методы компьютерного моделирования, так и экспериментальные методы, включая стационарную

спектроскопию поглощения, спектроскопию комбинационного рассеяния, флуоресценции, флуоресцентную микроскопию.

Личный вклад автора. Автор принимал участие в планировании исследований, проводил анализ экспериментальных данных, построение компьютерных моделей микробных родопсинов и их анализ, принимал участие в разработке адаптации метода построения квантово-механических / молекулярно-механических моделей белка, в которых аминокислотное окружение описываемого методами квантовой механики кофактора рассчитывается с учетом усреднения по существующим в термодинамическом равновесии конфигурациям, измерении спектров поглощения и флуоресценции белков, квантовых выходов флуоресценции белков, а также подготовке публикаций по результатам исследований. Синтез белков проводился коллегами, измерения спектров комбинационного рассеяния проводились сотрудниками Ресурсного Центра СПбГУ.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, четырех глав и заключения. В Главе 1 приведён обзор литературы по теме диссертации. В Главе 1.1 кратко описаны существующие на сегодняшний день классы генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров клеточного мембранного потенциала. В Главе 1.2 приведён обзор опубликованных к моменту выполнения диссертационного исследования сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3, приведено сравнение их характеристик, а также приведена необходимая информация о пространственной структуре археородопсина-3. В Главе 1.3 приведён анализ литературных данных о флуоресценции в микробных родопсинах, показывающий, что нейтрализация аминокислотного окружения основания Шиффа ретиналя в этих белках приводит к значительному увеличению яркости флуоресценции. В Главе 2 описаны методы, использованные в рамках диссертационной работы. В Главе 2.1 описан подход к дизайну белков, использованный в работе. В Главе 2.2 описаны методы компьютерного моделирования, включая разработанный в рамках работы метод построения квантово-механических / молекулярно-механических моделей белка, в которых аминокислотное окружение описываемого методами квантовой механики кофактора рассчитывается с учетом усреднения по существующим в термодинамическом равновесии конфигурациям. В Главе 2.3 описаны экспериментальные методы. В Главе 3 описана часть диссертационного исследования, целью которой являлось определение молекулярного механизма, отвечающего за значительное усиление

яркости флуоресцентного сигнала в генетически кодируемых сенсорах мембранного потенциала на основе археородопсина-3 из группы Archers по сравнению с археородопсином-3 дикого типа. В Главе 4 описана часть диссертационного исследования, целью которой являлось создание методом направленного дизайна новых флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3 с увеличенной яркостью флуоресцентного сигнала и сдвинутыми в сторону окна оптической прозрачности биологических тканей максимумами полос поглощения. В Заключение перечислены основные результаты диссертационного исследования.

Основные научные результаты:

1. Разработаны усовершенствованные компьютерные модели для получения пространственной структуры и расчета спектральных свойств родопсинов на основе аминокислотной последовательности. В частности, разработана и представлена в виде программного кода новая адаптация метода построения квантово-механических / молекулярно-механических моделей белка, в которых аминокислотное окружение описываемого методами квантовой механики кофактора строится с учетом усреднения по существующим в термодинамическом равновесии конфигурациям (страницы 18116 - 18120 в статье [20], вклад автора – построение моделей родопсинов, анализ результатов; страницы 3031-3043 в статье [21], вклад автора – построение моделей родопсинов, анализ результатов; страницы 5888-5892 в статье [22], вклад автора — разработка метода, написание программного кода, построение моделей родопсинов, анализ результатов).
2. Получено доказательство, что достаточным условием для получения мутантных вариантов микробных родопсинов, обладающих увеличенной яркостью флуоресцентного сигнала, является стабилизация формы белка с отсутствием заряженных аминокислотных остатков вблизи основания Шиффа ретиналя. Доказательство, что в белках из группы Archers введенные аминокислотные замены приводят к стабилизации формы белка с протонированным противоионом D222, что вызывает значительное увеличение флуоресценции Archers по сравнению с белком дикого типа (страницы 17271-17284 в статье [23], вклад автора – анализ литературных данных, построение корреляций; страницы

- 348-355 в статье [19], вклад автора – построение и анализ компьютерных моделей родопсинов, измерение спектральных и фотофизических характеристик белков, анализ экспериментальных результатов).
3. Получены новые мутантные варианты археородопсина-3, обладающие увеличенной яркостью флуоресцентного сигнала по сравнению с известными вариантами флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала из группы Archers. Интенсивность флуоресценции белков зависит от величины клеточного мембранного потенциала. Максимумы полос поглощения новых белков находятся ближе всего к окну оптической прозрачности биологических тканей по сравнению со всеми опубликованными к моменту проведения диссертационного исследования флуоресцентными генетически кодируемыми сенсорами мембранного потенциала на основе археородопсина-3 (страница 2431 в статье [24], страницы 355-357 в статье [19], вклад автора – предложены новые мутантные варианты археородопсина, построение и анализ компьютерных моделей родопсинов, измерение спектральных и фотофизических характеристик белков, анализ экспериментальных результатов).

Положения, выносимые на защиту:

1. Усовершенствованные компьютерные модели для получения пространственной структуры и расчета спектральных свойств родопсинов на основе аминокислотной последовательности.
2. Основной фактор, отвечающий за значительное увеличение яркости флуоресцентного сигнала в микробных родопсинах, состоит в стабилизации формы белка с отсутствием заряженных аминокислотных остатков вблизи основания Шиффа ретиналя. В белках из группы Archers увеличение яркости флуоресцентного сигнала достигается путем стабилизации формы белка с протонированным противоионом D222.
3. Новые мутантные варианты археородопсина-3, обладающие увеличенной яркостью флуоресцентного сигнала по сравнению с известными вариантами флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала из группы Archers. Интенсивность флуоресценции белков зависит от величины клеточного мембранного потенциала. Максимумы полос поглощения новых белков находятся ближе всего к окну

оптической прозрачности биологических тканей по сравнению со всеми опубликованными на момент выполнения работы флуоресцентными генетически кодируемыми сенсорами мембранного потенциала на основе археородопсина-3.

Глава 1. Обзор литературы

1.1 Общие сведения о флуоресцентных генетически кодируемых сенсорах клеточного мембранного потенциала

Изучение биологических процессов на клеточном уровне требует наличия инструментов и методов для регистрации изменений физических характеристик клеток в изучаемом процессе. Одной из важнейших характеристик биологической клетки является мембранный потенциал – разность электрических потенциалов между внутренней и внешней сторонами клеточной мембраны. Клетки в здоровом состоянии поддерживают постоянное значение мембранного потенциала, отличное от нуля – потенциал покоя. Изменения мембранного потенциала происходят в большом количестве биологических процессов, таких как активность электровозбудимых клеток [1], переходы между фазами клеточного цикла [2], трансформация клетки в опухолевое состояние [3] и многих других [4]. Методы регистрации изменений клеточного мембранного потенциала разделяются на два общих класса – электрофизиологические методы и оптические методы. В электрофизиологических методах для регистрации изменений мембранного потенциала используются микроэлектроды, которые подводятся к клеточной мембране. Электрофизиологические методы позволяют регистрировать изменения потенциала с высокой точностью, однако на их применение накладывается несколько ограничений. Во-первых, микроэлектроды повреждают клеточную мембрану, что может приводить к артефактным изменениям потенциала [25]. Во-вторых, электрофизиологические методы позволяют проводить измерения только для ограниченного числа клеток – от одной клетки при использовании метода локальной фиксации потенциала до нескольких сотен клеток при использовании микроэлектродных матриц [26]. Кроме того, возникают технические сложности, связанные с подведением микроэлектродов к нужным клеткам, особенно при проведении исследований *in vivo* [27].

В оптических методах для регистрации сигнала используются сенсоры – органические молекулы, белки или наночастицы, оптические свойства которых изменяются при изменении внешнего электрического поля. Такие сенсоры

вводятся в мембрану клеток, после чего проводится регистрация изменений их оптических свойств в изучаемом процессе. Оптические методы не налагают ограничений на количество клеток, от которых регистрируется сигнал. Разработанные к сегодняшнему дню методы и сенсоры позволяют проводить регистрацию сигнала с различным пространственным и временным разрешением. Временной диапазон процессов, которые могут изучаться при помощи оптических методов – от миллисекунд до нескольких дней [24]. В качестве регистрируемого сигнала в большинстве исследований используется интенсивность флуоресценции. В настоящее время регистрация изменений мембранного потенциала при помощи флуоресцентных сенсоров часто применяется в биологических и биомедицинских исследованиях для изучения активности нейронов головного мозга, работы кардиомиоцитов и других процессов [8–10].

Существует два наиболее широко применяемых класса флуоресцентных сенсоров мембранного потенциала – органические красители и генетически кодируемые сенсоры. Большая часть органических красителей характеризуется высокой интенсивностью флуоресценции и высокой скоростью отклика сигнала на изменение мембранного потенциала, времена отклика некоторых красителей не превышают долей миллисекунды [28–30]. К основным недостаткам органических красителей относят невозможность селективного введения сенсоров в популяции клеток только определенного типа, фототоксичность и низкую фотостабильность. Отсутствие селективности не позволяет регистрировать сигнал только от нужного типа клеток, сенсоры вводятся либо в одну клетку, либо во все клетки изучаемого биологического объекта. Фототоксичность приводит к изменениям физиологических свойств исследуемых клеток при длительном воздействии света, а низкая фотостабильность затрудняет использование органических красителей в длительных экспериментах.

Генетически кодируемые сенсоры мембранного потенциала представляют собой белковые молекулы или конструкции из нескольких белковых молекул. Для таргетного введения этих сенсоров в популяции клеток нужного типа используются методы генетической инженерии. Для большинства генетически кодируемых сенсоров характерна низкая фототоксичность или полное её отсутствие, а также более высокая фотостабильность по сравнению с органическими красителями [11; 31]. Генетически кодируемые сенсоры можно разделить на

два основных класса на основании белкового домена, отвечающего за потенциал-чувствительность.

В сенсорах из первого класса за отклик на изменение мембранного потенциала отвечает потенциал-чувствительный домен из потенциал-зависимой фосфатазы организма *Ciona intestinalis* [5] либо организма *Gallus gallus* [32]. Этот домен состоит из четырех трансмембранных спиралей, четвертая спираль (S4) содержит большое количество заряженных аминокислотных остатков и изменяет пространственное положение при изменении потенциала. В качестве флуоресцентной части используется флуоресцентный белок или пара флуоресцентных белков, которые связываются с потенциал-чувствительным доменом через пептидный линкер. На сегодняшний день было разработано три типа конструкций из этого класса.

- Флуоресцентный белок связывается через пептидный линкер с концом спирали S4. Реорганизация заряженной S4 при деполяризации мембраны приводит к уменьшению яркости флуоресцентного белка [5] (Рисунок 1.1a).
- Циркулярно-пермутированный флуоресцентный белок связывается через пептидный линкер с петлей между спиралями S3 и S4. Реорганизация петли при деполяризации мембраны приводит к уменьшению яркости флуоресцентного белка [33].
- Пара флуоресцентных белков, между которыми возможен резонансный перенос энергии, связывается через пептидный линкер с доменом [34] (Рисунок 1.1б). Реорганизация домена при деполяризации мембраны приводит к изменению относительного расположения двух флуоресцентных белков и, соответственно, изменению величины резонансного переноса энергии между ними. Уменьшение переноса энергии приводит к увеличению регистрируемой флуоресценции донора и уменьшению регистрируемой флуоресценции акцептора. При проведении экспериментов регистрируется соотношение интенсивностей сигналов от донора и акцептора.

В генетически кодируемых сенсорах из второго класса в качестве потенциал-чувствительной части используется микробный родопсин. Для данного класса разработаны два типа сенсоров.

- Родопсин, для которого наблюдается зависимость концентрации формы белка с протонированным хромофором от потенциала, связывается через пептидный линкер с флуоресцентным белком, спектр флуоресценции которого перекрывается со спектром поглощения родопсина с протонированным хромофором [35] (Рисунок 1.1б). Деполяризация мембраны приводит к повышению концентрации родопсина с протонированным хромофором, увеличению резонансного переноса энергии от флуоресцентного белка к родопсину и уменьшению интенсивности регистрируемого флуоресцентного сигнала.
- Родопсин, интенсивность флуоресценции которого зависит от мембранного потенциала [16] (Рисунок 1.1в). Такие родопсины могут применяться в качестве сенсоров без дополнительных белковых доменов.

Сенсоры как первого, так и второго класса, использующие конструкторы с флуоресцентным белком, характеризуются высокой интенсивностью флуоресценции, но относительно низкими скоростями отклика регистрируемого сигнала на изменения электрического потенциала и не очень высокой чувствительностью сигнала к изменениям потенциала [36; 37]. Также следует отметить, что все применяемые в таких сенсорах флуоресцентные белки активируются светом в синем или зеленом спектральном диапазоне, что не является оптимальным при изучении биологических объектов.

С другой стороны, флуоресцентные микробные родопсины обладают рядом преимуществ перед сенсорами на основе флуоресцентных белков:

- высокая скорость отклика на изменения потенциала, времена отклика некоторых сенсоров не превышают одной миллисекунды;
- высокая чувствительность регистрируемого сигнала к изменениям мембранного потенциала;
- высокий уровень экспрессии и локализации в мембране эукариотических клеток, в частности, нейронов;
- возможность активации светом с длиной волны более 600 нм.

Основным недостатком всех известных сенсоров на основе микробных родопсинов является низкая интенсивность флуоресценции [9; 13; 14]. В рамках диссертационного исследования проводится разработка новых сенсоров на основе микробных родопсинов с увеличенной интенсивностью флуоресценции.

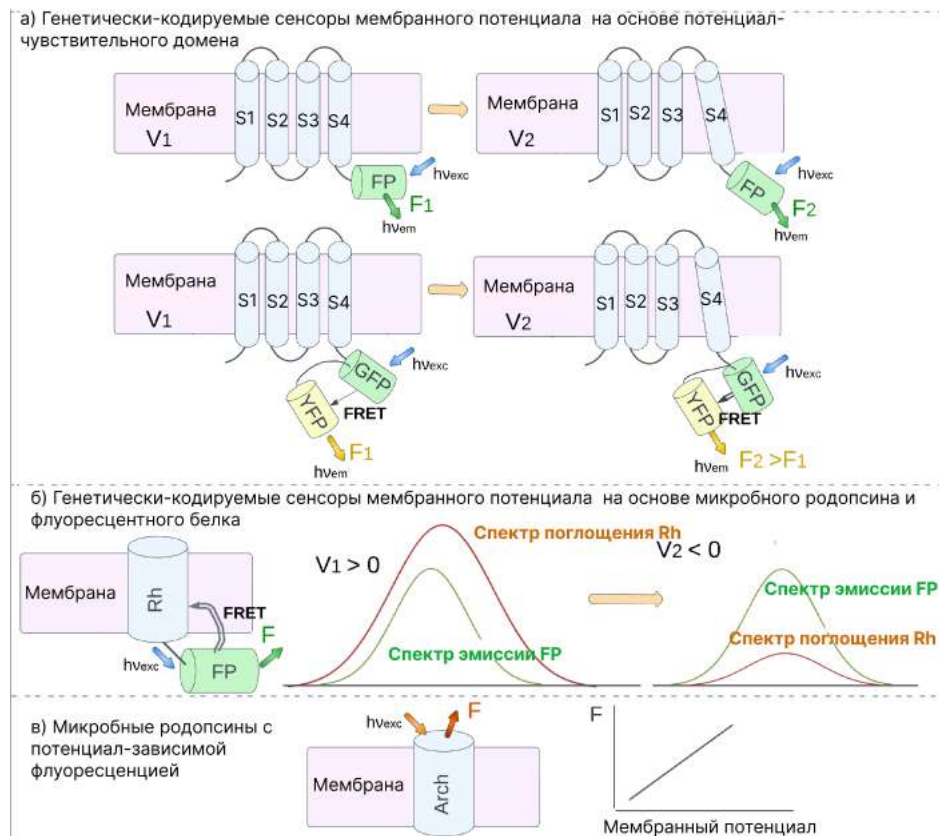


Рисунок 1.1 — Основные типы флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала. а) Конструкция, состоящая из потенциал-чувствительного трансмембранного домена, пространственное положение спирали S4 которого изменяется при изменении мембранного потенциала, и флуоресцентного белка (*сверху*) или пары флуоресцентных белков, между которыми возможен резонансный перенос энергии (*снизу*). б) Конструкция, состоящая из микробного родопсина, для которого концентрация формы с протонированным хромофором регулируется мембранным потенциалом, и флуоресцентного белка. в) Микробный родопсин с потенциал-зависимой флуоресценцией.

1.2 Флуоресцентные сенсоры мембранного потенциала на основе микробных родопсинов

Результаты первых экспериментов, демонстрирующих возможность использования микробных родопсинов в качестве флуоресцентных сенсоров мембранного потенциала, были получены группой профессора Adam E. Cohen в Гарвардском университете для протеородопсина с аминокислотной заменой D97N (сенсор PROPS) [12]. Эксперименты проводились на прокариотических клетках *Escherichia coli*, которые экспрессировали белок. Регистрируемые изменения флуоресцентного сигнала от клеток бактерий в процессе их жизнедеятельности были соотнесены с изменением клеточного мембранного потенциала. Приведение мембранного потенциала клеток бактерий к нулевому значению путём добавления ионофора CCCP вызывало значительное увеличение интенсивности флуоресценции. Аналогичный эффект наблюдался после гибели клеток под воздействием азида натрия или ультрафиолетового излучения.

Вследствие невозможности экспрессии PROPS в эукариотических клетках дальнейшие исследования проводились для другого микробного родопсина — археородопсина-3 и его вариантов с аминокислотными заменами. Группой профессора Adam E. Cohen была продемонстрирована возможность использования дикого типа археородопсина-3 в качестве флуоресцентного сенсора мембранного потенциала [16]. На эукариотических клетках HEK293 при помощи метода локальной фиксации потенциала была выявлена линейная зависимость между интенсивностью флуоресценции, регистрируемой от экспрессирующих белок клеток, и величиной приложенного к клетке напряжения в диапазоне от -150 мВ до +150 мВ [16]. При увеличении потенциала на 100 мВ интенсивность флуоресценции увеличивалась примерно на 30% [16]. Археородопсин-3 демонстрировал высокий уровень экспрессии и локализации в мембране эукариотических клеток, а также достаточно высокую фотостабильность сигнала [16]. Зарегистрированное время отклика флуоресценции археородопсина-3 на изменение мембранного потенциала оказалось меньше 0.5 мс [38]. Описанные характеристики позволили рассматривать археородопсин-3 в качестве перспективного белка для использования в качестве сенсора мембранного потенциала. Однако были также выявлены три существенных недостатка этого белка как

сенсора. Во-первых, белок обладает низкой интенсивностью флуоресценции. За-регистрированное значение квантового выхода флуоресценции белка составило всего 0.01% [17]. Во-вторых, под действием света археородопсин-3 переносит протоны через клеточную мембрану, что вызывает изменение мембранного потенциала клетки [16]. Основной функцией белка является перенос протонов из цитоплазмы во внеклеточную среду под действием света, и эта функция выполняется наряду с флуоресценцией. В-третьих, спектр активации белка не оптимален для изучения биологических объектов. Полоса поглощения археородопсина-3 не перекрывается с окном оптической прозрачности биологических тканей, расположенном в диапазоне $\sim 650\text{--}900$ нм. Длина волны максимума стационарного спектра поглощения белка составляет 556 нм [16].

В дальнейшем проводились исследования, направленные на создание вариантов археородопсина-3 с аминокислотными заменами, которые характеризуются более оптимальными для применения в качестве флуоресцентного сенсора мембранного потенциала свойствами. Для описания результатов этих исследований необходимо предварительно привести краткое описание пространственной структуры археородопсина-3, его функций, а также перечислить ключевые аминокислоты, участвующие в работе белка и оказывающие значительное влияние на его свойства.

Археородопсин-3 (Arch) является представителем семейства микробных родопсинов. Микробные родопсины представляют собой семейство фотоактивируемых мембранных белков, которые присутствуют во всех царствах живой природы, включая вирусы [39—43]. Эти белки выполняют различные функции, работая в качестве фоточувствительных сенсоров, ионных насосов и ионных каналов. Фоточувствительной частью микробных родопсинов является кофактор ретиналь, который связан с консервативным остатком лизина на седьмой спирали белка через основание Шиффа. В основной, наиболее термодинамически стабильной конформации белка основание Шиффа протонировано. Поглощение фотона переводит хромофор в электронно-возбужденное состояние (переход $S_0 \rightarrow S_1$). Последующий возврат хромофора в основное состояние может происходить либо по безызлучательным путям, либо с испусканием фотона. Безызлучательный переход происходит через коническое пересечение, где происходит разветвление фотореакции (Рисунок 1.2). Первый путь приводит к возвращению хромофора в исходное состояние, а второй — к его фотоизомеризации,

которая запускает ряд процессов, необходимых родопсину для выполнения биологической функции. Аминокислотное окружение хромофора способствует фотоизомеризации, поскольку этот процесс напрямую связан с выполнением белком его природных функций, и значения квантовых выходов фотоизомеризации микробных родопсинов очень высокие. К примеру, для бактериородопсина значение квантового выхода фотоизомеризации составляет 0.64% [44; 45]. В свою очередь, флуоресценция является побочным процессом для родопсинов, и квантовые выходы флуоресценции микробных родопсинов очень малы, составляя десятые и сотые доли процента. Единственным исключением является недавно открытый белок неородопсин (Neorhodopsin) из организма *Rhizoclostridium globosum*, который представляет собой исключение из этого правила [46] и обладает квантовым выходом флуоресценции 20%.

Функционирование микробных родопсинов будет рассмотрено на примере гомолога археородопсина-3 – бактериородопсина из археи *Halobacterium salinarum*, который является хорошо изученным представителем этого семейства белков. Основная функция бактериородопсина заключается в переносе протона через клеточную мембрану [47]. После поглощения фотона происходит фотоизомеризация хромофора из полностью-*транс* в 13-*цис* форму, что запускает серию конформационных изменений в белке. Эти изменения проходят через несколько метастабильных состояний и завершаются возвращением белка в исходное состояние. Весь циклический процесс, запускаемый поглощением фотона, называется фотоциклом. Во время фотоцикла бактериородопсина протон перемещается из цитоплазмы во внеклеточную среду.

Пространственная структура бактериородопсина вблизи хромофора в основном, наиболее термодинамически стабильном состоянии, приведена на Рисунке 1.3. В этом состоянии основание Шиффа протонировано. В непосредственной близости к основанию Шиффа расположен противоионный комплекс, который состоит из остатков двух аспарагиновых кислот D85 и D212 [39; 48]. Данный комплекс находится в непротонированном состоянии, то есть имеет отрицательный заряд. Протон, который в процессе фотоцикла высвобождается во внеклеточную среду, расположен на остатке глутаминовой кислоты E204, которая связана водородной связью с E194. E204 и E194 образуют группу освобождения протона, которая находится на периферии белка со стороны внеклеточной среды (Рисунок 1.3). После фотоизомеризации и начальной реорганизации

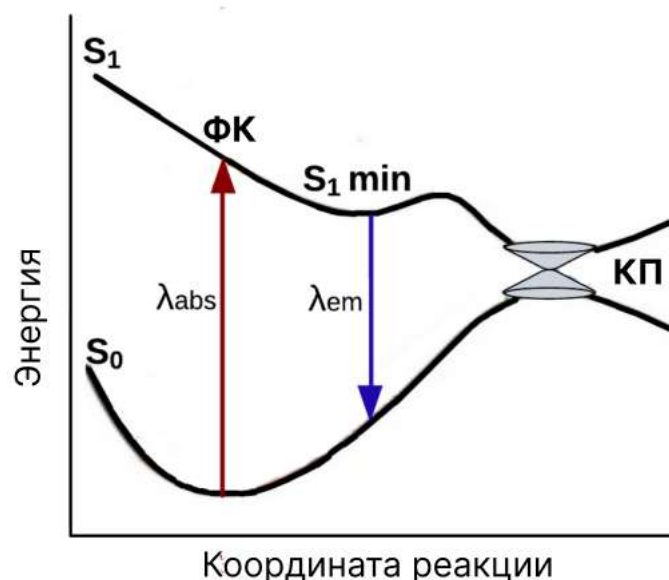


Рисунок 1.2 — Профили поверхностей потенциальной энергии основного состояния (S_0) и электронно-возбужденного состояния (S_1) хромофора микробных родопсинов, описывающие реакцию фотоизомеризации.

Поглощение фотона переводит хромофор в электронно-возбужденное состояние (переход $S_0 \rightarrow S_1$). Из области Франка–Кондона (ФК) происходит релаксация хромофора до минимума на поверхности потенциальной энергии состояния S_1 ($S_1 \text{ min}$). Из минимума происходит либо переход в основное состояние S_0 с испусканием фотона, либо дальнейший переход к коническому пересечению (КП). В коническом пересечении происходит безызлучательный переход на поверхность потенциальной энергии состояния S_0 , путь реакции разветвляется, приводя либо к успешной изомеризации, либо обратно к исходной форме хромофора.

структуры белка возникает метастабильное состояние, известное как L-интермедиат, в котором хромофор находится в 13-*цис*-форме (Рисунок 1.4) [47]. Согласно имеющимся данным, состояния протонирования титруемых аминокислотных остатков в L-интермедиате идентичны состояниям протонирования в основной форме фотоцикла белка.

На следующем этапе происходит переход белка в M-интермедиат, который сопровождается отрывом протона от хромофора, протон переходит на противоионный комплекс. Одновременно с этим протон остатка глутаминовой кислоты E204 из группы освобождения протона перемещается во внеклеточную среду. На следующем этапе, при переходе из M в N-интермедиат, хромофор захватывает протон, который согласно имеющимся экспериментальным дан-

ным переходит с остатка аспарагиновой кислоты D96. Затем при переходе в О-интермедиат D96 захватывает протон, приходящий из цитоплазмы, а также происходит термическая реакция изомеризации хромофора из 13-*цис* формы в полностью-*транс* форму. Во время термического перехода из О-интермедиата в основную форму фотоцикла белка, который длится несколько миллисекунд, происходит перенос протона от противоионного комплекса, состоящего из D85 и D212, к E204 из группы освобождения протона [48]. Этот переход, согласно имеющимся на сегодняшний день данным, осуществляется по цепочке молекул воды, связывающих в О-интермедиате D212 и E204 [49]. Таким образом, в процессе переноса протона происходит протонирование и депротонирование нескольких ключевых аминокислотных остатков белка и хромофора, а также перенос протона по цепочкам молекул воды.

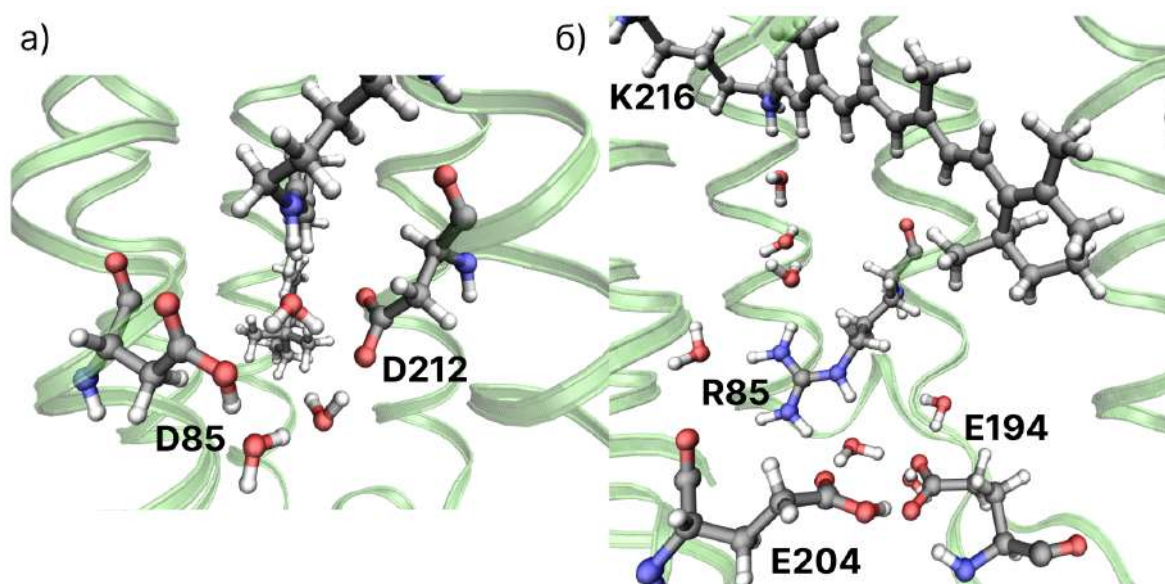


Рисунок 1.3 — Пространственная структура бактериородопсина в основном, наиболее термодинамически стабильном состоянии белка. а) Область белка вблизи основания Шиффа и противоионов D85 и D212. б) Область белка вблизи группы освобождения протона E204-E194.

В первых исследованиях выбор аминокислотных замен для улучшения свойств археородопсина-3 как флуоресцентного сенсора мембранного потенциала был основан на информации о схожести фотоцикла этого белка с фотоциклом бактериородопсина [50]. Как было указано ранее, дикий тип археородопсина-3 обладает тремя существенными недостатками, ограничивающими его применимость в качестве сенсора, одним из которых является генерация тока протонов под действием света. Для отключения этой функции был получен

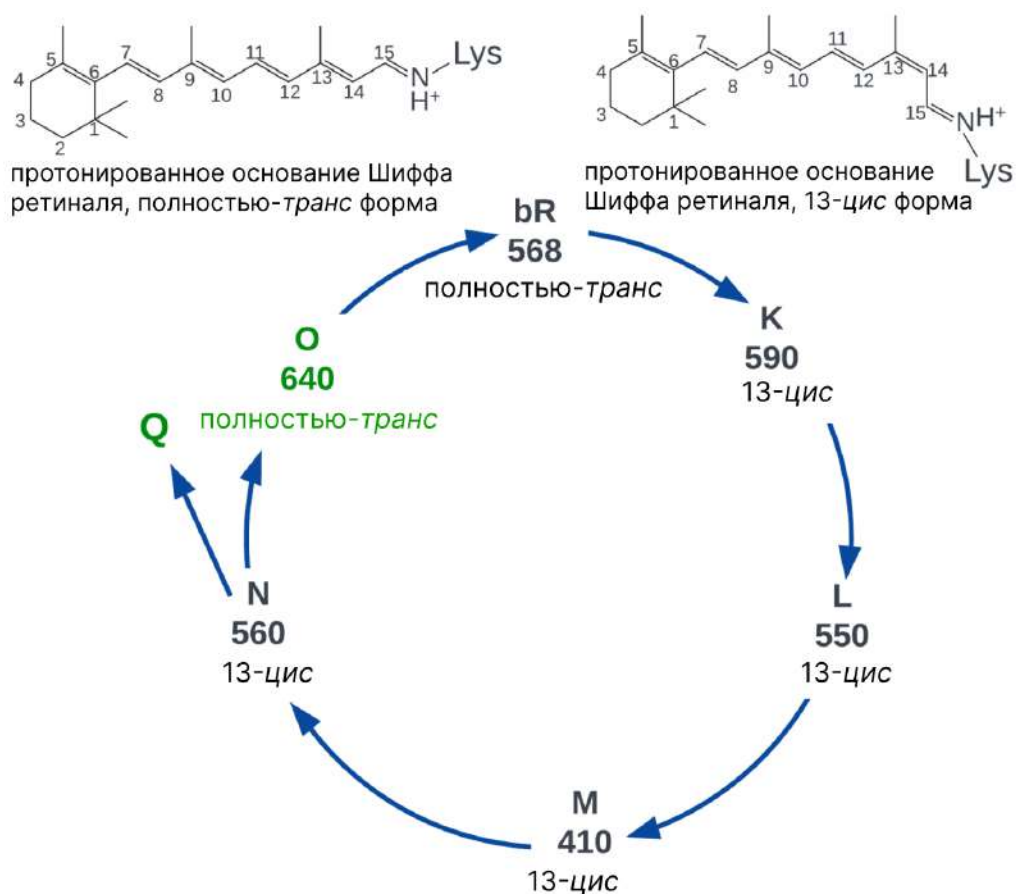


Рисунок 1.4 — Схема фотоцикла бактериородопсина.

вариант белка с аминокислотной заменой D95N (D85N в нумерации бактериородопсина), то есть один из противоионов был заменен на полярную аминокислоту, аспарагин [16]. Полученный белок Arch D95N не генерировал ток протонов при освещении, а максимум полосы стационарного спектра поглощения белка был сдвинут на 585 нм [16]. Другим преимуществом Arch D95N относительно белка дикого типа являлась увеличенная чувствительность интенсивности флуоресценции к изменениям потенциала. При увеличении потенциала на 100 мВ интенсивность флуоресценции белка увеличивалась на 60%, для белка дикого типа это значение составляло 30% [16]. Однако внесение аминокислотной замены привело к значительному увеличению времени отклика флуоресценции на изменение потенциала. Если для белка дикого типа время отклика не превышало 0.5 мс, то для Arch D95N было получено значение 42 мс [16]. В дальнейшем было показано, что для этого белка кинетика отклика флуоресценции на изменение потенциала не описывается одноэкспоненциальной зависимостью и состоит из двух компонент – быстрой компоненты (20% отклика) с временной константой менее 1 мс и медленной компоненты (80% отклика) с временной кон-

стантой 36 мс [38]. Зарегистрированное значение квантового выхода флуоресценции белка составило 0.04%, измерение проводилось при возбуждении белка светом с длиной волны 640 нм [16]. В дальнейшем были предприняты попытки создания новых вариантов сенсоров путем замены на полярную аминокислоту не только противоиона D95, но и остатка аспарагиновой кислоты D106, с которой переносится протон на основание Шиффа во время фотоцикла белка при переходе из М-интермедиата в N интермедиат [6]. Предложенные варианты Arch D95N/D106N и Arch D95Q/D106N не проявили улучшений характеристик сигнала, а времена отклика находились в диапазоне $\sim 5 - 15$ мс.

Для дальнейшего продвижения проводились исследования механизма возникновения потенциал-зависимости флуоресценции археородопсина-3 дикого типа. На основании серии экспериментов было выдвинуто предположение, что детектируемая флуоресценция испускается интермедиатом фотоцикла белка с максимумом поглощения на 570 нм – Q-интермедиатом (Рисунок 1.4) [38]. Для активации флуоресценции необходимо поглощение трёх фотонов – первый фотон запускает фотоцикл, второй фотон переводит N-интермедиат в Q-интермедиат, наконец, третий фотон переводит Q-интермедиат в электронно-возбужденное состояние, релаксация из которого происходит с испусканием фотона. Возникновение флуоресценции в интермедиате фотоцикла согласуется с нелинейностью роста интенсивности флуоресценции с увеличением интенсивности облучения. Следует отметить, что предложенная схема объясняет различия двух значений квантового выхода флуоресценции, полученных для археородопсина-3 [16; 17]. При возбуждении белка на максимуме полосы поглощения было получено значение 0.01% [17] – оно характеризует основную форму фотоцикла. При интенсивном облучении на длине волны 633 нм было получено значение 0.09% [16] – оно характеризует интермедиат. Также было выдвинуто предположение о механизме потенциал-зависимости флуоресценции. Согласно предложенной схеме, интенсивность флуоресценции определяется концентрацией Q-интермедиата, которая прямо пропорциональна концентрации N-интермедиата. В свою очередь N-интермедиат находится в зависящем от величины внешнего электрического поля равновесии с М-интермедиатом. В N- и М-интермедиатах хромофор находится в 13-*цис* форме, но различаются его состояния протонирования [38]. Мембранный потенциал может определять равновесие между формами с протонированным (N) и непротонированным (М) основанием Шиффа.

Предложенная схема потенциал-зависимости флуоресценции не позволила провести рациональный дизайн мутантных вариантов археородопсина-3, которые бы обладали увеличенной интенсивностью флуоресценции, и дальнейшая разработка новых сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3 велась методом направленной эволюции. Группой профессора Adam E. Cohen методом направленной эволюции были получены два сенсора, QuasAr1 и QuasAr2, каждый из которых представляет собой археородопсин-3 с пятью аминокислотными заменами [13]. Для обоих белков наблюдался линейный рост интенсивности флуоресценции с увеличением интенсивности освещения. На основании этих данных был сделан вывод, что флуоресценция этих белков возникает при фотовозбуждении не интермедиата фотоцикла, а основной формы белка в фотоцикле. У обоих белков совпадали максимумы полос спектров возбуждения флуоресценции и максимумы полос спектров флуоресценции – 590 нм и 715 нм соответственно [13]. Наблюдался линейный рост интенсивности флуоресценции белков с увеличением электрического потенциала в диапазоне от -100 мВ до +50 мВ. QuasAr2 обладал большей чувствительностью флуоресценции к изменениям потенциала – при увеличении потенциала на 100 мВ интенсивность флуоресценции увеличивалась на 90%, в то время как для QuasAr1 это значение составляло всего 32% [13]. При комнатной температуре время отклика QuasAr1 на изменение напряжения составило всего 0.053 мс, а для QuasAr2 кинетика отклика описывалась двухэкспоненциальной зависимостью с временными константами 1.2 мс (вклад 68%) и 11.8 мс (вклад 32%) [13]. Также QuasAr1 и QuasAr2 проявили отсутствие тока протонов под действием света, отсутствие фототоксичности и высокую фотостабильность сигнала – времена фотовыцветания при освещении светом мощностью 300 Вт/см² на длине волны 640 нм составили 440 сек и 1020 сек соответственно [13].

Группой профессора Frances H. Arnold также проводилась направленная эволюция археородопсина-3 [14]. В качестве начального белка для проведения направленной эволюции был выбран вариант археородопсина-3 с аминокислотными заменами Arch D95E/T99C. Эти аминокислотные замены были получены группой ранее при проведении направленной эволюции *Gloebacter violaceus* родопсина, целью которой был сдвиг полосы поглощения белка в длинноволновую область [51]. Для *Gloebacter Violaceus* родопсина указанные аминокислотные замены (в нумерации археородопсина-3) привели к сдвигу полосы погло-

щения на +80 нм и возникновению флуоресценции, квантовый выход которой был сопоставим по величине с QuasAr1. В результате направленной эволюции археородопсина-3 было предложено несколько флуоресцентных мутантных вариантов (Archers), для которых была обнаружена высокая чувствительность флуоресценции к pH [14]. Для двух белков, Arch D95E/T99C (Archer1) и Arch D95E/T99C/A225M (Archer2), были проведены дополнительные эксперименты на нейронах нематоды *C. elegans* [52]. Показано, что оба белка характеризуются высокой потенциал-чувствительностью флуоресценции – при увеличении потенциала на 100 мВ интенсивность флуоресценции увеличивалась на 85% и 60% для Archer1 и Archer2 соответственно.

В другой работе, выполненной группой профессора Edward S. Boyden из Массачусетского Технологического Института, была проведена направленная эволюция археородопсина-3 по нескольким параметрам – яркость флуоресценции, эффективность локализации в мембране, потенциал-чувствительность флуоресценции и время отклика [18]. На первом этапе была сгенерирована библиотека вариантов QuasAr2 со стохастическим распределением дополнительных аминокислотных замен. Во время скрининга проводилась регистрация сигнала от клеток линии НЕК293, которые экспрессировали белки. Были выбраны клетки, для которых регистрировалась увеличенная яркость и высокий уровень локализации белка в мембране, что проверялось автоматически при помощи алгоритмов компьютерного зрения. Также сенсоры проверялись на потенциал-чувствительность, которая оценивалась как процентное увеличение интенсивности флуоресценции при приложении к кювете с клетками электрического потенциала. В результате нескольких поколений направленной эволюции были выбраны варианты, названные Archon1 и Archon2, для которых наблюдалась высокая яркость сигнала и быстрая кинетика отклика. Увеличение потенциала на 100 мВ вызывало рост интенсивности флуоресценции на 43% и 19% для Archon1 и Archon2 соответственно [18]. Для белков был обнаружен линейный рост интенсивности флуоресценции с увеличением интенсивности освещения, что говорит о вовлечении только одного, наиболее стабильного состояния белка, а не интермедиатов фотоцикла. Archon1 проявлял высокую фотостабильность – после 900 секунд непрерывного освещения мощностью 800 мВт/мм² сигнал уменьшался всего на 5% [18].

Следующий шаг в улучшении свойств был проведен для QuasAr2 – необходимо было улучшить степень локализации этого белка в мембране эукариотических клеток. Путем стохастического перебора аминокислотных замен был найден вариант, названный QuasAr3, обладающий высоким уровнем экспрессии и высоким уровнем локализации в мембране нейронов, а также высокой скоростью отклика флуоресценции на изменения потенциала [53]. Единственная аминокислотная замена, которая отличает QuasAr3 от QuasAr2 – K171R, которая расположена на сайте взаимодействия белка с убиквитином на внутриклеточной петле. Внесение в QuasAr3 дополнительной аминокислотной замены V49A (раQuasAr3) привело к возможности увеличивать интенсивность флуоресценции в три раза, если к освещению светом с длиной волны 640 нм добавлять освещение синим светом с длиной волны 488 нм [53]. Механизм, вызывающий такой эффект на сегодняшний день неизвестен.

Для усиления эффекта увеличения интенсивности флуоресценции при одновременном освещении красным и синим светом был проведен следующий этап направленной эволюции для раQuasAr3. Был получен вариант NovArch, который представляет собой раQuasAr3 с дополнительными аминокислотными заменами V209I и I213T [15]. При освещении светом с длиной волны 640 нм для раQuasAr3 и NovArch наблюдалась одинаковая интенсивность флуоресценции, однако добавление синего света увеличивало флуоресценцию NovArch в семь раз. NovArch также обладал сдвинутым относительно QuasAr1/2 и Archon1/2 максимумом полосы возбуждения флуоресценции, который находился на 620 нм и его положение не менялось при добавлении синего света [15].

Наконец, методом направленной эволюции было проведено дополнительное улучшение Archon1 [9]. Улучшение проводилось по двум параметрам – яркости флуоресценции и процентному увеличению интенсивности флуоресценции при возникновении потенциала действия. Скрининг проводился на клетках линии НЕК293Т. Потенциал действия генерировался встроенными в эти клетки потенциал-зависимыми натриевыми и калиевыми каналами. Также в клетки встраивался канальный родопсин для активации потенциала действия путем освещения клеток синим светом – под действием синего света белок переносил ионы, что приводило к необходимому для активации потенциал-зависимых натриевых и калиевых каналов изменению потенциала и, соответственно, генерации потенциала действия. В результате были найдены два варианта, названные

QuasAr6a и QuasAr6b, которые были в 1.7 и 2 раза ярче, чем Archon1. Белок QuasAr6a также обладал высокой потенциал-чувствительностью сигнала – при изменении потенциала на 100 мВ флуоресценция увеличивалась на 70%. Для белка была зарегистрирована высокая скорость отклика флуоресценции на изменение потенциала. Временная константа активации составила $\tau(\text{on}) = 1.8 \pm 0.5$ мс, а временная константа деактивации составила $\tau(\text{off}) = 1.3 \pm 0.5$ мс [9]. Хотя QuasAr6b обладал большей яркостью, чем QuasAr6a, его сигнал был менее чувствителен к изменениям потенциала – при изменении потенциала на 100 мВ флуоресценция увеличивалась всего на 24%. Для обоих белков была продемонстрирована линейная зависимость интенсивности флуоресценции от потенциала в диапазоне напряжений от -70 мВ до +30 мВ, а также отсутствие тока протонов при освещении красным или синим светом [9].

На Рисунке 1.5 показана общая схема эволюции сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3, а в Таблице 1 приведено сравнение их характеристик. Следует отметить, что все сенсоры были получены методом направленной эволюции. Несмотря на наличие исследований по изучению механизмов потенциал-зависимости флуоресценции [54], они не позволили предложить новые варианты с улучшенными характеристиками. Также следует отметить, что, несмотря на значительное улучшение оптических характеристик белков относительно археородопсина-3 дикого типа, имеющиеся варианты все равно обладают слишком слабой флуоресценцией, что затрудняет их использование *in vivo*. В рамках работы была поставлена задача определить механизм, отвечающий за увеличение флуоресценции, и на основании полученных данных провести направленный дизайн новых сенсоров на основе археородопсина-3. В качестве стартовой точки был проведен анализ литературных данных о флуоресценции в микробных родопсинах, который приведен ниже.

1.3 Анализ литературных данных о флуоресценции в микробных родопсинах

На Рисунке 1.6а показан график зависимости логарифмов квантовых выходов флуоресценции ($\log \Phi$) от длин волн максимумов полос поглощения мик-

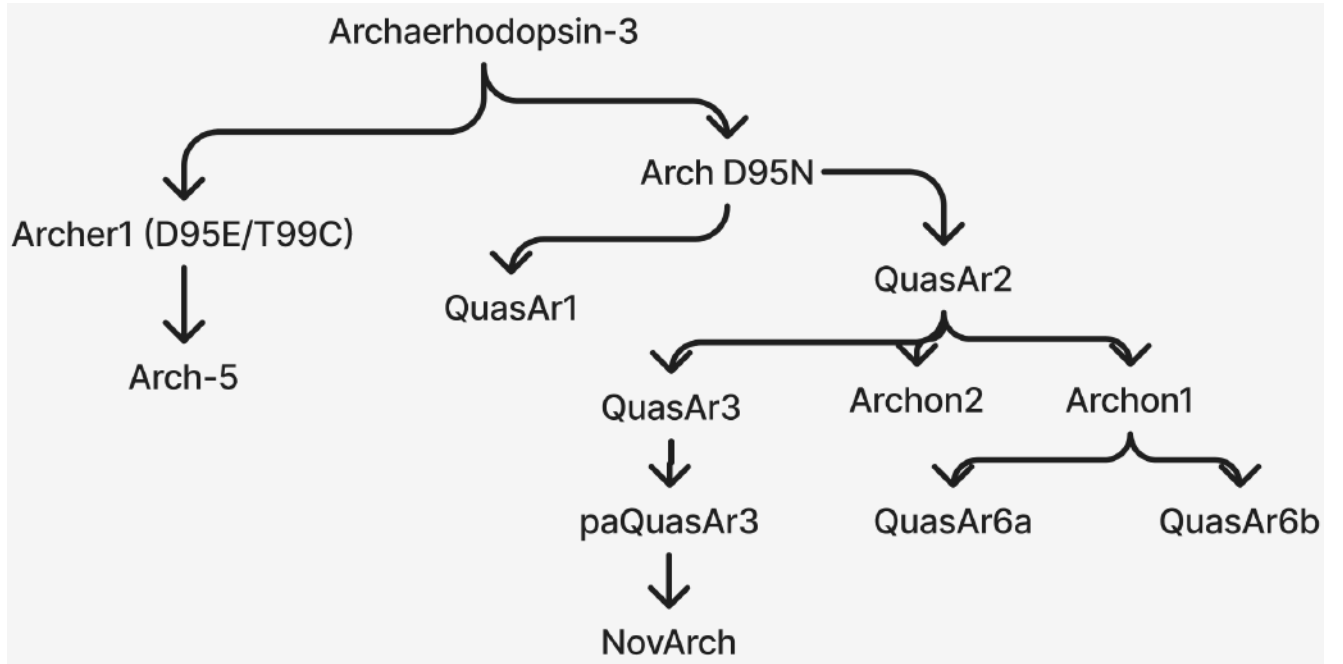


Рисунок 1.5 — Полученные на сегодняшний день сенсоры мембранного потенциала на основе археородопсина-3.

Таблица 1 — Характеристики известных на сегодняшний день сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3.

λ_{max} - максимум полосы поглощения, λ_{em} - максимум полосы флуоресценции, Φ - квантовый выход флуоресценции, $\Delta F/F$, 100 мВ – процентное изменение интенсивности флуоресценции при изменении напряжения на 100 мВ.

Белок	λ_{max}	λ_{em}	$\Phi, \%$	$\Delta F/F$, 100 мВ, %
Arch	558[16]	687[16]	0.01[16]	30[16]
QuasAr1	585[13]	715[13]	0.8[13]	32[13]
QuasAr2	587[13]	715[13]	0.4[13]	90[13]
Archon1	585[18]	735[18]	0.5[18]	80[18]
Archon2	586[18]	735[18]	-	19[18]
NovArch	-	725[15]	-	41[15]
Archer1	626[14]	729[14]	0.33[14]	85[14]
Arch-5	622[14]	745[14]	0.87[14]	-

робных родопсинов [23]. На рисунке использована следующая цветовая схема. Данные для микробных родопсинов дикого типа, измеренные при $pH \approx 7$, показаны синими точками. Зеленым цветом показаны данные для микробных родопсинов дикого типа, для которых измерения проводились при значениях pH , отличных от 7. Также зелеными точками обозначены данные для микробных родопсинов с аминокислотными заменами, за исключением ярких вариантов микробных родопсинов, полученных методом направленной эволюции, которые выделены отдельно, данные для них обозначены коричневым цветом. Наконец, светло-синяя точка на рисунке представляет О-интермедиат фотоцикла бактериородопсина (Рисунок 1.4).

Квантовые выходы флуоресценции микробных родопсинов варьируются в широком диапазоне. На Рисунке 1.6а хорошо видна тенденция увеличения квантового выхода флуоресценции с увеличением длины волны максимума полосы поглощения. Это позволяет выдвинуть предположение, что квантовый выход флуоресценции и длина волны максимума полосы поглощения регулируются одними и теми же факторами. Значения Φ для большинства микробных родопсинов дикого типа при физиологическом значении pH имеют одинаковый порядок величины – сотые доли процента. Квантовый выход флуоресценции существенно увеличивается для кислых форм бактериородопсина (bR blue, $\Phi = 0.45\%$) и сенсорного родопсина (SRI pH6, $\Phi = 0.13\%$), достигая следующего порядка величины. Такое же увеличение было обнаружено для О и Q интермедиатов фотоцикла бактериородопсина с квантовыми выходами $\approx 0.1\%$ и 0.7% соответственно. Поскольку λ_{max} не измерялся для Q интермедиата, соответствующая точка не показана на Рисунке 1.6а. Квантовые выходы флуоресценции для трех ярких вариантов микробных родопсинов, полученных методом направленной эволюции (Archer1, QuasAr1 и GR D121A), находятся в области десятых долей процента.

Аналогичную картину можно наблюдать и для времен жизни флуоресценции микробных родопсинов. На Рисунке 1.6б показана зависимость логарифмов времен жизни флуоресценции $\log(\tau_F)$ от максимумов полос поглощения. Точки, соответствующие полученным методом направленной эволюции мутантным вариантам археродопсина-3 (QuasAr1 и Archon2), О-интермедиату фотоцикла бактериородопсина, вариантам бактериородопсина с замещенным противоионом (bR D85S, bR D85N), а также значениям, полученным при более низком

pH (SRI pH=6, bR R82Q pH=4) расположены на графике над точками, которые соответствуют родопсинам дикого типа, для которых измерения проводились при нейтральном pH. Яркие мутантные варианты археородопсина-3 QuasAr1 и Archon2 с наибольшими значениями τ_F , зарегистрированными на сегодняшний день, расположены в верхней части рисунка.

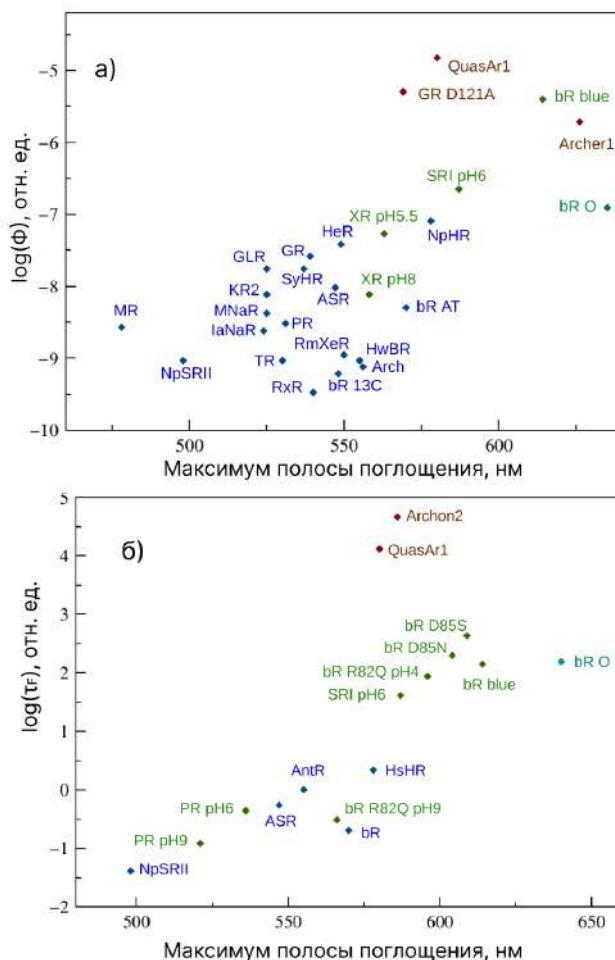


Рисунок 1.6 — а) Зависимость логарифмов квантовых выходов флуоресценции от длин волн максимумов полос поглощения микробных родопсинов. б) Зависимость логарифмов времен жизни флуоресцентного состояния от длин волн максимумов полос поглощения микробных родопсинов.

Наблюдаемое разнообразие флуоресцентных свойств микробных родопсинов, содержащих один и тот же хромофор, должно определяться различием во взаимодействии хромофора с окружением. Влияние аминокислотного окружения хромофора на положение максимума его полосы поглощения было показано во многих исследованиях [21; 55—57]. Установлено, что наиболее важными факторами являются электростатическое и стерическое взаимодействие аминокислотных остатков белка с хромофором. Наиболее важным фактором, опреде-

ляющим положение максимума полосы поглощения, является электростатический эффект противоионов, остатков отрицательно заряженных аминокислот, расположенных близко к положительно заряженной $C=NH^+$ группе хромофора. Результаты исследований, как экспериментальных, так и проведенных методами компьютерного моделирования, показывают, что замена противоиона нейтральным остатком или протонирование противоиона приводит к значительному красному сдвигу максимума полосы спектра поглощения [21]. Ключевая роль электростатического эффекта противоионов для флуоресцентных свойств родопсинов также очевидна из имеющихся экспериментальных данных [58–61]. Данные, представленные на Рисунке 1.6, показывают увеличение квантовых выходов флуоресценции и времен жизни флуоресценции при переходе от основной формы микробных родопсинов дикого типа к вариантам белков с противоионом, замещенным нейтральной аминокислотой, или к формам с протонированным противоионом.

Имеющиеся данные о зависимости флуоресцентных свойств от pH также подтверждают связь состояния протонирования противоиона с эффективностью флуоресценции и фотоизомеризации. Для бактериородопсина было обнаружено значительное увеличение интенсивности флуоресценции при кислых значениях pH с наиболее интенсивной флуоресценцией при pH около 1.7 (увеличение примерно в 15 раз по сравнению с нейтральным pH) [60]. Наблюдаемая pH-зависимость интенсивности флуоресценции коррелирует с pH-зависимостью длины волны максимума полосы поглощения – максимум смещается в более длинноволновую область при подкислении. Напротив, в щелочном диапазоне pH наблюдались лишь незначительные изменения интенсивности флуоресценции и положения максимума полосы поглощения [60]. Эти результаты согласуются со значением $pK_a \approx 2.7$, полученным для противоиона бактериородопсина [62]. В недавнем исследовании, проведенном методом спектроскопии с временным разрешением, было обнаружено две компоненты в распаде возбужденного состояния бактериородопсина при низком $pH < 4$: ≈ 0.5 пс и 7.8 пс [63]. Было выдвинуто предположение, что медленная компонента соответствует форме белка с протонированным противоионом. Увеличение интенсивности излучения при снижении значения pH было также обнаружено для *Gloebacter violaceus* родопсина [64], ксантородопсина [65], *Exiguobacterium sibiricum* родопсина [66], а увеличение времени жизни возбужденного состояния при подкислении было за-

регистрировано для протеородопсина (PR) [67; 68] и *Krokinobacter rhodopsin 2* [69].

Во всех случаях переход от низких значений квантовых выходов флуоресценции или времен жизни возбужденного состояния к высоким значениям происходил в диапазоне pH, близком к pKa противоиона. Более того, было продемонстрировано, что точку этого перехода можно изменять, настраивая pKa противоиона [59; 66]. Например, в одном из исследований pKa противоиона D85 в бактериородопсине был повышен до ≈ 7.5 путем замены положительно заряженного остатка аргинина R82 на остаток глутамина [59]. Для бактериородопсина с аминокислотной заменой R82N значительное увеличение времени жизни возбужденного состояния наблюдалось при снижении pH с 9.6 (0.6 пс) до 4.4 (равный вклад компонент со временем жизни 2.0 пс и 7.0 пс), в то время как для белка дикого типа такое увеличение времени жизни возбужденного состояния наблюдалось только при $\text{pH} < 3$, что согласуется с pKa противоиона ≈ 2.7 [59]. В другом исследовании наблюдались различные величины изменения интенсивности флуоресценции при снижении значения pH для *E. sibiricum* родопсина дикого типа и его варианта с аминокислотной заменой H57M [66]. В белке дикого типа значение pKa противоиона D85 согласно оценкам не превышает 2.0, и снижение pH с 7.0 до 5.0 приводило к увеличению флуоресценции в два раза. Замена остатка гистидина, который взаимодействует с противоионом D85, на остаток метионина привела к увеличению pKa(D85) до 6.3. При этом для белка с аминокислотной заменой наблюдалось 100-кратное увеличение интенсивности флуоресценции при снижении pH с 9.0 до 4.5 [66].

Увеличение pKa противоиона также наблюдалось для О-интермедиата фотоцикла бактериородопсина. О-интермедиат, как было указано выше, возникает на последней стадии фотоцикла (Рисунок 1.4) и переходит в основное состояние белка за время $\sim 10\text{-}30$ мс [39]. Основное различие между О-интермедиатом и основным состоянием заключается в состоянии протонирования двух титруемых групп — противоионного комплекса, состоящего из остатков аспарагиновых кислот D85 и D212, и группы освобождения протона, которая включает остатки глутаминовых кислот E194 и E204 [39]. В О-интермедиате протон расположен на противоионном комплексе, во время перехода из О-интермедиата в основное состояние фотоцикла он переносится на группу освобождения протона. В недавнем исследовании было выдвинуто предположение, что перенос протона может

происходить через цепочку молекул воды, связывающих противоион D212 и остаток глутаминовой кислоты E204 [49]. Хотя о прямых экспериментальных измерениях pK_a противоиона для О-интермедиата не сообщалось, титрование бактериородопсина показало, что при отрыве протона от группы освобождения протона происходит увеличение pK_a противоиона до ≈ 7.5 [70], поэтому такое значение pK_a противоиона можно предположить для О-интермедиата. В согласии с этим предположением, квантовый выход флуоресценции (0.1%) [71] и время жизни возбужденного состояния (9 ± 2 пс [71]) О-интермедиата при нейтральном рН ближе к значениям, полученным для бактериородопсина ($pK_a(D85) \approx 2.7$ [62]) при $pH \approx 2$ (синяя форма) [60; 72], чем при нейтральном рН.

Другое флуоресцентное состояние, Q-интермедиат, было обнаружено методом флуоресцентной спектроскопии с временным разрешением как состояние с долгоживущей флуоресценцией (62 ± 2 пс) [71]; согласно оценке, квантовый выход флуоресценции этого состояния равен 0.7% [71], что в 7 раз больше значения, полученного для О-интермедиата. Q-интермедиат не участвует в основном фотоцикле бактериородопсина, а возникает при фотовозбуждении N-интермедиата [73]. Структура и состояния протонирования титруемых остатков Q-интермедиата не были определены, но наблюдаемая долгоживущая флуоресценция позволяет предположить, что противоион в этой форме протонирован. Долгоживущая флуоресценция интермедиатов фотоцикла также обнаружена для археродопсина-3, *N. pharaonius* галородопсина, *Krokinobacter rhodopsin 2* (KR2) и *Rubrobacter xylanophilus* родопсина (RxR) [17]. При низкой интенсивности источника света наблюдается только слабая флуоресценция, которую можно отнести к основной форме фотоцикла белка. Однако при интенсивном освещении, которое вызывает накопление интермедиатов фотоцикла, сигнал флуоресценции существенно увеличивается. Эта интенсивная флуоресценция характеризуется двухэкспоненциальным затуханием с более быстрой и более медленной компонентами τ_1 и τ_2 . Для исследованных родопсинов компоненты τ_1 и τ_2 варьируются от 5.2 до 9.6 пс и от 24 до 60 пс соответственно [17]. Найденные значения времен жизни флуоресценции схожи с временами жизни возбужденных состояний, найденных для О и Q интермедиатов фотоцикла бактериородопсина, и могут быть отнесены к временам жизни О и Q интермедиатов изученных белков.

Таким образом, согласно имеющимся литературным данным, для увеличения интенсивности флуоресценции и сдвига полосы поглощения в длинноволновую область спектра необходимо стабилизировать форму белка, в котором отсутствуют отрицательно заряженные аминокислотные остатки вблизи $C=NH^+$ группы хромофора – противоионы. Если такие противоионы присутствуют, они должны быть заменены на остатки нейтральных аминокислот, либо необходимо путем введения иных аминокислотных замен достичь увеличения pK_a противоионов до значений выше физиологического pH . До проведения данного диссертационного исследования механизм усиления флуоресценции в ярких мутантных вариантах археородопсина-3 (Archer1, QuasAr1/2 и Archon1/2), которые в настоящее время начали использоваться в качестве генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала, не был до конца изучен. В рамках этого диссертационного исследования, основываясь на результатах экспериментальных исследований, компьютерного моделирования, и описанных в данной главе литературных данных, был определен механизм, приводящий к увеличению флуоресценции в сенсорах мембранного потенциала из группы Archers. Полученная информация была использована для направленного дизайна новых сенсоров мембранного потенциала, мутантных вариантов археородопсина-3 из группы Archers. Результаты исследования описаны в Главах 3 и 4 данной диссертации.

Глава 2. Методы

2.1 Общий подход

Для разработки новых сенсоров мембранного потенциала клетки на основе археородопсина-3 использовался подход, комбинирующий подходы направленной эволюции и направленного дизайна белков. Направленная эволюция – подход в белковой инженерии, в котором модификация свойств белка проводится путем имитации процесса природной эволюции [74; 75]. Генерируется библиотека вариантов белка со стохастическим распределением аминокислотных замен. На основании скрининга полученной библиотеки отбираются те варианты белка, в которых наблюдается наибольшее улучшение модифицируемых свойств, они используются в качестве основы для генерации новой библиотеки вариантов белка. Процесс проводится итеративно и прекращается, когда переход к новой библиотеке не приводит к улучшению свойств белка в течение нескольких итераций. Преимуществом метода направленной эволюции является возможность получения улучшенных вариантов белка без информации о его пространственной структуре и механизме регуляции оптимизируемого свойства. При этом метод требует перебора очень большого количества вариантов, а вероятность получения на выходе оптимальной комбинации аминокислотных замен не очень высока.

Направленный дизайн – подход в белковой инженерии, в котором выбор аминокислотных замен для модификации свойств или функций белка проводится на основании данных о пространственной структуре белка и молекулярных механизмах, определяющих его свойства или функции. Преимуществом метода направленного дизайна является эффективность – небольшое число выбранных на основании анализа структуры и механизмов аминокислотных замен вводится методом сайт-направленного мутагенеза и приводит к искомой модификации свойств белка. Недостатком метода направленного дизайна является сложность его реализации в большинстве случаев. Требуются высокоточные компьютерные модели белка для определения молекулярного механизма, отвечающего за изменение свойств белка.

Комбинация методов направленного дизайна и направленной эволюции белков, объединяющая их сильные стороны, была реализована следующим образом. Набор полученных в качестве результата направленной эволюции белков разделяется на две группы – обладающих и не обладающих улучшенными свойствами (Рисунок 2.1). Затем при помощи экспериментальных методов и компьютерного моделирования проводится сравнительный анализ двух групп белков и определяется структурная характеристика, изменение которой приводит к улучшению свойств белков из второй группы. Информация об этой структурной характеристике используется для последующего направленного дизайна белков с улучшенными свойствами.

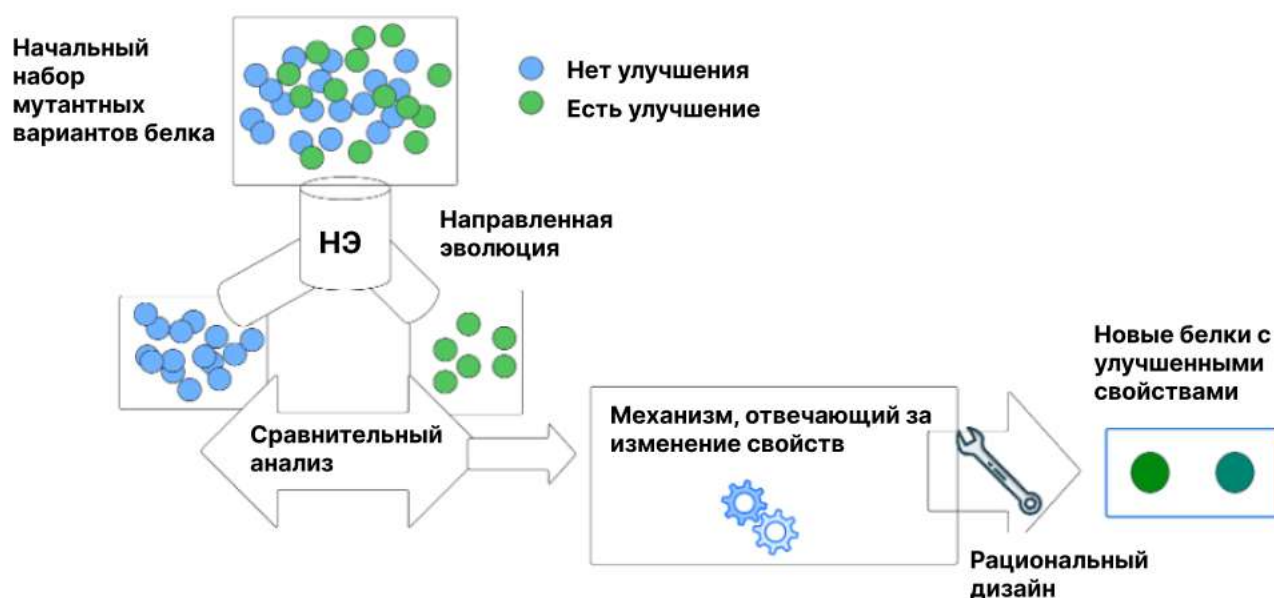


Рисунок 2.1 — В работе был использован подход к белковой инженерии, объединяющий методы направленной эволюции и направленного дизайна.

2.2 Методы компьютерного моделирования

В рамках диссертационной работы методы компьютерного моделирования применялись для определения структурной характеристики, изменение которой приводит к увеличению флуоресценции в сенсорах мембранного потенциала, мутантных вариантах археородопсина-3 из группы Archers, относительно белка

дикого типа. Для всех исследованных в работе белков были сконструированы трехмерные модели, рассчитаны длины волн максимумов полос поглощения.

2.2.1 Конструирование трехмерных моделей изучаемых микробных родопсинов и их мутантных вариантов. Расчет спектральных характеристик белков

Для дикого типа археородопсина-3, бактериородопсина и О-интермедиата бактериородопсина с аминокислотной заменой L93A в качестве начальных трехмерных структур были использованы модели, полученные методом рентгеноструктурного анализа (археородопсин-3: PDB ID 6GUX, разрешение 1.3 Å [76], бактериородопсин: PDB ID 5ZIM, разрешение 1.25 Å [77], О-интермедиат бактериородопсина с аминокислотной заменой L93A: PDB ID 3VI0, разрешение 3.3 Å [78]).

Для мутантных вариантов археородопсина-3 отсутствуют экспериментальные данные о пространственной структуре. По этой причине начальные трехмерные структуры белков были получены методом моделирования по гомологии. В методах моделирования по гомологии известная пространственная структура гомологичного белка используется в качестве начального шаблона. Отличия аминокислотных последовательностей искомого белка и белка-шаблона определяются перед процессом предсказания трехмерной структуры путем выравнивания аминокислотных последовательностей двух белков. Пример выравнивания аминокислотных последовательностей двух белков приведен на Рисунке 2.2. Степень гомологичности (схожести) двух белков определяется путем расчета отношения количества идентичных аминокислот на одинаковых сайтах в выравнивании к общему числу сайтов в выравнивании. Чем выше значение идентичности аминокислотных последовательностей целевого белка и шаблона, тем выше степень гомологии и тем выше вероятность получения правильной трехмерной структуры методом моделирования по гомологии.

Информация о соответствии аминокислотных последовательностей искомого белка и белка-шаблона, а также информация о трехмерной структуре белка-шаблона используется алгоритмами моделирования по гомологии для ге-

```

4GD3_ChainA__ -----VVSHYVFEAPVRIWHWLTVLCMAVLMVTGYFIGKPLPS
2ZT9_ChainA__ MANVYDWFEEERLEIQAI AEDVT SKYVPPHVNI FYCLGGITLVCFLIQFATGFAMTFYYKP
                                     *  *      **

4GD3_ChainA__ VSGEATYLFYMG-----YIRLIHFSAGMVFTVLLMRIYWAFVGNRYSRQGVWYEIR
2ZT9_ChainA__ TVAEAYSSVQYIMNEVNFGLIRSIHRWSASMMVLMILHVFRVYLTGGFKKP-----
               **                ***

4GD3_ChainA__ WYLFLPIAQAAMFGYFLMSVFMIIITGFALYSEHSQYAIF-----APFRYVVEF
2ZT9_ChainA__ -----RELTWVSGVILAVITVSFGVTGYSLPWDQVGYWAVKIVSGVPEAIPVVGVLIS
                                     *    *    **          *    *

4GD3_ChainA__ FYWTGGN-----SMDIHSWHRLGMWLIGAFVIGHVYMALREDIMSD--
2ZT9_ChainA__ DLLRGGSSVGQATLTRYSAHTFVLPWLIAVFM LFHFLMIRKQGSGPL
               **                *    *          *    *

Sequence identity: 10.04%
Matched Positions: 72.05%

```

Рисунок 2.2 — Пример выравнивания двух аминокислотных последовательностей.

нерации начальной трехмерной модели целевого белка [79]. Чтобы найти отличия в пространственной структуре, вызванные различием в аминокислотных последовательностях двух белков, проводится поиск наиболее термодинамически стабильной конформации целевого белка, который зачастую включает перебор большого количества возможных конфигураций с последующей оценкой термодинамической стабильности каждой из них. В результате получается конечная пространственная структура целевого белка. На сегодняшний день было разработано большое количество методов моделирования по гомологии. Для выбора наиболее оптимального метода в рамках выполнения диссертационного исследования был проведен сравнительный анализ трех широко распространенных методов, реализованных в программах Medeller [80], I-TASSER [81] и Rosetta [82], а также трех методов выравнивания аминокислотных последовательностей, реализованных в программах MP-T [83], AlignMe [84] и MUSTER [85]. В качестве тестового набора использовались все уникальные пространственные структуры микробных родопсинов, полученных методом рентгеноструктурного анализа к моменту выполнения исследования (2017 год). Из этого набора были получены пары родопсинов с разной степенью гомологии и проводилось предсказание пространственной структуры первого белка из пары на основании пространственной структуры второго белка и наоборот. Оценка качества

полученных структур проводилась путем сравнения полученной модели с соответствующей кристаллографической структурой белка. На основании полученных данных алгоритм для генерации трехмерных структур, реализованный в программе I-TASSER, а также алгоритм выравнивания аминокислотных последовательностей, реализованный в программе AlignMe, были выбраны в качестве наиболее надежных и использовались в рамках проекта. Результаты исследования были опубликованы [86].

На следующем этапе для всех моделей, как кристаллографических структур, так и предсказанных моделированием по гомологии, проводилось предсказание положений молекул воды в полостях белка. Молекулы воды в полостях белков могут играть важную функциональную роль, например, участвовать в переносе протонов, а также стабилизировать определенную конформацию белка путем образования водородных связей с аминокислотными остатками белка [87; 88]. Структуры белков, полученные методом рентгеноструктурного анализа, часто не содержат информацию обо всех молекулах воды в полостях белка. Отсутствие части молекул воды в кристаллографических структурах может быть связано как с недостаточным разрешением, так и наличием подвижных молекул воды, которые не локализованы в определенном положении в белке [89; 90]. Структуры белков, полученные методом моделирования по гомологии, не содержат молекул воды. По этой причине, необходимым этапом при построении полноценной модели пространственной структуры белка является предсказание положения молекул воды в полостях белка. Процесс можно разбить на два этапа. 1. Поиск возможных положений для молекул воды. 2. Оценка вероятности нахождения молекулы воды в каждом из найденных положений. Поиск возможных позиций для молекул воды заключается в нахождении всех полостей в структуре белка, размер которых позволяет поместить одну или несколько молекул воды. К примеру, в методе, реализованном в программе Dowser++ [91], структура белка разбивается на множество кубических областей, в каждой области запускается стандартная процедура молекулярного докинга, в котором молекула воды выступает в качестве лиганда.

Второй этап – оценка вероятности нахождения воды в найденном положении в белке. Для этого необходимо рассчитать или оценить свободную энергию Гиббса переноса молекулы воды из водной среды в указанное положение в белковой полости. Существуют подходы, включающие расчет данной характеристики

при помощи методов возмущения свободной энергии (free energy perturbation, FEP), термодинамического интегрирования и их аналогов [92; 93]. В связи с тем, что расчет свободной энергии требует перебора большого количества конфигураций молекулярной системы, который проводится методом молекулярной динамики или методом Монте-Карло, эти методы требуют значительных вычислительных ресурсов и редко применяются на практике. Более оптимальным подходом является использование эмпирических функций для оценки свободной энергии Гиббса. Эмпирические функции для оценки свободной энергии реализованы в широко распространенных программных пакетах, таких как Dowser [94] и WaterDock [95]. Для выбора оптимального метода было проведено сравнительное исследование четырех широко распространенных алгоритмов, реализованных в программных пакетах Dowser [94], Dowser++ [91], WaterDock [96], WaterDock-2.0 [97]. Алгоритмы отличались методами поиска возможных положений молекул воды и эмпирическими функциями для оценки термодинамической стабильности нахождения молекулы воды в заданном положении в полости белка. Использовался набор из всех уникальных кристаллографических структур родопсинов, которые были известны к моменту проведения исследования (2020 год). В качестве метрики использовалось общее число предсказанных в полостях белка молекул воды, отношение общего числа предсказанных молекул воды к числу молекул воды в кристаллографических структурах, а также возможность предсказания функционально значимых кластеров, состоящих из нескольких молекул воды связанных водородными связями друг с другом и соседними аминокислотными остатками. На основании сравнительного исследования был выбран метод, реализованный в программе Dowser++. При этом в рамках исследования для этого алгоритма проводилась дополнительная параметризация [20]. Результаты исследования были опубликованы [20].

На следующем этапе проводилась оптимизация структуры белка при помощи гибридного метода квантовая механика/молекулярная механика (QM/MM). Использовалась двухуровневая схема ONIOM (QM:MM-EE) (QM=B3LYP/6-31g*; MM = Amber99 для аминокислот и ионов, модель TIP3P для молекул воды, EE – электронное вложение) [98]. Квантово-механическая область модели включала в себя 49 атомов хромофора и NH-группу ковалентно связанного с хромофором остатка лизина. Молекулярно-механическая часть включала оставшуюся часть белка и все молекулы воды. Для описания грани-

цы между КМ и ММ частями модели использовался линкерный атом водорода. Для всех КМ/ММ расчетов использовался программный пакет Gaussian09 [99].

Полученные модели использовались для расчета максимума полосы поглощения белка. Для расчета энергии вертикального перехода ($S_0 \rightarrow S_1$) использовался КМ/ММ метод SORCI+Q(6,6)/6-31g*/Amber99. Расчет проводился в программе ORCA 3.0.3 [100]. Использованные методы построения моделей родопсинов и расчета максимумов полос поглощения были верифицированы ранее в большом количестве исследований, в том числе проведенных в рамках данной работы [20; 57; 101].

2.2.2 Учет подвижности белкового окружения при конструировании трехмерной модели и расчете спектральных свойств белков

Стандартные трехмерные модели белков учитывают только одну конформацию белка. При этом при комнатной температуре белок подвижен, что может оказывать влияние на геометрию кофактора и на его спектральные характеристики. Для учета подвижности белка в состоянии термодинамического равновесия для родопсинов была предложена и программно реализована модель усредненной конфигурации аминокислотного окружения кофактора, которая создает электростатическое поле в области кофактора, усредненное по существующим в термодинамическом равновесии конфигурациям аминокислотного окружения (Average Solvent Electrostatic Configuration, ASEC) [102]. Для построения ASEC модели необходимо сгенерировать набор различных конфигураций аминокислотного окружения кофактора с их дальнейшим усреднением. В связи с тем, что наибольшее влияние на кофактор оказывает движение ближайшего окружения, ASEC модель строилась только для аминокислотных остатков и молекул воды, расстояние от которых до любого из атомов хромофора не превышало 8 Å. Для генерации конфигураций использовался метод молекулярной динамики с использованием молекулярно-механического силового поля Amber99 [103]. При расчете траектории молекулярной динамики положение атомов хромофора, а также положение всех атомов аминокислотных остатков и молекул воды,

расположенных от любого из атомов хромофора более чем на 8 Å, фиксировалось. Расчет молекулярной динамики проводился с помощью программного пакета Gromacs 2019.1 [104]. Из полученной траектории молекулярной динамики вырезалось 100 некоррелированных конфигураций белкового окружения, которые структурно накладывались друг на друга для построения ASEC модели. Таким образом, для описания каждого из атомов ближайшего окружения хромофора (8 Å от хромофора) в ASEC модели использовалось 100 псевдоатомов, соответствующих 100 различным конфигурациям. Для получения стандартных величин энергий взаимодействия между окружением и хромофором проводился пересчет параметров атомов, определяющих невалентные взаимодействия – кулоновское взаимодействие и взаимодействие Ван дер Ваальса. Модели аминокислотных остатков и молекул воды, расстояние от которых до любого из атомов хромофора превышало 8 Å, добавлялись в ASEC модель без модификаций.

Для учета влияния подвижности белкового окружения на структуру хромофора проводилась КМ/ММ оптимизация геометрии хромофора в окружении белка, описываемом ASEC моделью. Квантово-механическая область модели включала в себя 49 атомов хромофора и NH-группу ковалентно связанного с хромофором остатка лизина. Подвижная молекулярно-механическая часть включала оставшуюся часть боковой цепочки остатка лизина. Для описания границы между КМ и ММ частями модели использовался линкерный атом водорода. Оставшееся окружение хромофора описывалось как точечные заряды атомов и псевдоатомов ASEC окружения. Метод расчета B3LYP/6-31g*/Amber99. Для КМ/ММ оптимизации использовался программный пакет Molcas 7.2 [105] комбинированный с программным пакетом Tinker 5.1 [106]. После оптимизации геометрии проводился расчет энергии вертикального перехода $S_0 \rightarrow S_1$ для хромофора в окружении точечных зарядов ASEC модели, метод расчета SORCI+Q(6,6)/6-31g*, расчет проводился в программе ORCA 3.0.3 [100].

Ранее в теоретических работах было показано, что градиент потенциальной энергии молекулярной системы в усредненном окружении среды равен градиенту свободной энергии молекулярной системы (free energy gradient, FEG) [107]. Таким образом, при проведении оптимизации геометрии хромофора в ASEC окружении проводится оптимизация его свободной энергии Гиббса, а полученные КМ/ММ ASEC-FEG модели родопсинов соответствуют минимумам

на поверхности свободной энергии Гиббса молекулярной системы. Полученные модели могут использоваться, к примеру, для расчета разницы в термодинамической стабильности двух форм родопсина, отличающихся конформацией хромофора. Для расчета разницы в свободной энергии между конформациями могут использоваться различные методы, например, метод возмущения свободной энергии [108].

Для верификации КМ/ММ ASEC-FEG моделей родопсинов проводился расчет максимумов полос поглощения и расчет разницы свободных энергий Гиббса для зрительного родопсина и батородопсина – первого интермедиата фоточикла зрительного родопсина, а также переходного состояния для реакции, соответствующей термическому переходу между этими формами. Также проводился расчет для полностью-*транс* и 13-*цис* форм *Anabaena Sensory Rhodopsin* и переходного состояния, соответствующего реакции термической изомеризации. КМ/ММ ASEC-FEG модели позволили получить хорошее согласие рассчитанных максимумов полос поглощения с экспериментом, а также получить хорошее согласие разниц в энергии Гиббса между формами родопсинов. Таким образом, разработанные КМ/ММ ASEC-FEG модели родопсинов были верифицированы, результаты верификации и подробности разработанного метода были опубликованы [22].

2.3 Экспериментальные методы

Синтез исследованных в работе родопсинов проводился коллегами автора диссертационной работы, методы синтеза подробно описаны в опубликованной по результатам исследования статье [19].

Стационарные спектры поглощения в УФ-видимой области регистрировались от очищенных белков, растворенных в буфере Tris (10 mM Tris, 200 mM NaCl, 0,15% *n*-децил- β -*D*-мальтопиранозид (DM), pH=6,5), при комнатной температуре на спектрофотометре NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific). Адаптированные к темноте образцы готовили путем инкубации в темноте в течение 1 часа перед измерениями. Адаптированные к свету образцы получали путем

облучения лазером мощностью 5 мВт с длиной волны 532 нм в течение 10 минут непосредственно перед измерениями.

Спектры комбинационного рассеяния очищенных белков, растворенных в буфере Tris, регистрировались при комнатной температуре на экспресс-рамановском спектрометре SENTERRA (Bruker), оснащенном объективом 50×, с использованием возбуждения мощностью 100 мВт с длиной волны 785 нм и 40 мВт с длиной волны 532 нм. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции регистрировались с помощью спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon) для очищенного белка, растворенного в буфере Tris.

Для измерения квантового выхода флуоресценции Arch D95E/T99C использовалась интегрирующая сфера Quanta- ϕ спектрофлуориметра Fluorolog-3 (Horiba Jobin Yvon). Полученный квантовый выход флуоресценции (0.33%) согласуется с ранее опубликованными данными других авторов. Для остальных изученных белков был применен сравнительный метод, Arch D95E/T99C был выбран в качестве референса. Для каждого белка и референса были получены растворы с различными концентрациями белка, соответствующими значениям $OD(\lambda_{max}) = 0.15, 0.1, 0.07, 0.05$ и 0.03 . Для каждого раствора регистрировался спектр флуоресценции при возбуждении на длине волны максимума полосы поглощения. Спектры флуоресценции были получены на спектрофлуориметре Chirascan-plus (Applied Photophysics). Интегральная интенсивность флуоресценции каждого раствора рассчитывалась путем расчета площади под кривой зависимости интенсивности флуоресценции от длины волны. Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции от $OD(\lambda_{max})$ была нанесена на график для каждого белка и референса и аппроксимирована линейной функцией. Для получения значений квантового выхода флуоресценции из полученных углов наклона линейных аппроксимаций (S) использовалось следующее уравнение: $\Phi_{protein} = \Phi_{D95E/T99C} \cdot (S_{protein}/S_{D95E/T99C})$, где $\Phi_{protein}$ – квантовый выход флуоресценции изучаемого белка, $\Phi_{D95E/T99C}$ – квантовый выход флуоресценции Arch D95E/T99C, $S_{protein}$ и $S_{D95E/T99C}$ – углы наклона для прямых – линейных аппроксимаций зависимости интегральной интенсивности флуоресценции от $OD(\lambda_{max})$ для изучаемого белка и Arch D95E/T99C, соответственно.

Для оценки зависимости флуоресценции от мембранного потенциала проводилась регистрация спектров флуоресценции от живых клеток *E. coli*, экспрессирующих сенсоры, и тех же клеток после их гибели от действия антибио-

тика или азидата натрия. Наблюдаемое повышение интегральной интенсивности флуоресценции после гибели клеток было соотнесено с зависимостью флуоресценции от величины мембранного потенциала клетки.

Глава 3. Определение структурного фактора, отвечающего за значительное увеличение яркости флуоресцентного сигнала в генетически кодируемых сенсорах мембранного потенциала на основе археородопсина-3 из группы Archers по сравнению с археородопсином-3 дикого типа

3.1 Введение

Основной целью диссертационной работы являлась разработка новых сенсоров мембранного потенциала клетки на основе археородопсина-3 с увеличенным флуоресцентным сигналом. Для решения задачи был использован подход, который подразумевает комбинированное использование методов направленной эволюции и направленного дизайна. Рассматривался набор белков, включающий микробные родопсины дикого типа и мутантные варианты археородопсина-3 с увеличенной интенсивностью флуоресценции, которые были получены методом направленной эволюции в работе группы профессора Frances H. Arnold [14]. Белки из выбранного набора разделялись на две группы – белки, обладающие и не обладающие увеличенной интенсивностью флуоресценции. На следующем шаге при помощи экспериментальных методов и компьютерного моделирования проводился сравнительный анализ этих двух групп белков и была найдена структурная характеристика, изменение которой было связано с увеличением интенсивности флуоресценции. Информация о найденной структурной характеристике использовалась для последующего направленного дизайна белков с увеличенной интенсивностью сигнала, что описано в Главе 4 данной диссертационной работы.

3.2 Различия спектральных свойств археородопсина-3 дикого типа и мутантных вариантов археородопсина-3 из группы Archers

Согласно имеющейся информации о флуоресценции микробных родопсинов и их спектральных свойствах, одним из основных факторов, определяю-

щих квантовый выход флуоресценции и положение максимума полосы спектра поглощения этих белков, является электростатическое поле, создаваемое аминокислотными остатками вблизи хромофора. Изменение электростатического поля достигается путем внесения или удаления полярных или заряженных аминокислотных остатков, либо путем изменения состояния протонирования аминокислотных остатков. Еще одной спектральной характеристикой микробных родопсинов, которая определяется электростатическим полем вблизи хромофора и для которой наблюдается корреляция с положением максимума полосы поглощения, является частота продольных колебаний скелетной цепочки хромофора (Рисунок 3.1) [109]. На спектрах комбинационного рассеяния этому колебанию соответствует интенсивная полоса, максимум которой расположен в области $1500\text{--}1540\text{ см}^{-1}$ для хромофора в протонированном состоянии [110—112] и вблизи 1565 см^{-1} для хромофора в непротонированном состоянии [112].

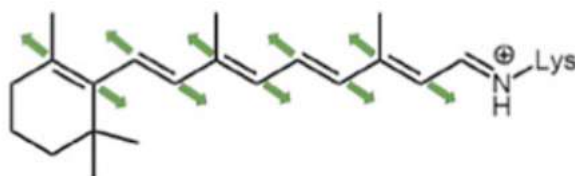


Рисунок 3.1 — Схематическое изображение продольных колебаний скелетной цепочки хромофора микробных родопсинов.

Измеренные стационарные спектры поглощения темно-адаптированных образцов археородопсина-3 дикого типа и вариантов белка с аминокислотными заменами D95E/T99C, P60L/D95E/T99C, V59A/D95E/T99C, D95E/T99C/P196S, V59A/P60L/D95E/T99C/P196S, а также спектры комбинационного рассеяния темно-адаптированных и свето-адаптированных форм белков показали отличие спектральных характеристик мутантных вариантов от белка дикого типа. А именно, максимумы полос поглощения (λ_{max}) мутантных вариантов расположены в диапазоне 622–628 нм, в то время как максимум полосы поглощения белка дикого типа расположен на 556 нм (темно-адаптированное состояние). Для мутантных вариантов максимум полосы спектра комбинационного рассеяния, соответствующей продольному колебанию скелетной цепочки хромофора ($\lambda_{C=C}$), был сдвинут в красную область относительно белка дикого типа ($1508\text{--}1516\text{ см}^{-1}$ для мутантных вариантов, 1527 см^{-1} для белка дикого типа). Все полученные данные представлены в Таблице 2 и на Рисунках 3.2, 3.3. Полученные данные говорят о значительном различии электростатических

полей, генерируемых аминокислотными остатками опсина вблизи хромофора для изученных флуоресцентных мутантных вариантов археородопсина-3 и белка дикого типа.

Таблица 2 — Максимумы стационарных спектров поглощения (λ_{max}), максимумы спектров возбуждения флуоресценции (λ_{exc}), максимумы спектров флуоресценции (λ_{em}) и квантовые выходы флуоресценции (Φ) археородопсина-3 (Arch) дикого типа и его вариантов с аминокислотными заменами, рассмотренных в этой главе. Arch-5 – Arch V59A/P60L/D95E/T99C/P196S.

Белок	λ_{max}	λ_{exc}	λ_{em}	$\Phi, \%$
Arch	556	553 [17]	687 [16]	0.01 [17]
D95E/T99C	626	627	729	0.33
P60L/D95E/T99C	624	625	725	0.40
D95E/T99C/P196S	628	639	733	0.56
V59A/D95E/T99C	622	623	724	0.62
Arch-5	622	627	745	0.87

Было проведено сравнение спектральных характеристик археородопсина-3 и мутантных вариантов белка из группы Archers со спектральными характеристиками других микробных родопсинов и интермедиатов фотоциклов микробных родопсинов, для которых имеются литературные данные. Все значения $\lambda_{C=C}$ и λ_{max} были нанесены на график – $\lambda_{C=C}$ по оси ординат и λ_{max} по оси абсцисс (Рисунок 3.4). Точки на полученном графике разбиваются на два кластера. В левом верхнем углу расположен кластер, соответствующий микробным родопсинам дикого типа, он включает археородопсин-3 дикого типа. В правом нижнем углу расположен кластер, соответствующий формам микробных родопсинов с отсутствием отрицательно заряженных аминокислотных остатков вблизи $C=NH^+$ части хромофора. Этот кластер включает бактериородопсин при pH=2.6 [113], а также О-интермедиаты фотоциклов *Krokinobacter rhodopsin 2* [114], галородопсина [115] и бактериородопсина из археи *Halobacterium salinarum* [112]. Кластер также включает мутантные варианты археородопсина-3 из группы Archers. Таким образом, все полученные экспериментальные данные и их сравнение с известными литературными дан-

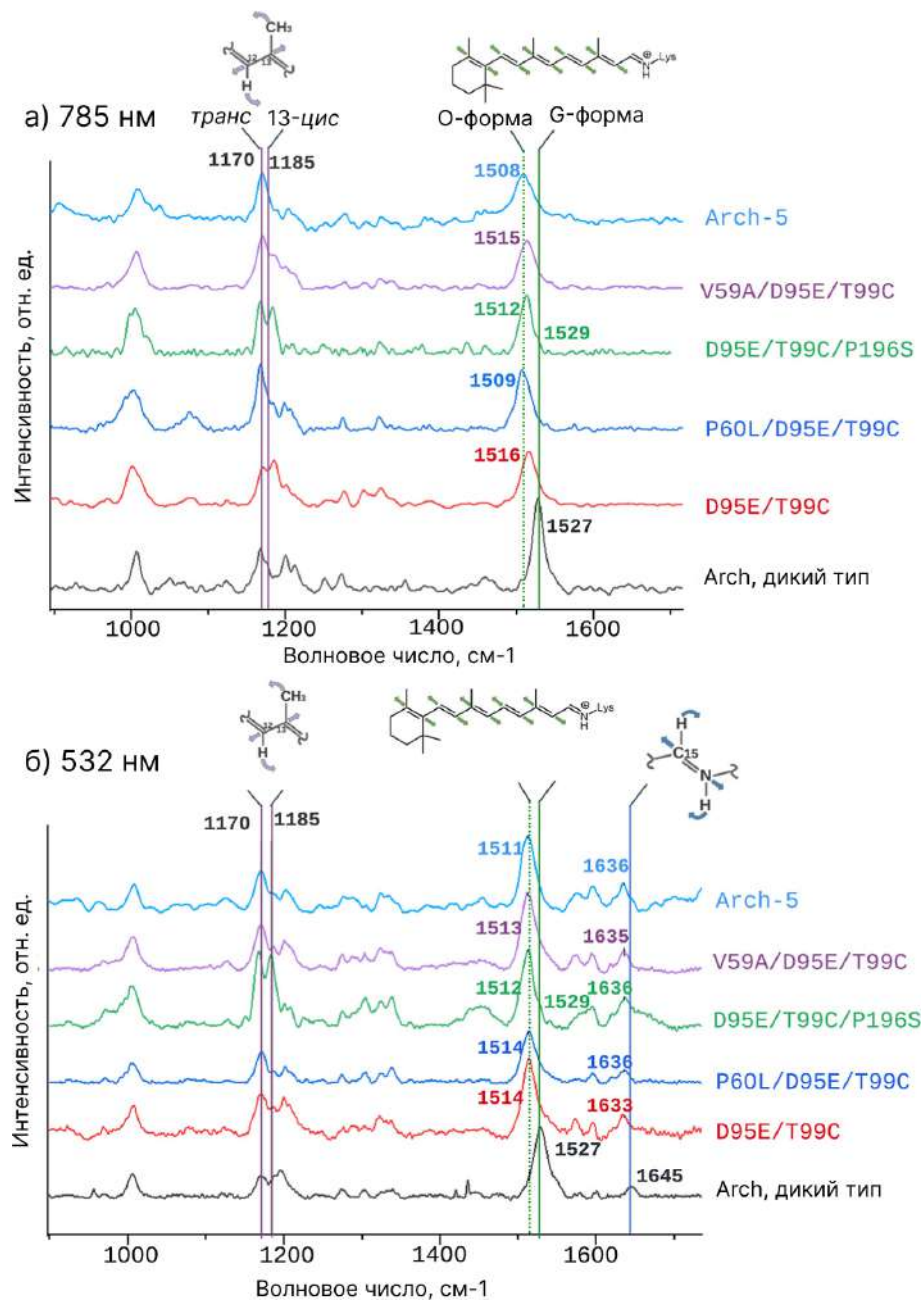


Рисунок 3.2 — Спектры комбинационного рассеяния дикого типа археородопсина-3 и его мутантных вариантов из группы Archers с увеличенным флуоресцентным сигналом. Измерения проводились для очищенных образцов белков, растворенных в буфере (10 мМ Tris, 200 мМ NaCl, 0,15% DM, pH=6.5). Спектры комбинационного рассеяния света регистрировали при возбуждении на 785 нм [адаптированный к темноте спектр, (а)] и 532 нм [адаптированный к свету спектр, (б)]. Мощность лазера была установлена на уровне 100 мВт. Arch-5 обозначает Arch V59A/P60L/D95E/T99C/P196S.

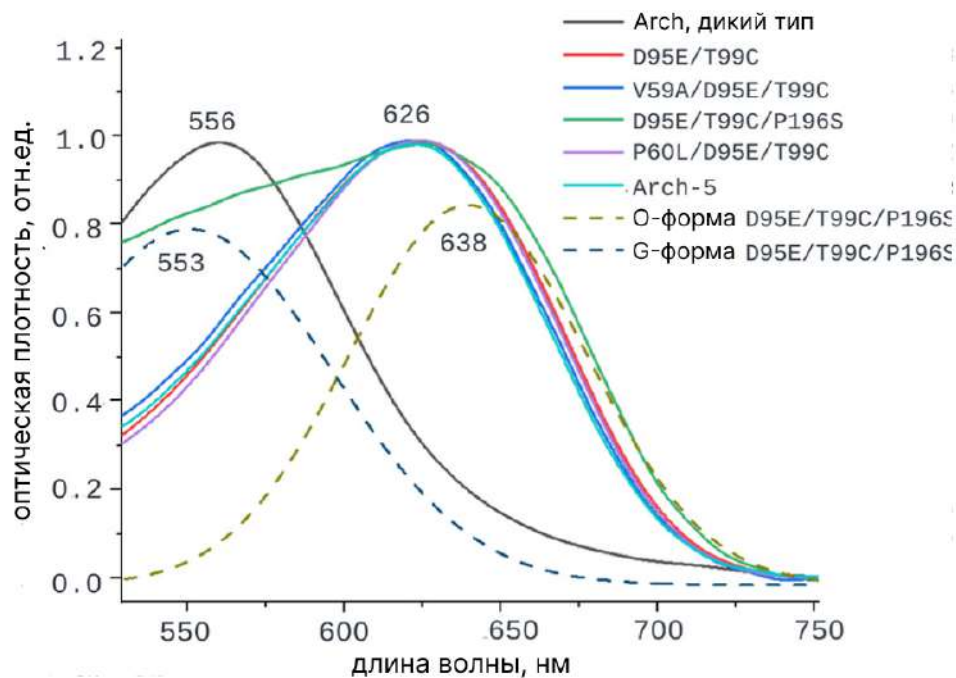


Рисунок 3.3 — Спектры поглощения в УФ-видимой области дикого типа археородопсина-3 и его мутантных вариантов из группы Archers с увеличенным флуоресцентным сигналом. Измерения проводились для очищенных образцов белков, растворенных в буфере (10 mM Tris, 200 mM NaCl, 0,15% DM, pH=6.5). Результат разложения полосы поглощения Arch D95E/T99C/P196S на две гауссовы функции изображен пунктирными линиями.

ными говорят о нейтрализации зарядов аминокислотного окружения $C=NH^+$ части хромофора во флуоресцентных белках из группы Archers.

Также необходимо было определить, возникает ли флуоресценция после фотовозбуждения основной формы фотоцикла или интермедиата фотоцикла. Согласно литературным данным, регистрируемая потенциал-зависимая флуоресценция археородопсина-3 возникает после фотовозбуждения Q-интермедиата фотоцикла, который в свою очередь возникает после фотовозбуждения N-интермедиата фотоцикла [38]. С другой стороны, для сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3 QuasAr1 и QuasAr2 было показано, что флуоресценция возникает после фотовозбуждения основной формы белка, без вовлечения интермедиатов фотоцикла [13]. Для изученных белков из группы Archers нами было показано, что для каждого белка максимум стационарного спектра поглощения и максимум спектра возбуждения флуоресценции совпадают, то есть флуоресценция возникает из формы белка, поглощающей фотон – основной, наиболее стабильной формы белка (Рисунок 3.5). Единственным исключением является Arch D95E/T99C/P196S, для которого максимум полосы поглощения (628 нм) сдвинут на 11 нм относительно максимума полосы возбуждения флуоресценции (639 нм). Обработка спектра поглощения Arch D95E/T99C/P196S показала, что полоса поглощения является сложной и состоит из двух компонент. Для аппроксимации полосы необходимо использовать две гауссовы функции с максимумами на 553 нм и 638 нм (Рисунок 3.3). С другой стороны, полосы поглощения остальных изученных белков из группы Archers хорошо аппроксимировались одной гауссовой функцией. Было выдвинуто предположение, что для белка Arch D95E/T99C/P196S наблюдается равновесие двух форм с максимумами поглощения на 553 нм и 638 нм. Фотовозбуждение формы белка с максимумом на 638 нм приводит к флуоресценции, что согласуется с близостью максимума поглощения этой формы с максимумом полосы возбуждения флуоресценции белка (639 нм). С другой стороны, наличие формы с максимумом поглощения на 553 нм приводит к тому, что общий максимум полосы поглощения белка сдвинут на 11 нм в синюю область относительно формы белка, фотовозбуждение которой приводит к флуоресценции.

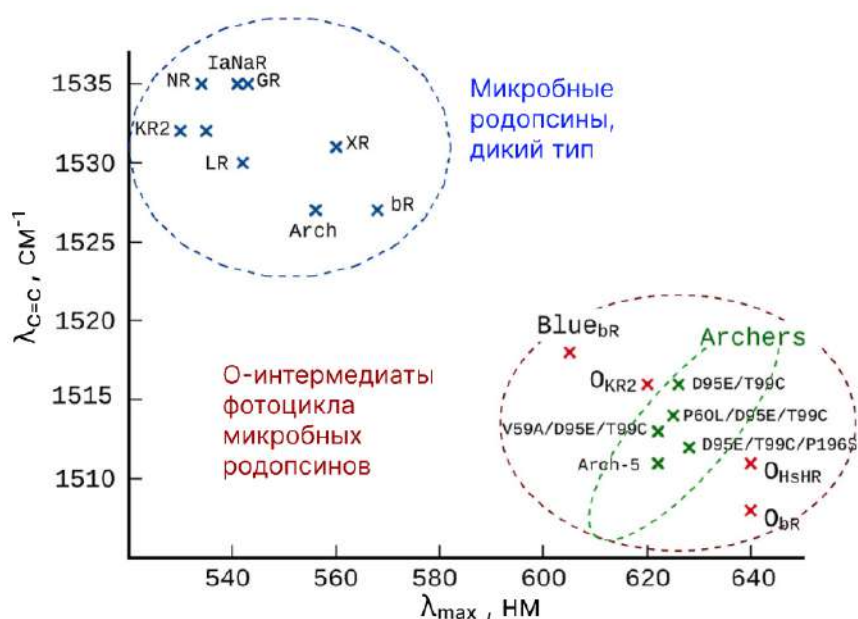


Рисунок 3.4 — Спектральные свойства микробных родопсинов. По оси ординат нанесены максимумы полос спектров комбинационного рассеяния, соответствующих продольному колебанию скелетной цепочки хромофора ($\lambda_{C=C}$), по оси абсцисс нанесены максимумы полос спектров поглощения (λ_{max}). Микробные родопсины дикого типа показаны синими точками.

О-интермедиаты фотоцикла микробных родопсинов и форма бактериородопсина при pH=2.6 показаны красными точками. Белки из группы Archers показаны зелеными точками. Аббревиатуры: KR2, *Krokinobacter* rhodopsin 2 [114]; NR, *Neurospora* rhodopsin [116]; PspR, *Pseudomonas putida* rhodopsin [117]; IaNaR, *Indibacter alkaliphilus* rhodopsin [118]; GR, *Gloeobacter* rhodopsin [119]; LR, *Leptosphaeria* rhodopsin [120]; Arch, археородопсин-3; XR, xanthorhodopsin [121]; bR, свето-адаптированный бактериородопсин из археи *Halobacterium salinarum* [113]; Blue_{bR}, форма бактериородопсина при pH = 2.6 [113]; O_{KR2}, О-интермедиат фотоцикла KR2 [122]; O_{HsHR}, О-интермедиат фотоцикла галородопсина из археи *Halobacterium salinarum* [112]; O_{bR}, О-интермедиат фотоцикла бактериородопсина [112]; Arch-5, Arch V59A/P60L/D95E/T99C/P196S.

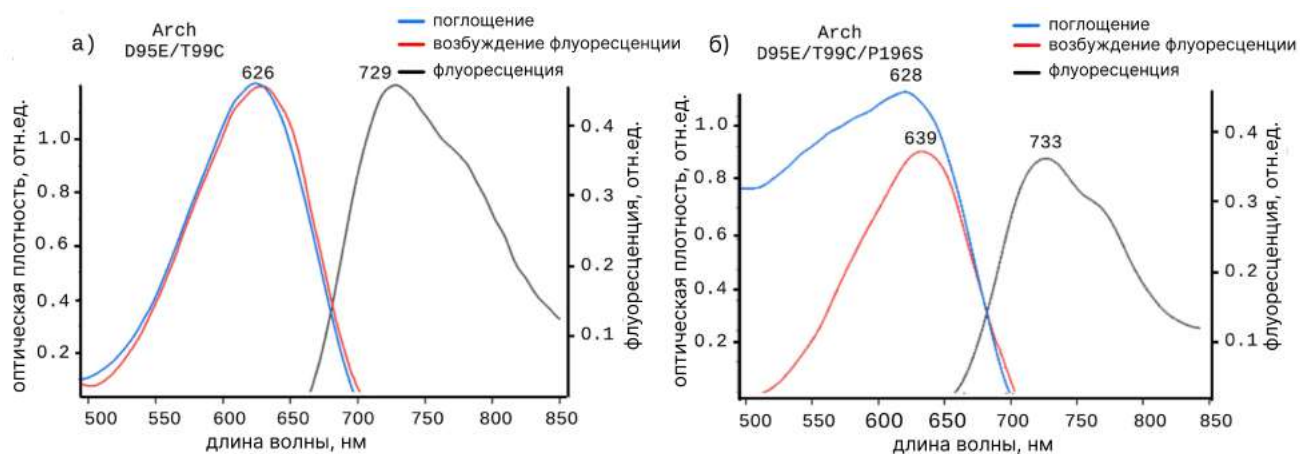


Рисунок 3.5 — Спектры поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции Arch D95E/T99C (а) и Arch D95E/T99C/P196S (б). Измерения проводились для очищенных образцов белков, растворенных в буфере (10 мМ Tris, 200 мМ NaCl, 0,15% DM, pH=6.5). Спектры возбуждения флуоресценции были получены при регистрации флуоресценции на 740 нм. Спектры флуоресценции были получены при возбуждении на 630 нм.

3.3 Определение структурной характеристики, изменение которой приводит к увеличению флуоресценции в мутантных вариантах археородопсина-3 из группы Archers относительно белка дикого типа

Для определения структурной характеристики, изменение которой приводит к увеличению флуоресценции в мутантных вариантах археородопсина-3 из группы Archers, были построены компьютерные модели всех изучаемых в рамках исследования белков. Результаты экспериментальных исследований показали, что спектральные свойства белков из группы Archers схожи со спектральными свойствами О-интермедиатов фотоцикла микробных родопсинов. На основании этой информации был сделан вывод, что электростатическое поле вблизи хромофора в этих белках также схоже с электростатическим полем в указанном регионе в О-интермедиатах фотоцикла. По этой причине для каждого белка были построены две модели, соответствующие двум формам белка – основной наиболее стабильной форме фотоцикла белка дикого типа (G-форма) и О-интермедиату фотоцикла белка дикого типа (О-форма). Начальные модели трехмерных структур G-форм белков строились методом моделирования по го-

мологии с использованием кристаллографической структуры белка дикого типа в качестве шаблона. Начальные модели трехмерных структур О-форм белков строились методом моделирования по гомологии с использованием кристаллографической структуры О-интермедиата бактериородопсина с аминокислотной заменой L93A в качестве шаблона. На основе всех начальных трехмерных моделей белков были получены квантово-механические/молекулярно-механические (КМ/ММ) ASEC-FEG модели и рассчитаны максимумы полос поглощения. Для построения моделей использовались методы, описанные в Главе 2.2.

Результаты компьютерного моделирования представлены в Таблице 3. Показано, что значение λ_{max} , рассчитанное для модели G-формы белка дикого типа, близко к экспериментальному. Анализ модели показал следующие состояния протонирования протонноионов – протонноион D95 протонирован, а протонноион D222 находится в непротонированной форме (Рисунок 3.6). Таким образом, общий заряд, создаваемый протонноионами, равен -1. В области протонноионов наблюдается кластер, включающий три молекулы воды, связанных водородными связями друг с другом, протонноионами D95 и D222, а также NH-группой хромофора. В группу освобождения протона включены остатки двух глутаминовых кислот, одна из которых (E214) находится в протонированной форме и образует водородную связь с E207 (Рисунок 3.6). Ориентация аминокислотных остатков в КМ/ММ модели и полученная система водородных связей соответствует наблюдаемой в кристаллографической структуре белка.

Для сравнения была построена модель О-формы археородопсина-3 дикого типа. Рассчитанный максимум полосы поглощения для полученной модели О-формы археородопсина-3 составляет 634 нм, что близко к оцениваемому на основании данных спектроскопии с временным разрешением максимуму полосы поглощения О-интермедиата бактериородопсина (640 нм) [112]. В модели О-формы протонноионы D95 и D222 протонированы (Рисунок 3.6). В области протонноионов отсутствует кластер из молекул воды, наблюдаемый в модели G-формы белка дикого типа. Остатки глутаминовых кислот E207 и E214 непротонированы и не могут образовывать водородную связь. Напротив, E207 образует водородную связь с остатком тирозина Y93, а E214 образует водородную связь с остатком треонина T203. Наблюдаемая ориентация аминокислотных остатков и система водородных связей соответствует наблюдаемой в кристалло-

графической структуре О-интермедиата бактериородопсина с аминокислотной заменой L93A.

Таблица 3 — Экспериментально измеренные и рассчитанные значения максимумов полос стационарных спектров поглощения археородопсина-3 дикого типа и вариантов белка с аминокислотными заменами, изученных в данной работе.

Белок	λ_{max} , эксп.	λ_{max}^G , расч.	λ_{max}^O , расч.
Arch	558	557	634
D95E/T99C	626	548	621
P60L/D95E/T99C	624	548	623
D95E/T99C/P196S	628	564	639
V59A/D95E/T99C	622	542	625
Arch-5	622	558	626

Значения λ_{max} , рассчитанные для моделей О-форм мутантных вариантов археородопсина-3 из группы Archers воспроизвели экспериментальные значения с погрешностью не превышающей 8 нм. Единственным исключением является Arch D95E/T99C/P196S, для которого рассчитанное значение λ_{max} (638 нм) отклоняется от экспериментального (628 нм) на 10 нм. Однако рассчитанное значение λ_{max} этого белка согласуется с максимумом полосы возбуждения флуоресценции белка (639 нм) и максимумом второй компоненты в разложении полосы спектра поглощения на две гауссовы функции (638 нм). Таким образом, на основании экспериментальных данных и компьютерных моделей можно сделать вывод, что для Arch D95E/T99C/P196S экспериментально наблюдается равновесие между двумя формами, для одной из которых $\lambda_{max} = 639$ нм.

Анализ компьютерных моделей показал, что структуры областей вблизи противоположных и группы освобождения протона схожи для всех мутантных вариантов с увеличенной флуоресценцией, поэтому детальный анализ был проведен только для Arch D95E/T99C (Рисунок 3.7). Согласно модели О-формы этого белка, противоположные D95 и D222 в этих белках протонированы, в области противоположных находится всего одна молекула воды. Остатки глутаминовых кислот группы освобождения протона находятся в непротонированном состоянии. E207 образует водородную связь с остатком тирозина Y93, а E214 образует водородную связь с остатком треонина T203. Наблюдаемая ориентация ами-

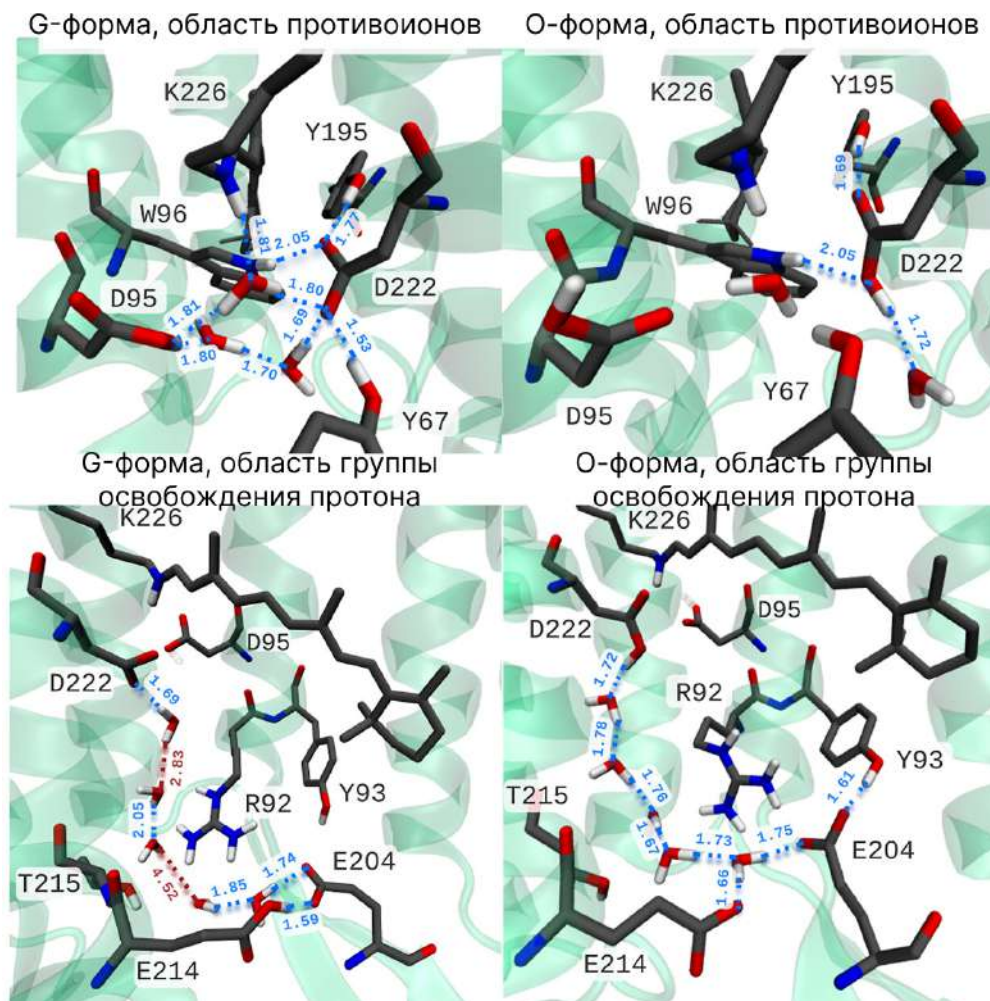


Рисунок 3.6 — Пространственные структуры археородопсина-3 в области противоионов и в области группы освобождения протона в G- и О-формах белка, полученные из соответствующих компьютерных моделей. В G-форме вблизи противоионов D95 и D222 наблюдаются три молекулы воды. Противоион D222 протонирован и образует водородные связи с Y67, Y195, W96 и двумя молекулами воды (верхняя левая панель). Остаток E214 из группы освобождения протона протонирован и образует водородную связь с E207. Положительно заряженный остаток R92 ориентирован в направлении T215 (нижняя левая панель). В О-форме вблизи противоионов наблюдается только одна молекула воды. D222 образует три водородные связи – с Y195, W96 и одной молекулой воды, расположенной вне области противоионов (верхняя правая панель). E214 находится в непротонированном состоянии, E207 образует водородную связь с Y93. Положительно заряженный остаток R92 ориентирован в сторону отрицательно заряженных E214 и E207, освобождая место для образования цепочки из молекул воды между E214 и D222 (нижняя правая панель).

нокислотных остатков и система водородных связей соответствует наблюдаемой в компьютерной модели О-формы археородопсина-3 и в кристаллографической структуре О-интермедиата бактериородопсина с аминокислотной заменой L93A. Следует отметить, что значения λ_{max} , рассчитанные для компьютерных моделей G-форм изучаемых мутантных вариантов археородопсина-3, значительно отклоняются от экспериментальных значений и близки к λ_{max} белка дикого типа. Следует предположить, что в мутантных вариантах с увеличенной интенсивностью флуоресценции наиболее стабильной формой является О-форма белка.

Изменение состояния протонирования противоиона D222 в изученных мутантных вариантах археородопсина-3 вызвано следующими изменениями. В белке дикого типа низкое значение $pK_a(D222)$ определяется образованием водородных связей с двумя молекулами воды, остатками тирозинов Y67 и Y195, остатком триптофана W96 – всего 5 водородных связей. С другой стороны, в Arch D95E/T99C наблюдается одна водородная связь с молекулами воды, ослабление водородной связи с остатком тирозина Y195, отсутствие водородной связи с остатком тирозина Y67, а также увеличение расстояния до противоиона D95, который в Arch D95E/T99C образует водородную связь с остатком цистеина C99. Таким образом, уменьшение количества водородных связей и отдаление от D95 приводит к увеличению $pK_a(D222)$. Аналогичные структурные изменения наблюдаются в остальных четырех изученных белках из класса Archers. Увеличение $pK_a(D222)$ и соответствующий его переход в протонированное состояние приводит к уменьшению $pK_a(E214)$, входящего в группу освобождения протона. Связь pK_a противоиона и pK_a остатка глутаминовой кислоты из группы освобождения протона ранее изучалась экспериментально и наличие прямой корреляции между этими двумя величинами описаны в литературе [70]. Следует отметить, что в модели О-формы археородопсина-3 дикого типа и в рассматриваемых моделях Archers наблюдается наличие цепочки из связанных водородными связями молекул воды между E214 и D222. Наблюдаемые в моделях Archers структурные изменения в области группы освобождения протона являются следствием депротонирования E214.

Экспериментальные данные, а именно результаты спектрофотометрического титрования белков, находятся в согласии с результатом анализа компьютерных моделей. Полученное экспериментально для белка дикого типа значение

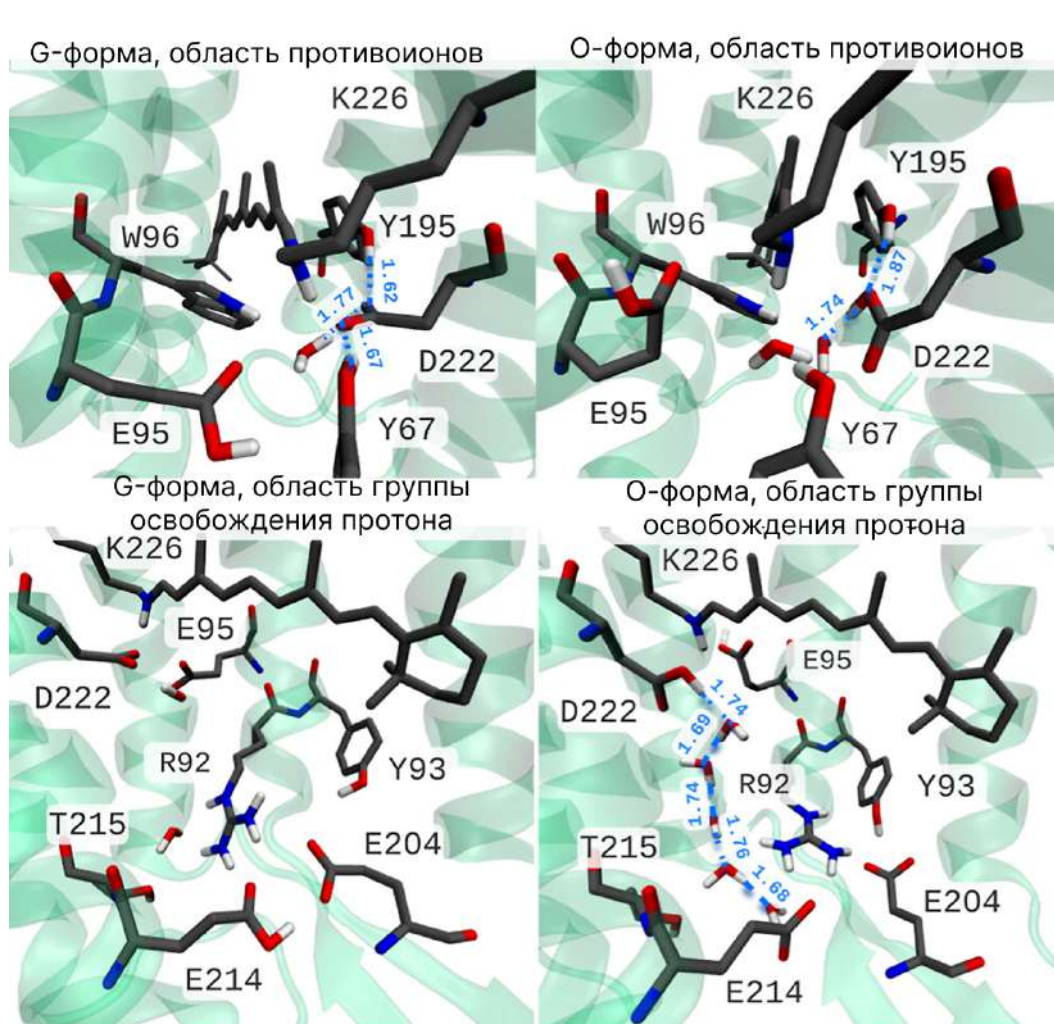


Рисунок 3.7 — Пространственные структуры Arch D95E/T99C в области противоионов и области группы освобождения протона в G- и O-формах белка, полученные из соответствующих компьютерных моделей. В G-форме вблизи противоионов E95 и D222 наблюдается только одна молекула воды. Противоион D222 непротонирован и образует водородные связи с Y67, Y195 и молекулой воды из области противоионов (верхняя левая панель). E214 из группы освобождения протона протонирована и образует водородную связь с E207. Положительно заряженный остаток R92 ориентирован в направлении T215 (нижняя левая панель). В O-форме также наблюдается только одна молекула воды вблизи противоионов. D222 образует две водородные связи – с Y195 и одной молекулой воды, расположенной вне области противоионов (верхняя правая панель). E214 непротонирована, а E207 образует водородную связь с Y93. Положительно заряженный остаток R92 ориентирован в сторону отрицательно заряженных E214 и E207, освобождая место для образования водной цепочки между E214 и D222 (нижняя правая панель).

$pK_a(D222) \sim 2.5$, что согласуется с ранее опубликованными данными [123]. С другой стороны, для всех изученных белков из группы Archers полученные значения $pK_a(D222) > 7.8$ (Таблица 4). Следует отметить, что наиболее низкое значение $pK_a(D222) = 7.8$ было найдено для белка Arch D95E/T99C/P196S, для которого наблюдается двухкомпонентная полоса спектра поглощения и синий сдвиг полосы поглощения относительно полосы возбуждения флуоресценции. Выше было выдвинуто предположение, что наблюдаемые эффекты могут быть вызваны наличием двух форм белка в равновесии. Результаты титрования показывают, что для этого белка при физиологическом значении pH должно наблюдаться равновесие между состоянием с протонированным D222, максимум полосы поглощения которого находится на 639 нм, и состоянием с D222 в непротонированном состоянии, максимум полосы поглощения которого находится приблизительно на 552 нм.

Таблица 4 — Значения pK_a противоиона D222 и остатка E214 группы освобождения протона археородопсина-3 дикого типа и изученных в работе вариантов белка с аминокислотными заменами.

Белок	$pK_a(D222)$	$pK_a(E214)$
Arch	2.5	-
D95E/T99C	8.9	-
P60L/D95E/T99C	>9	-
D95E/T99C/P196S	7.8	7.0
V59A/D95E/T99C	>9	4.5
Arch-5	9.1	-

Для прямой проверки предположения, что протонирование противоиона является необходимым условием для получения белка с увеличенной интенсивностью флуоресценции, на основании компьютерных моделей были предложены новые аминокислотные замены, которые должны приводить к повышению $pK_a(D222)$ вследствие разрыва водородных связей противоиона с окружающими остатками аминокислот и молекулами воды. Были предложены аминокислотные замены W96F и Y195F (Рисунок 3.6). Для Arch W96F увеличение флуоресценции и сдвиг максимума полосы поглощения в длинноволновую область не наблюдались. С другой стороны, для Arch Y195F наблюдалось увеличение поглощения в диапазоне длин волн >600 нм. Измеренный квантовый выход флу-

оресценции белка составил 0.23%, что значительно превышает значение квантового выхода флуоресценции белка дикого типа (0.01%). Максимум полосы спектра возбуждения флуоресценции Arch Y195F составил 639 нм (Рисунок 3.8), что согласуется со значением максимума полосы поглощения О-интермедиата бактериородопсина. Для дополнительной стабилизации О-формы состояния в Arch W96F была введена аминокислотная замена T215A. Для бактериородопсина ранее было показано, что аналогичная замена T205A приводит к увеличению времени жизни О-интермедиата в 100 раз [124]. Анализ моделей показал, что введение мутации T215A приводит к изменению ориентации остатка аргинина R92, который в белке дикого типа образует опосредованную молекулой воды водородную связь с T215. Разрыв этой связи приводит к повороту R92 в сторону остатков глутаминовых кислот из группы освобождения протона, что способствует снижению $pK_a(E214)$, характерному для О-формы. При этом поворот R92 приводит к возникновению свободного пространства для образования цепочки из молекул воды между D222 и E214. Для Arch W96F/T215A была получена сложная полоса поглощения, состоящая из двух компонент, по-видимому соответствующих О-форме и G-форме белка (Рисунок 3.9а). Белок характеризуется квантовым выходом флуоресценции 0.25%, что значительно превышает значение квантового выхода флуоресценции белка дикого типа (0.01%) (Рисунок 3.9б). Таким образом, полученные данные демонстрируют, что нейтрализация зарядов в окружении $C=NH^+$ группы хромофора, которая достигается в белках из группы Archers путем протонирования противоионного комплекса, состоящего из аминокислотных остатков D95 и D222, является необходимым фактором для увеличения флуоресценции в микробных родопсинах.

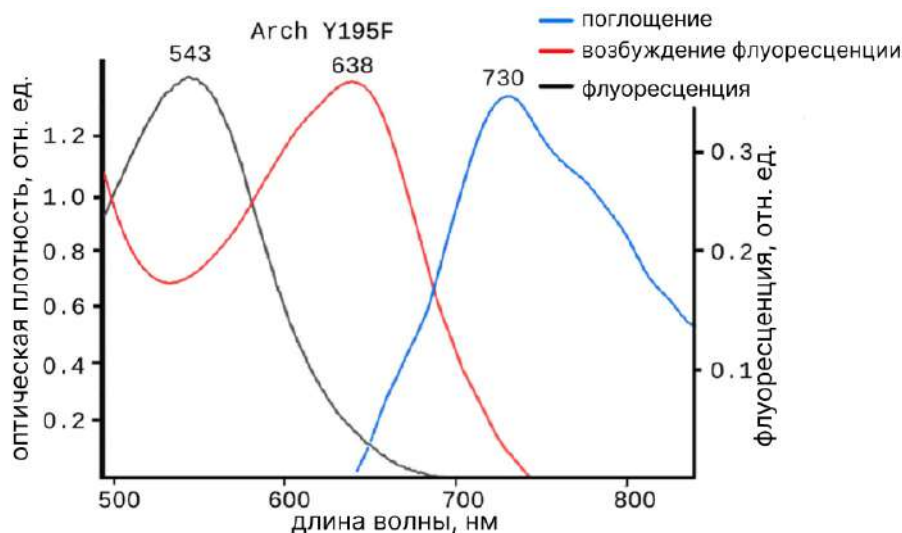


Рисунок 3.8 — Спектры поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции Arch Y195F. Измерения проводились для очищенных образцов белков, растворенных в буфере (10 мМ Tris, 200 мМ NaCl, 0,15% DM, pH=6.5). Спектр возбуждения флуоресценции были получены при регистрации флуоресценции на 740 нм. Спектры флуоресценции были получены при возбуждении на 630 нм.

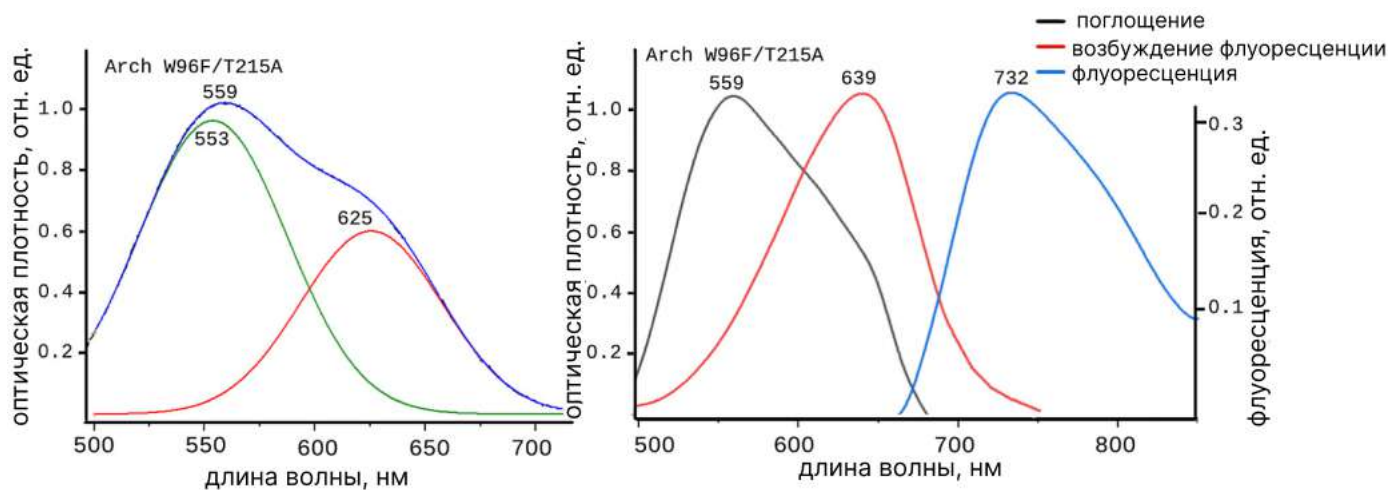


Рисунок 3.9 — а) Спектр поглощения Arch W96F/T215A. б) Спектры поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции Arch W96F/T215A. Измерения проводились для очищенных образцов белков, растворенных в буфере (10 мМ Tris, 200 мМ NaCl, 0,15% DM, pH=6.5). Спектр возбуждения флуоресценции были получены при регистрации флуоресценции на 740 нм. Спектры флуоресценции были получены при возбуждении на 630 нм.

Глава 4. Разработка методом направленного дизайна новых флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3 с увеличенной яркостью флуоресцентного сигнала

В данной главе описаны результаты направленного дизайна новых флуоресцентных сенсоров мембранного потенциала, мутантных вариантов археородопсина-3 из группы Archers, с увеличенным квантовым выходом флуоресценции и максимумами полос поглощения в диапазоне 638-643 нм.

4.1 Структурная характеристика, определяющая чувствительность флуоресценции к изменениям мембранного потенциала в археородопсине-3 и его вариантах с аминокислотными заменами

Описанные в Главе 3 результаты показывают, что внесение в белок дикого типа аминокислотных замен Y195F и W96F/T215A приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции белка. На клетках *E. coli* была проверена потенциал-зависимость флуоресценции полученных белков. Для Arch Y195F и Arch W96F/T215A не наблюдалось заметного увеличения интегральной флуоресценции, регистрируемой от экспрессирующих белок клеток *E. coli*, после их гибели от действия азида натрия, что говорит об отсутствии потенциал-зависимости флуоресценции или слабой чувствительности флуоресценции к изменениям потенциала. С другой стороны, для белков из группы Archers наблюдалось значительное увеличение флуоресценции после гибели клеток.

Чтобы определить структурную характеристику белка, значение которой регулирует чувствительность флуоресценции к изменению потенциала в археородопсине-3 и его вариантах с аминокислотными заменами, в данной работе были измерены значения pKa хромофора изученных белков, протонированного основания Шиффа. Показано, что для всех белков из группы Archers значения pKa основания Шиффа (pKa(ОШ)) оказались близки к физиологическому значению pH, в то время как для Arch Y195F и Arch W96F/T215A значения pKa(ОШ) значительно выше (Таблица 5). График, на котором по оси ординат

отложены известные из литературных данных значения чувствительности флуоресценции к изменениям мембранного потенциала, оцениваемой как относительное изменение интенсивности флуоресценции при увеличении потенциала на 100 мВ, а по оси абсцисс отложены значения $pK_a(\text{ОШ})$, выявляет увеличение чувствительности при приближении $pK_a(\text{ОШ})$ к физиологическому значению $pH=7.4$ (Рисунок 4.1). Таким образом, потенциал-чувствительность флуоресценции может быть связана с равновесием между формами с протонированным и непротонированным хромофором.

Таблица 5 — Значения pK_a основания Шиффа ($pK_a(\text{ОШ})$) и наличие зарегистрированного изменения интенсивности флуоресценции после изменения мембранного потенциала экспрессирующих белок клеток *E. coli* от начального значения до 0 мВ ($dF/dV \neq 0$), для археородопсина-3 дикого типа и изученных в работе вариантов белка с аминокислотными заменами.

Белок	$pK_a(\text{ОШ})$	$dF/dV \neq 0$
D95E/T99C	7.5	Да
P60L/D95E/T99C	7.7	Да
D95E/T99C/P196S	7.4	Да
V59A/D95E/T99C	7.9	Да
Arch-5	7.6	Да
Y196F	>10	Нет
W96F/T215A	9.4	Нет

4.2 Результаты направленного дизайна.

Результаты, приведенные в Главах 3 и 4.1, показали, что при направленном дизайне новых флуоресцентных сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3 необходимо учитывать два фактора – отсутствие отрицательно заряженных остатков аминокислот вблизи $C=NH^+$ группы хромофора и близость pK_a основания Шиффа к физиологическому значению pH . Так как изучение механизма, определяющего pK_a основания Шиффа, выходило за рамки данного диссертационного исследования, в работе был проведен направленный

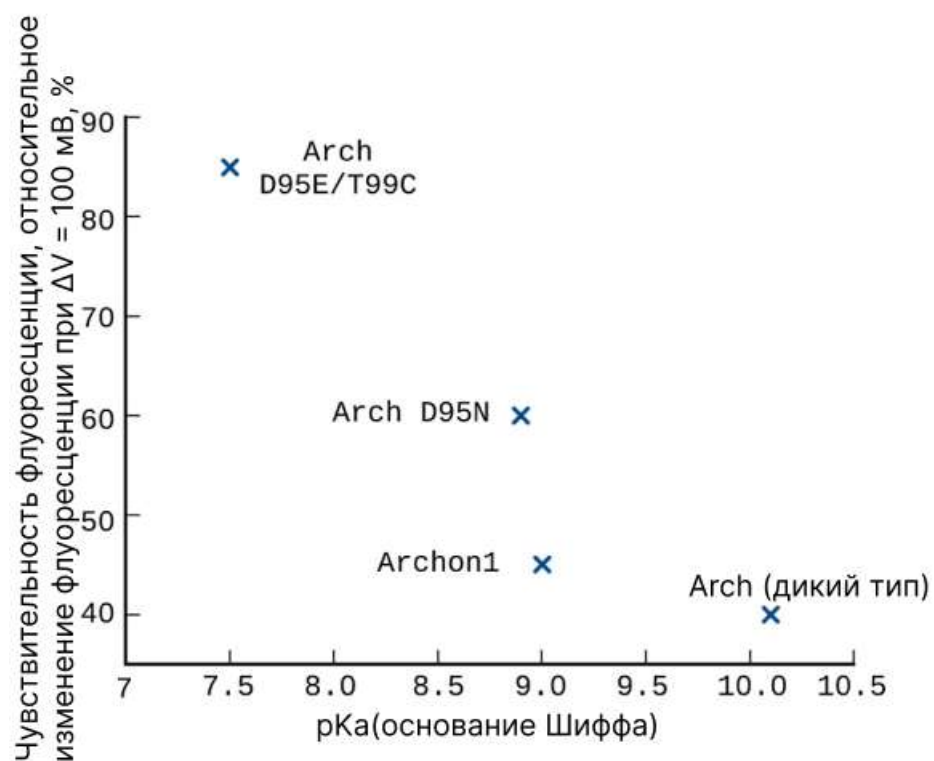


Рисунок 4.1 — Зависимость чувствительности флуоресценции сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3 к потенциалу, определяемой как процентное изменение интенсивности флуоресценции при изменении потенциала на 100 мВ, от pKa основания Шиффа.

ный дизайн новых белков из группы Archers с сохранением аминокислотных замен D95E/T99C, обеспечивающих стабилизацию формы белка с протонированным противоионом и необходимое значение pK_a основания Шиффа.

Анализ литературных данных, приведенный в Главе 1.3, показал, что для микробных родопсинов наблюдается рост квантовых выходов флуоресценции со сдвигом максимума полосы поглощения в длинноволновую область. Согласно этой корреляции, введение аминокислотных замен, приводящих к красному сдвигу спектра поглощения, должно приводить к увеличению квантового выхода флуоресценции. Согласно литературным данным и результатам проведенных в рамках диссертационной работы исследований, внесение полярных аминокислот в область вблизи бета-иононового кольца хромофора приводит к сдвигу спектра поглощения микробных родопсинов в длинноволновую область [21; 51; 101; 125]. Этот принцип введения полярных аминокислот в область вблизи бета-иононового кольца был использован нами при проведении направленного дизайна.

Было выбрано 9 сайтов для введения полярных аминокислот, находящихся вблизи бета-иононового кольца хромофора. Так как количество возможных комбинаций полярных аминокислот на найденных 9 позициях слишком велико, был проведен предварительный анализ баз данных аминокислотных последовательностей родопсинов из бактерий, архей и грибов. Были найдены комбинации полярных аминокислот на указанных девяти позициях, встречающиеся в природных родопсинах. Для найденных комбинаций был проведен компьютерный скрининг, и в результате был предложен конечный набор комбинаций аминокислотных замен, которые были введены в белки Archer1 (D95E/T99C) и Archer2 – археородопсин-3 с аминокислотными заменами D95E/T99C/A225M, который характеризуется максимумом полосы поглощения на 633 нм. Все белки были синтезированы, их стационарные спектры поглощения и квантовые выходы флуоресценции были измерены экспериментально, результаты представлены на Рисунке 4.2. В результате были получены белки, значения максимумов полос поглощения которых достигают 643 нм, а значения квантовых выходов флуоресценции достигают 1.18% (Таблица 6). Для полученных вариантов археородопсина-3 наблюдается тенденция увеличения квантового выхода флуоресценции со смещением максимума поглощения в длинноволновую область ($R^2 = 0.48$, Рисунок 4.2). Разложение полос спектров поглощения белков на две гаус-

совы функции показало, что для всех белков наблюдается равновесие между О-формой с протонированным противоионом с максимумом поглощения >620 нм и G-формой белка с непротонированным противоионом и максимумом поглощения <580 нм. Наличие этой смеси обуславливает сдвиг максимумов спектров поглощения в синюю область относительно максимумов полос соответствующих О-форм (Таблица 6). Следует отметить, что тенденция к увеличению квантового выхода флуоресценции при увеличении максимума полосы поглощения сохраняется для максимумов полос О-форм, при этом коэффициент детерминации для этой зависимости больше 0.5 ($R^2 = 0.62$, Рисунок 4.2).

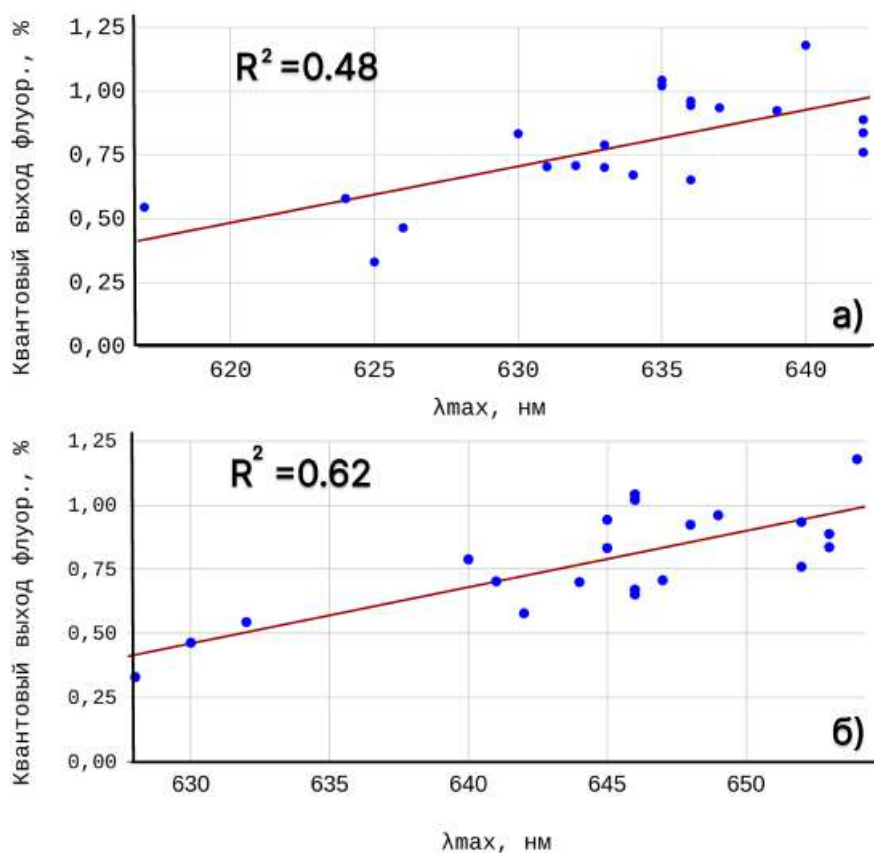


Рисунок 4.2 — а) Корреляция между квантовыми выходами флуоресценции и максимумами спектров поглощения изученных мутантных вариантов археородопсина. б) Корреляция между квантовыми выходами флуоресценции и длинами волн максимумов соответствующих О-формам полос в разложении спектров поглощения изученных мутантных вариантов археородопсина.

Следует отметить, что подобная дестабилизация О-формы ранее наблюдалась нами в белке Arch D95E/T99C/P196S, для которого полоса поглощения состояла из двух компонент и раскладывалась на две гауссовы функции с максимумами на 552 нм и 639 нм, которые соответствуют формам с непро-

Таблица 6 — Максимумы полос поглощения (λ_{max}), максимумы полос поглощения О-форм белка, полученные из разложения спектров поглощения на две гауссовы функции (λ_{max} [O]), квантовые выходы флуоресценции (Φ) Archer2 и предложенных в работе мутантных вариантов археородопсина-3 из группы Archers с наилучшими характеристиками.

Белок	λ_{max} , нм	λ_{max} [O], нм	Φ , %	pKa(ОШ)
Archer2	633	643	0.66	8.1
Archer2 + T215A	640	648	0.77	7.5
Archer1 + P196S/T215A	638	640	0.97	7.4
Archer2 + F218Y	642	653	0.89	7.8
Archer2 + P196S	640	654	1.18	7.3
Archer2 + P196S/F218Y	643	654	0.76	8.0

тонированным и протонированным противоионом, соответственно. В рамках исследования нами была проведена дополнительная стабилизация О-формы в этом белке. Для этого в белок вносилась аминокислотная замена T215A, которая ранее позволила стабилизировать О-форму в Arch W96F, как описано в Главе 3. Белок Arch D95E/T99C/P196S/T215A был синтезирован и его характеристики были изучены экспериментально. В согласии с гипотезой о стабилизации О-формы после внесения аминокислотной замены T215A, для полученного белка наблюдался $\lambda_{max} = 638$ нм и близкое значение максимума полосы возбуждения флуоресценции ($\lambda_{exc} = 640$ нм). Квантовый выход флуоресценции белка, измеренный при возбуждении на длине волны максимума полосы поглощения, увеличился с 0.56% до 0.97% после введения замены T215A (Рисунок 4.3а). Важно отметить, что полученный белок сохранил потенциал-зависимость сигнала флуоресценции, и было также показано, что его значение $pKa(ОШ) = 7.4$ находится в области, характерной для высокой чувствительности флуоресценции к изменениям потенциала.

Для дополнительной проверки найденного подхода к направленному дизайну сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3 путем стабилизации О-формы белка был изучен Arch D95E/T99C/A225M (Archer2) с

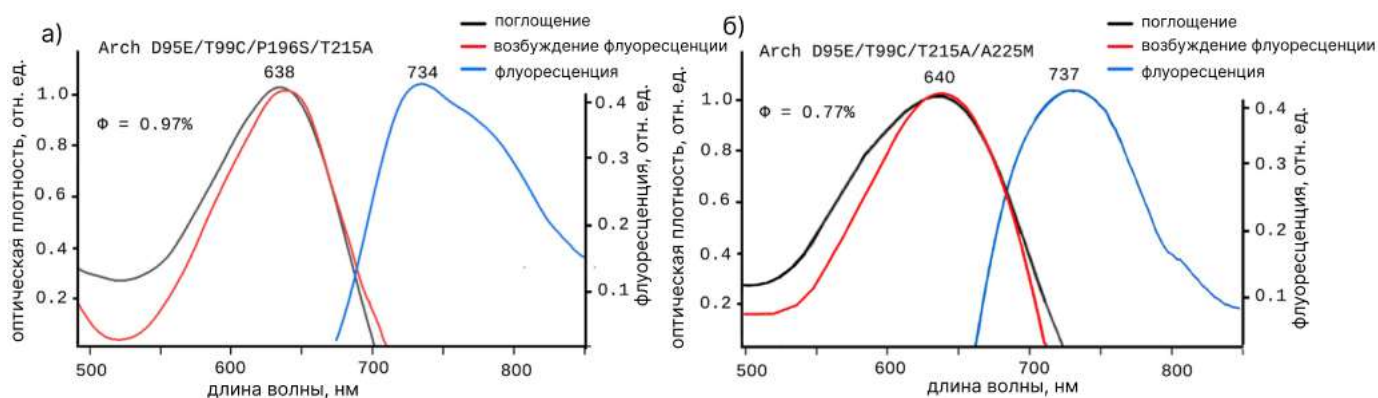


Рисунок 4.3 — Спектры поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции новых белков – Arch D95E/T99C/P196S/T215A (а) и Arch D95E/T99C/T215A/A225M (б). Измерения проводились для очищенных образцов белков, растворенных в буфере (10 мМ Tris, 200 мМ NaCl, 0,15% DM, pH=6.5). Спектры возбуждения флуоресценции были получены при регистрации флуоресценции на 740 нм. Спектры флуоресценции были получены при возбуждении на 630 нм.

$\lambda_{max} = 633$ нм. Полоса поглощения этого белка может быть разложена на две гауссовы функции с максимумами на 573 нм и 649 нм, которые могут быть отнесены к состояниям белка с непротонированным и протонированным противоионом, соответственно. Рассчитанное значение максимума полосы поглощения для модели О-формы белка составляет 643 нм. По-видимому, замена A225M приводит к красному сдвигу максимума полосы поглощения относительно белка D95E/T99C, но также дестабилизирует О-форму. Анализ компьютерной модели показал, что замена аланина, расположенного над группой C13-Ме хромофора, более объемным метионином, оказывает не прямое влияние на максимум полосы поглощения. А именно, наблюдалось три эффекта: 1) деформация хромофора, величина двугранного угла C15–C14–C13–C12 увеличилась от 172° до 165°; 2) увеличение расстояния между противоионами D95 и D222 и NH-группой хромофора; 3) замена молекулы воды, которая расположена над группой C13-Ме хромофора в D95E/T99C, боковой цепочкой M225.

Введение в Archer2 мутации T215A для стабилизации О-формы белка привело к сдвигу λ_{max} с 634 нм до 640 нм (Рисунок 4.3б). Для Arch D95E/T99C/T215A/A225M наблюдалось увеличение квантового выхода флуоресценции при возбуждении на длине волны максимума полосы поглощения относительно белка без мутации T215A – от 0.66% до 0.77%. Также было под-

тверждено, что зависимость флуоресценции от мембранного потенциала сохраняется для полученного белка, и показано, что для него значение $pK_a(\text{ОШ})=7.5$ находится в области, характерной для высокой чувствительности к мембранному потенциалу.

Чтобы выполнить дополнительную оценку чувствительности флуоресценции к изменению мембранного потенциала для новых мутантных Arch, для каждого белка была проведена оценка увеличения интегральной флуоресценции от клеток *E. coli*, экспрессирующих белок, после действия азиды натрия, приводящего к гибели клеток и изменению их мембранного потенциала от начального значения до 0 мВ. Для белка Arch D95E/T99C имеются литературные данные о чувствительности флуоресценции к изменениям потенциала – процентное изменение интенсивности флуоресценции при изменении напряжения на 100 мВ составляет 85% ($pH = 7.4$). В данной работе было обнаружено, что для некоторых из новых белков – Arch D95E/T99C/T215A/A225M, D95E/T99C/P196S/T215A, Arch D95E/T99C/F218Y/A225M, Arch D95E/T99C/P196S/A225M – чувствительность может быть выше, чем для Arch D95E/T99C.

Таким образом, в рамках работы был проведен направленный дизайн новых сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3. Полученные белки характеризуются квантовыми выходами флуоресценции, которые превышают или сопоставимы с квантовыми выходами наиболее ярких опубликованных вариантов сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3. Максимумы полос поглощения новых белков находятся ближе всего к области оптической прозрачности биологических тканей по сравнению со всеми опубликованными флуоресцентными генетически кодируемыми сенсорами мембранного потенциала на основе археородопсина-3. Предложенные сенсоры и сформулированные принципы дизайна новых флуоресцентных сенсоров мембранного потенциала на основе археородопсина-3 могут быть использованы в дальнейших исследованиях по направленному дизайну новых сенсоров мембранного потенциала на основе микробных родопсинов.

Заключение

Основные результаты работы заключаются в следующем.

1. Разработаны усовершенствованные компьютерные модели для получения пространственной структуры и расчета спектральных свойств родопсинов на основе аминокислотной последовательности. В частности, разработана и представлена в виде программного кода новая адаптация метода построения квантово-механических / молекулярно-механических моделей белка, в которых аминокислотное окружение описываемого методами квантовой механики кофактора строится с учетом усреднения по существующим в термодинамическом равновесии конфигурациям.
2. Получено доказательство, что достаточным условием для получения мутантных вариантов микробных родопсинов, обладающих увеличенной яркостью флуоресцентного сигнала, является стабилизация формы белка с отсутствием заряженных аминокислотных остатков вблизи основания Шиффа ретиналя. Доказательство, что в белках из группы Archers введенные аминокислотные замены приводят к стабилизации формы белка с протонированным противоионом D222, что вызывает значительное увеличение флуоресценции Archers по сравнению с белком дикого типа.
3. Получены новые мутантные варианты археородопсина-3, обладающие увеличенной яркостью флуоресцентного сигнала по сравнению с известными вариантами флуоресцентных генетически кодируемых сенсоров мембранного потенциала из группы Archers. Интенсивность флуоресценции белков зависит от величины клеточного мембранного потенциала. Максимумы полос поглощения новых белков находятся ближе всего к окну оптической прозрачности биологических тканей по сравнению со всеми опубликованными к моменту проведения диссертационного исследования флуоресцентными генетически кодируемыми сенсорами мембранного потенциала на основе археородопсина-3.

Список литературы

1. *Xu Y., Zou P., Cohen A. E.* Voltage imaging with genetically encoded indicators // *Curr. Opin. Chem. Biol.* — 2017. — Т. 39. — С. 1—10.
2. *Binggeli R., Weinstein R. C.* Membrane potentials and sodium channels: hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions // *Journal of theoretical biology.* — 1986. — Т. 123, № 4. — С. 377—401.
3. *Yang M., Brackenbury W. J.* Membrane potential and cancer progression // *Frontiers in physiology.* — 2013. — Т. 4. — С. 185.
4. *Abdul Kadir L., Stacey M., Barrett-Jolley R.* Emerging roles of the membrane potential: action beyond the action potential // *Frontiers in physiology.* — 2018. — С. 1661.
5. Single action potentials and subthreshold electrical events imaged in neurons with a fluorescent protein voltage probe / L. Jin [и др.] // *Neuron.* — 2012. — Т. 75, № 5. — С. 779—785.
6. *Gong Y., Li J. Z., Schnitzer M. J.* Enhanced archaerhodopsin fluorescent protein voltage indicators // *PLoS One.* — 2013. — Т. 8, № 6. — e66959.
7. A bright and fast red fluorescent protein voltage indicator that reports neuronal activity in organotypic brain slices / A. S. Abdelfattah [и др.] // *Journal of Neuroscience.* — 2016. — Т. 36, № 8. — С. 2458—2472.
8. In vivo imaging of the coupling between neuronal and CREB activity in the mouse brain / T. Laviv [и др.] // *Neuron.* — 2020. — Т. 105, № 5. — С. 799—812.
9. Video-based pooled screening yields improved far-red genetically encoded voltage indicators / H. Tian [и др.] // *Nat. Methods.* — 2023. — Т. 20, № 7. — С. 1082—1094.
10. *Piatkevich K. D., Boyden E. S.* Optogenetic Control of Neural Activity: the Biophysics of Microbial rhodopsins in Neuroscience // *Q. Rev. Biophys.* — 2023. — С. 1—81.

11. *Yang H. H., St-Pierre F.* Genetically encoded voltage indicators: opportunities and challenges // *Journal of Neuroscience*. — 2016. — Т. 36, № 39. — С. 9977—9989.
12. Electrical spiking in *Escherichia coli* probed with a fluorescent voltage-indicating protein / J. M. Kralj [и др.] // *Science*. — 2011. — Т. 333, № 6040. — С. 345—348.
13. All-optical electrophysiology in mammalian neurons using engineered microbial rhodopsins / D. R. Hochbaum [и др.] // *Nat. Methods*. — 2014. — Т. 11, № 8. — С. 825—833.
14. Directed evolution of a far-red fluorescent rhodopsin / R. S. McIsaac [и др.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2014. — Т. 111, № 36. — С. 13034—13039.
15. Photoactivated voltage imaging in tissue with an archaerhodopsin-derived reporter / M.-P. Chien [и др.] // *Sci. Adv.* — 2021. — Т. 7, № 19. — eabe3216.
16. Optical recording of action potentials in mammalian neurons using a microbial rhodopsin / J. M. Kralj [и др.] // *Nat. Methods*. — 2012. — Т. 9, № 1. — С. 90—95.
17. Comparative studies of the fluorescence properties of microbial rhodopsins: spontaneous emission versus photointermediate fluorescence / K. Kojima [и др.] // *J. Phys. Chem. B*. — 2020. — Т. 124, № 34. — С. 7361—7367.
18. A robotic multidimensional directed evolution approach applied to fluorescent voltage reporters / K. D. Piatkevich [и др.] // *Nat. Chem. Biol.* — 2018. — Т. 14, № 4. — С. 352—360.
19. Rational Design of Far-Red Archaerhodopsin-3-Based Fluorescent Genetically Encoded Voltage Indicators: from Elucidation of the Fluorescence Mechanism in Archers to Novel Red-Shifted Variants / D. M. Nikolaev [и др.] // *ACS Phys. Chem. Au*. — 2024. — Т. 4, № 4. — С. 347—362.
20. An assessment of water placement algorithms in quantum mechanics/molecular mechanics modeling: The case of rhodopsins' first spectral absorption band maxima / D. M. Nikolaev [и др.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2020. — Т. 22, № 32. — С. 18114—18123.

21. Simple models to study spectral properties of microbial and animal rhodopsins: evaluation of the electrostatic effect of charged and polar residues on the first absorption band maxima / A. A. Shtyrov [и др.] // Int. J. Mol. Sci. — 2021. — Т. 22, № 6. — С. 3029.
22. Free Energy Computation for an Isomerizing Chromophore in a Molecular Cavity via the Average Solvent Electrostatic Configuration Model: Applications in Rhodopsin and Rhodopsin-Mimicking Systems / D. M. Nikolaev [и др.] // J. Chem. Theory Comput. — 2021. — Т. 17, № 9. — С. 5885—5895.
23. Fluorescence of the retinal chromophore in microbial and animal rhodopsins / D. M. Nikolaev [и др.] // Int. J. Mol. Sci. — 2023. — Т. 24, № 24. — С. 17269.
24. Fluorescence Imaging of Cell Membrane Potential: From Relative Changes to Absolute Values / D. M. Nikolaev [и др.] // Int. J. Mol. Sci. — 2023. — Т. 24, № 3. — С. 2435.
25. Voltage-and space-clamp errors associated with the measurement of electrotonically remote synaptic events / N. Spruston [и др.] // Journal of neurophysiology. — 1993. — Т. 70, № 2. — С. 781—802.
26. *Spira M. E., Hai A.* Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology // Nature nanotechnology. — 2013. — Т. 8, № 2. — С. 83—94.
27. *Scanziani M., Häusser M.* Electrophysiology in the age of light // Nature. — 2009. — Т. 461, № 7266. — С. 930—939.
28. *Miller E. W.* Small molecule fluorescent voltage indicators for studying membrane potential // Current Opinion in Chemical Biology. — 2016. — Т. 33. — С. 74—80.
29. *Loew L. M.* Design and use of organic voltage sensitive dyes // Membrane Potential Imaging in the Nervous System and Heart. — 2015. — С. 27—53.
30. *Kuhn B., Roome C. J.* Primer to voltage imaging with ANNINE dyes and two-photon microscopy // Frontiers in Cellular Neuroscience. — 2019. — Т. 13. — С. 321.
31. *Lin M. Z., Schnitzer M. J.* Genetically encoded indicators of neuronal activity // Nat. Neurosci. — 2016. — Т. 19, № 9. — С. 1142—1153.

32. High-fidelity optical reporting of neuronal electrical activity with an ultrafast fluorescent voltage sensor / F. St-Pierre [и др.] // *Nature neuroscience*. — 2014. — Т. 17, № 6. — С. 884—889.
33. A fast and responsive voltage indicator with enhanced sensitivity for unitary synaptic events / Y. A. Hao [и др.] // *Neuron*. — 2024. — Т. 112, № 22. — С. 3680—3696.
34. Improving membrane voltage measurements using FRET with new fluorescent proteins / H. Tsutsui [и др.] // *Nature methods*. — 2008. — Т. 5, № 8. — С. 683—685.
35. High-speed recording of neural spikes in awake mice and flies with a fluorescent voltage sensor / Y. Gong [и др.] // *Science*. — 2015. — Т. 350, № 6266. — С. 1361—1366.
36. *St-Pierre F., Chavarha M., Lin M. Z.* Designs and sensing mechanisms of genetically encoded fluorescent voltage indicators // *Current opinion in chemical biology*. — 2015. — Т. 27. — С. 31—38.
37. Comparative evaluation of genetically encoded voltage indicators / Y. Bando [и др.] // *Cell reports*. — 2019. — Т. 26, № 3. — С. 802—813.
38. Mechanism of voltage-sensitive fluorescence in a microbial rhodopsin / D. Maclaurin [и др.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2013. — Т. 110, № 15. — С. 5939—5944.
39. Microbial and animal rhodopsins: structures, functions, and molecular mechanisms / O. P. Ernst [и др.] // *Chem. Rev.* — 2014. — Т. 114, № 1. — С. 126—163.
40. Microbial rhodopsins: diversity, mechanisms, and optogenetic applications / E. G. Govorunova [и др.] // *Annual review of biochemistry*. — 2017. — Т. 86. — С. 845.
41. *Grip W. J. de, Ganapathy S.* Rhodopsins: an excitingly versatile protein species for research, development and creative engineering // *Front. Chem.* — 2022. — Т. 10. — С. 879609.
42. *Inoue K.* Diversity, mechanism, and optogenetic application of light-driven ion pump rhodopsins // *Optogenetics: Light-Sensing Proteins and Their Applications in Neuroscience and Beyond*. — 2021. — С. 89—126.

43. Microbial rhodopsins: the last two decades / A. Rozenberg [и др.] // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2021. — Т. 75. — С. 427—447.
44. Similarities and Differences in Photochemistry of Type I and Type II Rhodopsins / M. A. Ostrovsky [и др.] // *Biochemistry.* — 2023. — Т. 88, № 10. — С. 1528—1543.
45. *Inoue K.* Photochemistry of the Retinal Chromophore in Microbial Rhodopsins // *J. Phys. Chem. B.* — 2023.
46. NeoR, a near-infrared absorbing rhodopsin / M. Broser [и др.] // *Nat. Commun.* — 2020. — Т. 11, № 1. — С. 5682.
47. *Lanyi J. K.* Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics.* — 2006. — Т. 1757, № 8. — С. 1012—1018.
48. Voltage Imaging with Engineered Proton-Pumping Rhodopsins: Insights from the Proton Transfer Pathway / X. Meng [и др.] // *ACS Phys. Chem. Au.* — 2023. — Т. 3, № 4. — С. 320—333.
49. O to bR transition in bacteriorhodopsin occurs through a proton hole mechanism / D. Maag [и др.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2021. — Т. 118, № 39. — e2024803118.
50. Conformational changes in the archaerhodopsin-3 proton pump: detection of conserved strongly hydrogen bonded water networks / E. C. S. Clair [и др.] // *J. Biol. Phys.* — 2012. — Т. 38, № 1. — С. 153—168.
51. Directed evolution of *Gloeobacter violaceus* rhodopsin spectral properties / M. K. Engqvist [и др.] // *J. Mol. Biol.* — 2015. — Т. 427, № 1. — С. 205—220.
52. Archaerhodopsin variants with enhanced voltage-sensitive fluorescence in mammalian and *Caenorhabditis elegans* neurons / N. C. Flytzanis [и др.] // *Nat. Commun.* — 2014. — Т. 5, № 1. — С. 1—9.
53. Voltage imaging and optogenetics reveal behaviour-dependent changes in hippocampal dynamics / Y. Adam [и др.] // *Nature.* — 2019. — Т. 569, № 7756. — С. 413—417.
54. QuasAr Odyssey: the origin of fluorescence and its voltage sensitivity in microbial rhodopsins / A. Silapetere [и др.] // *Nat. Commun.* — 2022. — Т. 13, № 1. — С. 5501.

55. *Fujimoto K. J.* Electronic Couplings and Electrostatic Interactions Behind the Light Absorption of Retinal Proteins // *Front. Mol. Biosci.* — 2021. — T. 8. — C. 752700.
56. *Tsujimura M., Ishikita H.* Insights into the protein functions and absorption wavelengths of microbial rhodopsins // *J. Phys. Chem. B.* — 2020. — T. 124, № 52. — C. 11819—11826.
57. *Ryazantsev M. N., Altun A., Morokuma K.* Color tuning in rhodopsins: the origin of the spectral shift between the chloride-bound and anion-free forms of halorhodopsin // *J. Am. Chem. Soc.* — 2012. — T. 134, № 12. — C. 5520—5523.
58. Ultrafast protein dynamics of bacteriorhodopsin probed by photon echo and transient absorption spectroscopy / J. T. Kennis [и др.] // *J. Phys. Chem. B.* — 2002. — T. 106, № 23. — C. 6067—6080.
59. *Song L., El-Sayed M., Lanyi J.* Protein catalysis of the retinal subpicosecond photoisomerization in the primary process of bacteriorhodopsin photosynthesis // *Science.* — 1993. — T. 261, № 5123. — C. 891—894.
60. Picosecond and nanosecond spectroscopies of the photochemical cycles of acidified bacteriorhodopsin / H. Ohtani [и др.] // *Biochemistry.* — 1986. — T. 25, № 11. — C. 3356—3363.
61. Primary reactions of sensory rhodopsins / I. Lutz [и др.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2001. — T. 98, № 3. — C. 962—967.
62. Estimated acid dissociation constants of the Schiff base, Asp-85, and Arg-82 during the bacteriorhodopsin photocycle / L. Brown [и др.] // *Biophys. J.* — 1993. — T. 65, № 1. — C. 124—130.
63. A unified view on varied ultrafast dynamics of the primary process in microbial rhodopsins / C.-F. Chang [и др.] // *Angew. Chem.* — 2022. — T. 134, № 2. — e202111930.
64. Reconstitution of *Gloeobacter violaceus* rhodopsin with a light-harvesting carotenoid antenna / E. S. Imasheva [и др.] // *Biochemistry.* — 2009. — T. 48, № 46. — C. 10948—10955.

65. Excitation energy-transfer and the relative orientation of retinal and carotenoid in xanthorhodopsin / S. P. Balashov [и др.] // *Biophys. J.* — 2008. — Т. 95, № 5. — С. 2402—2414.
66. Aspartate–Histidine interaction in the retinal Schiff base counterion of the light-driven proton pump of *Exiguobacterium sibiricum* / S. Balashov [и др.] // *Biochemistry.* — 2012. — Т. 51, № 29. — С. 5748—5762.
67. Acid–base equilibrium of the chromophore counterion results in distinct photoisomerization reactivity in the primary event of proteorhodopsin / C.-F. Chang [и др.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2019. — Т. 21, № 46. — С. 25728—25734.
68. pH-dependent photoisomerization of retinal in proteorhodopsin / R. Huber [и др.] // *Biochemistry.* — 2005. — Т. 44, № 6. — С. 1800—1806.
69. Origin of the reactive and nonreactive excited states in the primary reaction of rhodopsins: pH dependence of femtosecond absorption of light-driven sodium ion pump rhodopsin KR2 / S. Tahara [и др.] // *J. Phys. Chem. B.* — 2018. — Т. 122, № 18. — С. 4784—4792.
70. Titration of aspartate-85 in bacteriorhodopsin: what it says about chromophore isomerization and proton release / S. P. Balashov [и др.] // *Biophys. J.* — 1996. — Т. 70, № 1. — С. 473—481.
71. Picosecond-millisecond dual-time-base spectroscopy of fluorescent photointermediates formed in the purple membrane of *Halobacterium halobium* / H. Ohtani [и др.] // *Chem. Phys. Lett.* — 1999. — Т. 299, № 6. — С. 571—575.
72. Femtosecond spectroscopy of acidified and neutral bacteriorhodopsin / T. Kobayashi [и др.] // *Laser Applications in Life Sciences.* Т. 1403. — SPIE. 1991. — С. 407—416.
73. Picosecond fluorescence spectroscopy of the purple membrane of *Halobacterium halobium* in alkaline suspension / N. Kamiya [и др.] // *Chem. Phys. Lett.* — 1997. — Т. 265, № 6. — С. 595—599.
74. Directed evolution: methodologies and applications / Y. Wang [и др.] // *Chem. Rev.* — 2021. — Т. 121, № 20. — С. 12384—12444.

75. *Arnold F. H.* Directed evolution: bringing new chemistry to life // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2018. — Т. 57, № 16. — С. 4143–4148.
76. Structures of the archaerhodopsin-3 transporter reveal that disordering of internal water networks underpins receptor sensitization / J. F. B. Juarez [и др.] // *Nat. Commun.* — 2021. — Т. 12, № 1. — С. 1–10.
77. X-ray structure analysis of bacteriorhodopsin at 1.3 Å resolution / N. Hasegawa [и др.] // *Sci. Rep.* — 2018. — Т. 8, № 1. — С. 13123.
78. Crystal structure of the O intermediate of the Leu93 - Ala mutant of bacteriorhodopsin / J. Zhang [и др.] // *Proteins.* — 2012. — Т. 80, № 10. — С. 2384–2396.
79. *Muhammed M. T., Aki-Yalcin E.* Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives // *Chemical biology & drug design.* — 2019. — Т. 93, № 1. — С. 12–20.
80. *Kelm S., Shi J., Deane C. M.* MEDELLER: homology-based coordinate generation for membrane proteins // *Bioinformatics.* — 2010. — Т. 26, № 22. — С. 2833–2840.
81. *Yang J., Zhang Y.* Protein structure and function prediction using I-TASSER // *Curr. Protoc.* — 2015. — Т. 52, № 1. — С. 5–8.
82. ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules / A. Leaver-Fay [и др.] // *Methods in enzymology.* Т. 487. — Elsevier, 2011. — С. 545–574.
83. *Hill J. R., Deane C. M.* MP-T: improving membrane protein alignment for structure prediction // *Bioinformatics.* — 2013. — Т. 29, № 1. — С. 54–61.
84. AlignMe—a membrane protein sequence alignment web server / M. Stamm [и др.] // *Nucleic Acids Res.* — 2014. — Т. 42, W1. — W246–W251.
85. *Wu S., Zhang Y.* MUSTER: improving protein sequence profile–profile alignments by using multiple sources of structure information // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* — 2008. — Т. 72, № 2. — С. 547–556.
86. A comparative study of modern homology modeling algorithms for rhodopsin structure prediction / D. M. Nikolaev [и др.] // *ACS omega.* — 2018. — Т. 3, № 7. — С. 7555–7566.

87. *Bianco V., Iskrov S., Franzese G.* Understanding the role of hydrogen bonds in water dynamics and protein stability // *Journal of Biological Physics*. — 2012. — T. 38. — C. 27–48.
88. The roles of water in the protein matrix: a largely untapped resource for drug discovery / F. Spyrakis [и др.] // *Journal of medicinal chemistry*. — 2017. — T. 60, № 16. — C. 6781–6827.
89. *Carugo O., Bordo D.* How many water molecules can be detected by protein crystallography? // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. — 1999. — T. 55, № 2. — C. 479–483.
90. Demonstration of positionally disordered water within a protein hydrophobic cavity by NMR / J. A. Ernst [и др.] // *Science*. — 1995. — T. 267, № 5205. — C. 1813–1817.
91. *Morozenko A., Stuchebrukhov A.* Dowser++, a new method of hydrating protein structures // *Proteins*. — 2016. — T. 84, № 10. — C. 1347–1357.
92. *Michel J., Tirado-Rives J., Jorgensen W. L.* Prediction of the water content in protein binding sites // *The journal of physical chemistry B*. — 2009. — T. 113, № 40. — C. 13337–13346.
93. *Yoon H., Kolev V., Warshel A.* Validating the water flooding approach by comparing it to grand canonical Monte Carlo simulations // *The Journal of Physical Chemistry B*. — 2017. — T. 121, № 40. — C. 9358–9365.
94. *Zhang L., Hermans J.* Hydrophilicity of cavities in proteins // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. — 1996. — T. 24, № 4. — C. 433–438.
95. *Ross G. A., Morris G. M., Biggin P. C.* Rapid and accurate prediction and scoring of water molecules in protein binding sites // *PloS one*. — 2012. — T. 7, № 3. — e32036.
96. *Ross W., Reichardt L.* Species-specific effects on the optical signals of voltage-sensitive dyes // *The Journal of Membrane Biology*. — 1979. — T. 48, № 4. — C. 343–356.
97. *Sridhar A., Ross G. A., Biggin P. C.* Waterdock 2.0: Water placement prediction for Holo-structures with a pymol plugin // *PloS one*. — 2017. — T. 12, № 2. — e0172743.

98. The ONIOM method and its applications / L. W. Chung [и др.] // Chem. Rev. — 2015. — Т. 115, № 12. — С. 5678—5796.
99. Gaussian 09, Revision D. 01, Gaussian / M. J. Frisch [и др.] // Inc.: Wallingford, CT. — 2009.
100. *Neese F.* The ORCA program system // Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. — 2012. — Т. 2, № 1. — С. 73—78.
101. *Altun A., Yokoyama S., Morokuma K.* Color tuning in short wavelength-sensitive human and mouse visual pigments: ab initio quantum mechanics/molecular mechanics studies // J. Phys. Chem. A. — 2009. — Т. 113, № 43. — С. 11685—11692.
102. An average solvent electrostatic configuration protocol for QM/MM free energy optimization: Implementation and application to rhodopsin systems / Y. Orozco-Gonzalez [и др.] // J. Chem. Theory Comput. — 2017. — Т. 13, № 12. — С. 6391—6404.
103. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters / V. Hornak [и др.] // Proteins. — 2006. — Т. 65, № 3. — С. 712—725.
104. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers / M. J. Abraham [и др.] // SoftwareX. — 2015. — Т. 1. — С. 19—25.
105. MOLCAS 7: the next generation / F. Aquilante [и др.] // J. Comput. Chem. — 2010. — Т. 31, № 1. — С. 224—247.
106. TINKER: Software tools for molecular design / J. W. Ponder [и др.] // Washington University School of Medicine, Saint Louis, MO. — 2004. — Т. 3.
107. Structure optimization via free energy gradient method: Application to glycine zwitterion in aqueous solution / N. Okuyama-Yoshida [и др.] // J. Chem. Phys. — 2000. — Т. 113, № 9. — С. 3519—3524.
108. Progress in free energy perturbation: Options for evolving fragments / L. Zara [и др.] // Drug Discovery Today: Technologies. — 2021. — Т. 40. — С. 36—42.
109. *Kochendoerfer G. G., Mathies R. A.* Spontaneous emission study of the femtosecond isomerization dynamics of rhodopsin // J. Phys. Chem. — 1996. — Т. 100, № 34. — С. 14526—14532.

110. Chromophore structure in bacteriorhodopsin's O640 photointermediate / S. O. Smith [и др.] // *Biochemistry*. — 1983. — Т. 22, № 26. — С. 6141—6148.
111. *Lohrmann R., Stockburger M.* Time-resolved resonance Raman studies of bacteriorhodopsin and its intermediates K590 and L550: Biological implications // *J. Raman Spectrosc.* — 1992. — Т. 23, № 10. — С. 575—583.
112. *Ames J. B., Mathies R. A.* The role of back-reactions and proton uptake during the N - O transition in bacteriorhodopsin's photocycle: a kinetic resonance Raman study // *Biochemistry*. — 1990. — Т. 29, № 31. — С. 7181—7190.
113. *Smith S. O., Mathies R. A.* Resonance Raman spectra of the acidified and deionized forms of bacteriorhodopsin // *Biophys. J.* — 1985. — Т. 47, № 2. — С. 251—254.
114. The photochemistry of sodium ion pump rhodopsin observed by watermarked femto-to submillisecond stimulated Raman spectroscopy / Y. Hontani [и др.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2016. — Т. 18, № 35. — С. 24729—24736.
115. Resonance Raman study of halorhodopsin photocycle kinetics, chromophore structure, and chloride-pumping mechanism / J. B. Ames [и др.] // *Biochemistry*. — 1992. — Т. 31, № 50. — С. 12546—12554.
116. Photochemical Reaction Cycle and Proton Transfers in *Neurospora* Rhodopsin / L. S. Brown [и др.] // *J. Biol. Chem.* — 2001. — Т. 276, № 35. — С. 32495—32505.
117. A new group of eubacterial light-driven retinal-binding proton pumps with an unusual cytoplasmic proton donor / A. Harris [и др.] // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* — 2015. — Т. 1847, № 12. — С. 1518—1529.
118. Low-temperature Raman spectroscopy of sodium-pump rhodopsin from *Indibacter alkaliphilus*: Insight of Na⁺ binding for active Na⁺ transport / Y. Nakamizo [и др.] // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2021. — Т. 23, № 3. — С. 2072—2079.

119. Functional importance of the oligomer formation of the cyanobacterial H⁺ pump Gloeobacter rhodopsin / A. Iizuka [и др.] // Sci. Rep. — 2019. — Т. 9, № 1. — С. 10711.
120. Leptosphaeria rhodopsin: bacteriorhodopsin-like proton pump from a eukaryote / S. A. Waschuk [и др.] // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 2005. — Т. 102, № 19. — С. 6879—6883.
121. *Dioumaev A. K., Wang J. M., Lanyi J. K.* Low-temperature FTIR study of multiple K intermediates in the photocycles of bacteriorhodopsin and xanthorhodopsin // J. Phys. Chem. B. — 2010. — Т. 114, № 8. — С. 2920—2931.
122. Time-resolved IR spectroscopy reveals mechanistic details of ion transport in the sodium pump *Krokinobacter eikastus* rhodopsin 2 / M. Asido [и др.] // Phys. Chem. Chem. Phys. — 2019. — Т. 21, № 8. — С. 4461—4471.
123. Near-IR resonance Raman spectroscopy of archaerhodopsin 3: effects of transmembrane potential / E. C. Saint Clair [и др.] // J. Phys. Chem. B. — 2012. — Т. 116, № 50. — С. 14592—14601.
124. Directed evolution of bacteriorhodopsin for device applications / J. R. Hillebrecht [и др.] // Meth. Enzymol. — 2004. — Т. 388. — С. 333—347.
125. *Altun A., Yokoyama S., Morokuma K.* Mechanism of spectral tuning going from retinal in vacuo to bovine rhodopsin and its mutants: multireference ab initio quantum mechanics/molecular mechanics studies // J. Phys. Chem. B. — 2008. — Т. 112, № 51. — С. 16883—16890.