

В ходе выполнения проекта по Соглашению о предоставлении субсидии от 14.08.2015 г. № **14.587.21.0011** с Минобрнауки России в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» по теме «Новые светоуправляемые каналы и транспортеры для оптогенетического контроля нейронов и исследований мозга» на этапе №2 в период с 1 января по 30 июня 2016 года были выполнены следующие работы:

Этап 2. «Функциональная характеристика белков-мишеней, создание и экспрессия генно-инженерных конструкций»

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

В проекте объединяются компетенции авторов в таких методах и методологиях исследований, как: рациональный скрининг базы данных аминокислотных последовательностей при поддержке компьютерного моделирования; геновая инженерия, экспрессия и очистка белков; функциональная характеристика в пробирке методами спектроскопии, в том числе методами флэш-фотолиза и спектроскопии одиночных молекул; крупномасштабное производство белков-кандидатов для изучения структуры; кристаллизация, кристаллография и решение кристаллографических структур белков; компьютерное моделирование белков.

На втором этапе реализации проекта выполнена функциональная характеристика белков-мишеней – новых светочувствительных протонных и ионных каналов и насосов, представляющих потенциальный интерес для неврологии, отобранных на первом этапе выполнения проекта. Функциональная характеристика в пробирке выполнена методами спектроскопии, в том числе определены фотоциклы методами флэш-фотолиза и спектроскопии одиночных молекул. Предложенные экспериментальные подходы к характеристике фотоактивируемых каналов и транспортеров белковых препаратов позволяют дать качественный ответ о функциональной активности целевых белков. Созданы и экспрессированы генно-инженерные конструкции. Разработаны методики встраивания белков-кандидатов в липидные системы.

В результате взаимодействия с иностранными партнерами углубляется и расширяется филогенетический анализ базы данных родопсинов. Определяются и дополняются функциональные кластеры и группы белков. Потенциально перспективные кандидаты, определенные совместно с партнером Institut de Biologie Structurale (IBS, Франция), поступают на начальный этап исследования: генетическую инженерию экспрессионных конструкций, а также непосредственно экспрессию белков в гетерологичных системах. Экспрессированный и очищенный белок, полученный партнером Institute of Complex Systems-6: Structural Biochemistry, Research Center Juelich (ICS-6, Германия), используется для встраивания в липидные системы и функциональной характеристики *in vitro* методами спектроскопии.

Непосредственные результаты проекта найдут применение в фундаментальных исследованиях нейробиологии, а также создадут основу для медицинских применений. Сопутствующие наработки будут иметь самостоятельную важность для развития ряда научных областей затронутых в проекте: будут разработаны биоинформатические методы поиска белков с заданными характеристиками; методы экспрессии ряда мембранных белков; подходы к получению переходных состояний белков (в том числе с использованием рентгеновских лазеров на свободных электронах); методы кристаллизации

мембранных белков; методы компьютерного моделирования новых белков с нужными свойствами.

Проект также является значимым для развития оптогенетических исследований и их приложений, которые требуют создания панели светоактивируемых белков с различными функциями как инструментов тонкой настройки нейронных процессов. Настоящий проект будет способствовать этому развитию, предоставляя светочувствительные транспортеры и каналы с новыми, крайне необходимыми свойствами. Результаты проекта создадут рациональную парадигму для исследований и инженерии таких оптогенетических инструментов.

Комиссия Минобрнауки России признала обязательства по Соглашению на отчетном этапе исполненными надлежащим образом.