

На правах рукописи

Шемякина Ирина Игоревна

**Красные и дальне-красные флуоресцентные белки, оптимизированные  
для мечения белков слияния**

Специальность- 03.01.03- молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2015 год

---

Работа выполнена в лаборатории геномики адаптивного иммунитета Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

**Научный руководитель:**

Доктор биологических наук Чудаков Дмитрий Михайлович

**Официальные оппоненты:**

Соболев Александр Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Шеваль Евгений Валерьевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник отдела электронной микроскопии Научно-исследовательского института физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук.

Защита состоится «17» июня 2015 г. В 10:00 на заседании диссертационного совета Д002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, ГСП-7, Москва, В-437, Миклухо-Маклая, д. 16/10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте Института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)

Автореферат разослан

**Ученый секретарь диссертационного совета**  
доктор физико-математических наук



**В.А. Олейников**

## ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Клонирование гена зеленого флуоресцентного белка GFP (Green Fluorescent protein) медузы *Aequorea victoria* в 1992 году открыло широкие перспективы для фундаментальных и прикладных исследований в области молекулярной и клеточной биологии. Так как флуоресцентные белки (ФБ) являются генетически-кодируемыми флуоресцентными метками, они могут быть встроены и экспрессированы в одной рамке считывания с интересующим белком, что позволяет наблюдать за его локализацией в живых системах. Однако, необходимой характеристикой ФБ для успешного мечения исследуемых белков при максимальном сохранении их нативной функции и локализации является мономерность. Первый клонированный флуоресцентный белок, avGFP, оказался естественным мономером. По данной причине, avGFP и его производные варианты с флуоресценцией в циановой, зеленой и желтой (максимумы эмиссии от 470 до 530 нм) областях спектра сегодня широко применяются в составе белков слияния. В то же время, все известные природные красные флуоресцентные белки характеризуются димерной либо тетрамерной природой. Усилиями различных научных коллективов и нашей лабораторией был получен ряд мономерных красных и дальне-красных ФБ. Однако опыт многих исследований свидетельствует о том, что существующие мономерные красные белки, такие как mCherry, TagRFP и mKate2, уступают зеленым мономерным белкам при работе в химерных конструкциях с белками слияния. Таким образом, оставалась нерешенной задача разработки оптимального красного ФБ для мечения исследуемых белков в живых клетках, которой и была посвящена данная работа.

**Цели и задачи работы.** Целью диссертационной работы являлось получение красных мономерных флуоресцентных белков, качество работы которых в составе белков слияния не уступало бы лучшим зеленым флуоресцентным белкам. Для достижения поставленной цели были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Получить и охарактеризовать красный флуоресцентный белок, который будет сохранять мономерные свойства даже при высоких концентрациях (более 1 мг/мл) и будет обладать низкой цитотоксичностью.
2. На его основе получить мономерные фотоактивируемые красные флуоресцентные белки.

3. Получить мономерный флуоресцентный белок, характеризующийся батохромным сдвигом максимума эмиссии флуоресценции в дальне-красную область видимой части спектра.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** В результате диссертационной работы были получены и охарактеризованы четыре флуоресцентных белка, обладающих эмиссией флуоресценции в красной и дальне-красной областях видимой части спектра. Подтверждено влияние некоторых аминокислотных замен в окружении хромофора на мономерные свойства белков. Полученные белки охарактеризованы *in vivo*. Показана их применимость для мечения белков слияния. Полученные белки используются в научных исследованиях в различных лабораториях России и мира.

**Структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 101 странице. Состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения результатов, выводов, списка цитируемой литературы, который содержит 124 ссылки. Диссертация содержит 18 рисунков и 2 таблицы.

**Апробация работы.** Материалы диссертации были доложены на конференции «Физиология 2010» (Манчестер, 2010), на третьем международном симпозиуме «Актуальные проблемы биофотоники» (Санкт-Петербург – Нижний Новгород 2011).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано пять статей в рецензируемых журналах.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Красный мономерный флуоресцентный белок.

Многие белки слияния и большинство биосенсоров на основе ФБ чрезвычайно чувствительны к олигомеризации и неспецифической внутриклеточной локализации. За последнее десятилетие ряд красных димерных и тетрамерных белков подвергался искусственной мономеризации, которая в большинстве случаев приводила к потере яркости, уменьшению скорости созревания и снижению стабильности флуоресценции. Лучшие образцы красных мономерных белков уступают природным зеленым

мономерным белкам в составе белков слияния. Эта проблема объясняется остаточной слабой димеризацией красных флуоресцентных белков.

В настоящей работе нас мотивировала задача получения красного флуоресцентного белка, качество работы которого в составе белков слияния не уступало бы лучшим зеленым белкам, таким как mEmerald или mEGFP.

## 1.1 Получение белка FusionRed

На основании таких характеристик как высокая яркость флуоресцентного сигнала, высокая скорость созревания хромофора, и низкая токсичность, белок mKate2 был выбран нами в качестве основы для разработки красного мономерного белка, для которого не будет характерна проблема слабой димеризации.

На основании анализа трехмерной структуры белка mKate мы выбрали ряд положений аминокислотных остатков, которые способны влиять на олигомерные свойства белка mKate2. С помощью сайт-специфичного ПЦР-мутагенеза мы внесли следующие замены в микроокружение хромофора: S132A, R164A, K182E, Y200N. Кроме того, мы заменили гидрофобный С-концевой участок, стабилизирующий формирование димера, на Gly-богатый участок, что может повлиять на поведение mKate в составе белков слияния.

Полученный на этом этапе белок был назван mKate2.5. Его мономерность при концентрации до 10 мг/мл была подтверждена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии HPLC. Однако, следствием введения мономеризирующих замен стало ухудшение ряда характеристик белка. В частности, недостатками mKate2.5 являются относительно невысокая яркость флуоресценции, а также низкая рН-стабильность (кажущееся значение  $pK_a = 7.0$ , тогда как для исходного белка mKate2  $pK_a = 5.0$ ). Наша дальнейшая работа была направлена на оптимизацию свойств белка mKate2.5, которая, однако, не должна была произойти за счет изменения его мономерных свойств.

Основываясь на нашем предыдущем опыте работы с белками этого семейства (потомками белка дикого типа eqFP578), а также на данных о трехмерной структуре белка mKate, мы предположили, что аминокислотные замены в окружении хромофора, такие как K69R, S148N, C165T, L181F и R203H приведут к созданию флуоресцентного

белка, подобного TagRFP, который обладает высокой рН-стабильностью. Используя специально разработанные праймеры, мы провели несколько раундов сайт-специфичного мутагенеза. Были получены библиотеки, содержащие различные комбинации аминокислотных замен в выбранных нами положениях. Яркость полученных вариантов анализировали с помощью флуоресцентного бинокля SZX-12 (Olympus), спектрофотометра SMS2VIS и программы smsCalc для измерения спектров флуоресценции с отдельных колоний и штрихов. Самые яркие варианты были объединены и подверглись нескольким раундам случайного мутагенеза. На каждом раунде случайного мутагенеза отбиралось 20-40 вариантов. После секвенирования отобранных вариантов мы объединяли накопленные недимеризующие замены (согласно результатам секвенирования и анализа трехмерной структуры белка mKate) в различных комбинациях с использованием метода вырожденного сайт-направленного мутагенеза, и полученный набор вариантов подвергали следующему раунду случайного мутагенеза. Такой цикл повторяли в общей сложности 7 раз. Ряд замен, найденных в ходе случайного мутагенеза, такие как пара T75P+Q76P, значительно увеличили скорость и эффективность созревания белка. Этот дуплет пролинов находится между  $\alpha$ -спиралью, несущей хромофор, и четвертым  $\beta$ -слоем, и по всей вероятности обеспечивает необходимый угол поворота при переходе между этими структурными элементами.

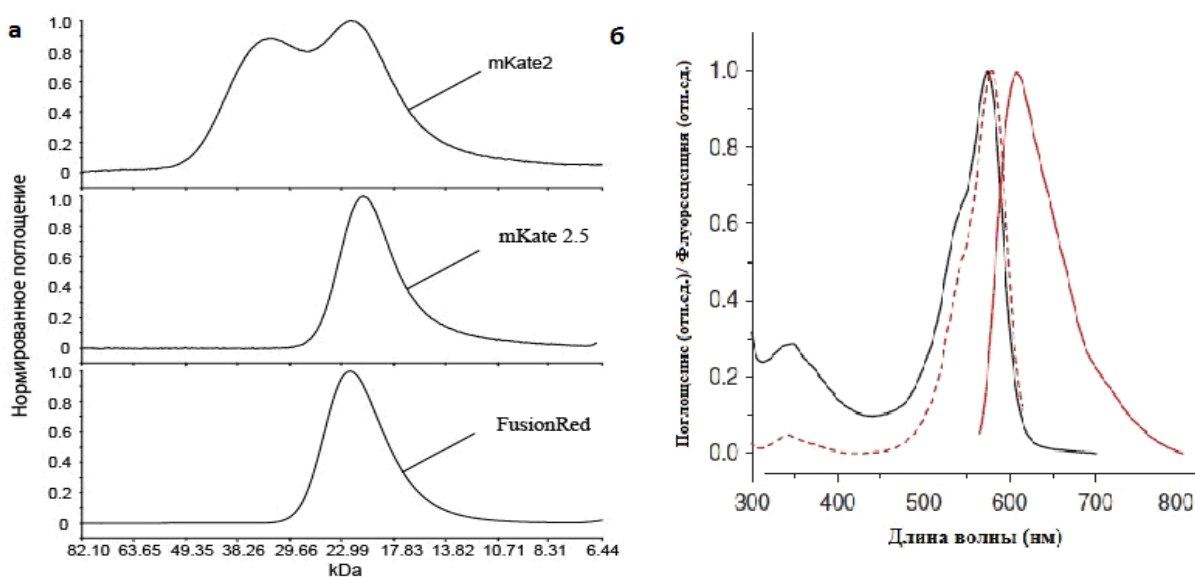
Окончательный вариант, названный FusionRed (от fusion- белок слияния), имеет яркость при экспрессии в бактериях сопоставимую с яркостью белка-предшественника mKate2.

## 1.2 Характеристика и сравнение FusionRed с аналогами *in vitro*

Анализ олигомерного статуса белков mKate2, mKate2.5 и FusionRed проводился с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии HPLC на носителе Superdex 200, при концентрации 10 мг/мл (рис. 1 а).

Было показано, что белки mKate2.5 и FusionRed сохраняют мономерную природу (молекулярная масса около 22 kDa) даже при этой высокой концентрации, сопоставимой с максимально достижимой в физиологических условиях. В то же время, белок mKate2 был представлен на HPLC двумя перекрывающимися пиками, что свидетельствует о наличии димерной составляющей при концентрации 10 мг/мл.

Были измерены спектры возбуждения флуоресценции и эмиссии белка FusionRed в интервале длин волн от 400 до 850 нм. Спектры имеют узкую и четкую форму пиков. Максимум возбуждения флуоресценции составил 580 нм, максимум эмиссии – 608 нм. Наблюдается сдвиг максимума эмиссии в более коротковолновую часть спектра относительно белка mKate2 ( $\lambda_{em}=633$  нм). Отсутствие промежуточных форм существования хромофора подтверждается наличием единственного узкого пика на спектре поглощения (рис. 1 б).



**Рисунок 1. Характеристики белка FusionRed.**

**а.** Результаты HPLC для белков mKate2, mKate2.5 и FusionRed при концентрации 10 мг/мл. По оси Y отложены нормированные значения поглощения белка (деленные на максимальное значение), по оси X – молекулярная масса в kD

**б.** Нормализованные спектры поглощения (черная сплошная линия), возбуждения (красная пунктирная линия) и эмиссии (красная сплошная линия) флуоресценции белка FusionRed

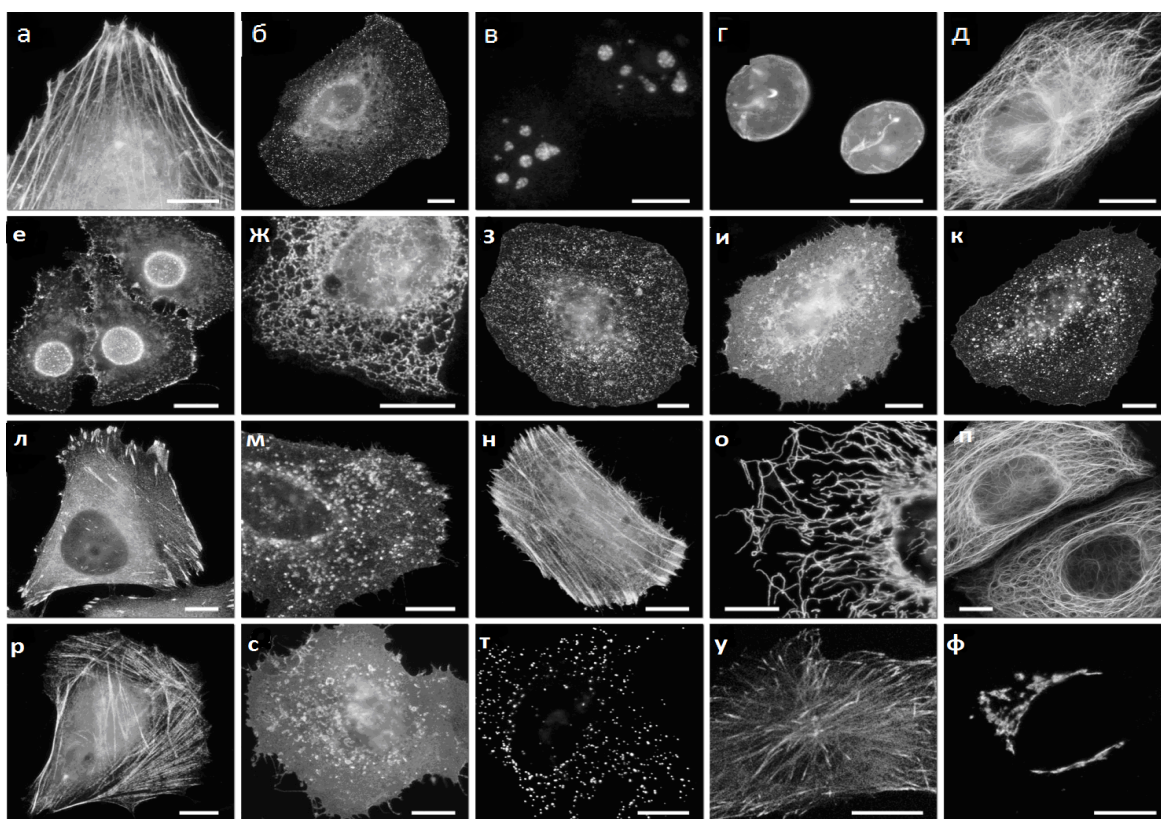
Было определено, что квантовый выход флуоресценции для белка FusionRed составляет 0.19. Коэффициент молярной экстинкции при 580 нм составляет  $94\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , что делает данный белок потенциально эффективным акцептором для FRET.

Для определения фотостабильности полученного белка FusionRed и сравнение ее с аналогами (TagRFP, mKate2, mCherry) использовались химерные конструкции с гистоном H2B, синтезируемые в клетках линии HeLa. Фотостабильность исследуемых белков определялась при помощи флуоресцентного микроскопа. Время

полуобесцвечивания белка FusionRed превосходит время полуобесцвечивания белков TagRFP и mKate2 в 3 и 2 раза соответственно.

### 1.3 Характеристика и сравнение белка FusionRed с аналогами *in vivo*

Мы получили более 40 белков слияния FusionRed, которые были протестированы при экспрессии в клетках млекопитающих (рис. 2).



**Рисунок 2. Белок FusionRed в живых клетках.**

Изображения клеток, трансфицированных рекомбинантными генетическими конструкциями, кодирующими следующие слитные белки:

**а.** FusionRed- $\beta$ -актин; **б.** FusionRed-Rab5a-7 (локализация в эндосомах); **в.** FusionRed-фибрилларин; **г.** FusionRed- ламин; **д.** FusionRed-  $\alpha$  -тубулин; **е.** FusionRed-аннексин- A4; **ж.** FusionRed-ER (локализация в эндоплазматическом ретикулуме) **з.** FusionRed-кавеолин; **и.** FusionRed- с-Na-Ras (мембранная локализация); **к.** FusionRed-эпитоп-RhoB-GTPазы (локализация в эндосомах); **л.** FusionRed-паксиллин-22; **м.** FusionRed- лизосомальный-мембранный-гликопротеин (мембранная локализация); **н.** FusionRed-lifeact (пептид, связывающий филаменты актина); **о.** FusionRed-PDHA1-10 (pyruvate dehydrogenase; митохондриальная локализация); **п.** FusionRed-кератин; **р.** FusionRed- миозин (легкая цепь); **с.** FusionRed-c-src-N-7; **т.** FusionRed-PMP (сигнал пероксисомальной локализации); **у.** FusionRed-EB3 (белок семейства RP/EB, ассоциированный с микротрубочками); **ф.** FusionRed-Golgi (45 N-концевой аминокислотный остаток галактозилтрансферазы, локализация в комплексе Гольджи)

Масштабная линейка, 10 мкм. Фотографии сделаны Michael W. Davidson, США.

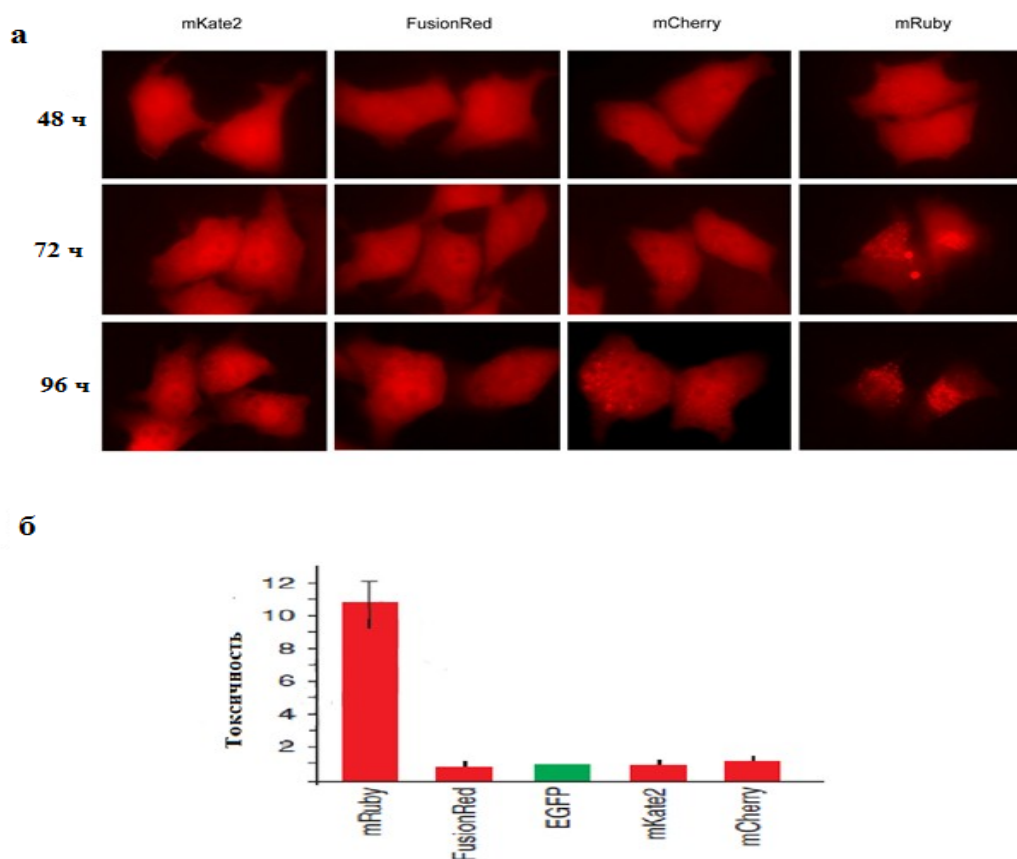


Все исследованные химерные конструкции проявляли в экспериментах преимущественно ожидаемую внутриклеточную локализацию. Уровень экспрессии флуоресцентного белка (наблюдаемая яркость сигнала) варьировался в различных клетках, что характерно при временной трансфекции эукариотических клеток. Исследованные конструкции FusionRed с белками слияния демонстрировали сопоставимую яркость сигнала и процент трансфицированных клеток. В подавляющем большинстве случаев качество работы FusionRed не уступало лучшим мономерным зеленым белкам, таким как mEGFP или mEmerald (рис. 2).

Формирование белковых агрегатов может быть токсичным для клеток. Для тестирования склонности белка FusionRed к формированию агрегатов мы протестировали его поведение в продолжительной экспрессии в клетках линии HeLa. Клетки были трансфицированы рекомбинантными плазмидами, содержащими последовательность нуклеотидов, кодирующую ген белка FusionRed под контролем CMV-промотора. Яркий красный флуоресцентный сигнал появлялся уже через 23-24 часа после трансфекции. При этом мы не наблюдали формирования видимых агрегатов даже через 5 дней после трансфекции. Таким образом, в этом отношении белок FusionRed унаследовал позитивные черты белка-предшественника mKate2.

Следующим этапом работы стало сравнение цитотоксичности белков FusionRed, mKate2, mCherry и mRuby относительно белка EGFP, широко применяемого для мечения белков слияния и характеризующегося низкой токсичностью даже при относительно высоких концентрациях. Для этого был проведен ряд трансфекций клеток линии HeLa векторами, кодирующими данные флуоресцентные белки. Клетки, экспрессирующие белок EGFP, были смешаны с клетками, экспрессирующими один из красных ФБ, в результате чего было получено четыре отдельные клеточные смеси: EGFP и mRuby, EGFP и FusionRed, EGFP и mKate2, EGFP и mCherry. Через 48 часов после трансфекций было рассчитано соотношение красных и зеленых клеток с использованием проточной цитометрии. После дополнительной 92-часовой инкубации соотношение красных и зеленых клеток было заново измерено. Поскольку подсчету подвергались только живые клетки, соотношения до и после инкубации можно считать точным отображением токсичности красного белка по сравнению с EGFP. В этих экспериментах было показано, что цитотоксичность белка mRuby более чем в 10 раз превышает цитотоксичность белка EGFP. Остальные красные белки (FusionRed, mKate2

и mCherry) обладают низкой цитотоксичностью, сопоставимой с цитотоксичностью EGFP в этом эксперименте (рис. 3б). Следует отметить, что через четыре дня после трансфекции клеток линии HeLa векторами, кодирующими mCherry и mRuby, мы наблюдали флуоресцентное мечение, напоминающие лизосомальную локализацию. Для белков mKate2 и FusionRed такого явления через четыре дня после трансфекции не наблюдалось (рис. 3 а). Исследования были частично выполнены на оборудовании ЦКП ИБХ.



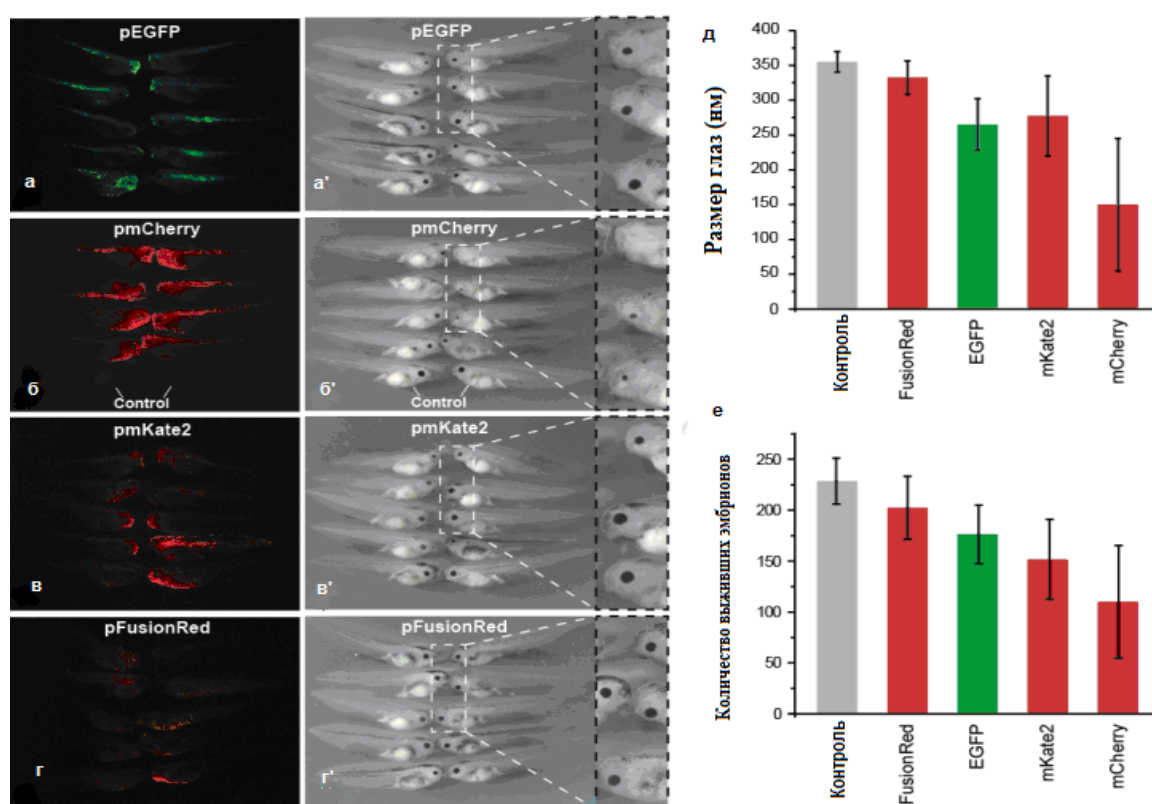
**Рисунок 3 . Сравнение красных мономерных флуоресцентных белков.**

**а.** Клетки линии HeLa, трансфицированные плазмидами, кодирующими исследуемые красные флуоресцентные белки под контролем CMV-промотора. 4 дня после трансфекции. Для белков mCherry и mRuby наблюдается лизосомальная локализация. mKate2 и FusionRed остаются правильно локализованными в цитоплазме.

**б.** Цитотоксичность белков в клетках линии HeLa относительно EGFP

Следующим этапом работы стала оценка токсичности полученного мономерного белка FusionRed на лабораторных животных. В качестве модели нами были выбраны *Xenopus laevis* (совместно с Лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ

РАН). Были проведены микроинъекции плазмид, кодирующих флуоресцентные белки под контролем CMV-промотора, в эмбрионы *Xenopus laevis*. В предварительных экспериментах мы наблюдали разные степени снижения среднего размера глаз головастиков, в зависимости от экспрессируемых флуоресцентных белков. Учитывая, что данный параметр относительно легко измерить, он был использован для оценки относительной токсичности следующих флуоресцентных белков: EGFP, mCherry, mKate2 и FusionRed (рис. 4 а-е).



**Рисунок 4. Токсичность белков EGFP, mCherry, mKate2 и FusionRed *in vivo*.**

Трансгенные эмбрионы *Xenopus laevis*, экспрессирующие EGFP (а, а'), mCherry (б, б') mKate2 (г, г') и FusionRed (д, д'). Фотографии эмбрионов в белом свете (а', б', в', г') и флуоресцентные изображения (а,б,в,г).

д. Среднее значение размера глаз эмбрионов *Xenopus laevis* после инъекций плазмид, экспрессирующих различные флуоресцентные белки.

е. Количество выживших эмбрионов через 5 дней после инъекций плазмид.

Белок mCherry оказался наиболее токсичным из всех тестируемых белков. Инъекции mCherry снизили средний размер глаз наиболее значительно (рис. 4 б', д, е).

EGFP и mKate2 обладают умеренной токсичностью (рис. 4 а', в'), а белок FusionRed является наименее токсичным из всех четырех вариантов (рис. 4 г'). Выживаемость FusionRed-экспрессирующих эмбрионов составила 68%, тогда как этот показатель для контрольных эмбрионов составил 76%. Для EGFP, mKate2 и mCherry - 59%, 51% и 37% соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о низкой токсичности FusionRed и его применимости для мечения белков, клеток и тканей в трансгенных организмах.

## 2. Красные мономерные обратимо фотоактивируемые белки

Недавно на основе белка TagRFP был получен обратимо фотоактивируемый белок KFP-НС. Данный белок обладает флуоресценцией в красной области спектра. Максимумы возбуждения и эмиссии KFP-НС приходится на 585 и 615 нм, соответственно. Интенсивность флуоресценции KFP-НС падает в 10 раз (за счет уменьшения квантового выхода флуоресценции) под воздействием зеленого света (530–560 нм) и затем возвращается к исходному уровню при облучении синим светом (450–490 нм) или после инкубации в темноте (время полувосстановления флуоресценции составляет 30 мин). Аминокислотные остатки 69, 148, 165, 179 и 181 (нумерация по GFP) играют определяющую роль в проявлении свойств фотоактивируемости. 148 и 165 аминокислотные остатки в значительной степени определяют возможность фотоиндуцируемой *цис-транс*-изомеризации хромофора.

Однако, недостатком белка KFP-НС является низкая яркость флуоресценции. Нас привлекла возможность получения мономерного фотоактивируемого красного флуоресцентного белка на основе мономерного белка FusionRed, который высокогомологичен KFP-НС.

### 2.1 Получение фотоактивируемых белков mKateKFP1 и mKateKFP2

Мы сравнили KFP-НС и FusionRed по позициям 69, 148, 165, 179 и 181. Оба белка содержат цистеин в 165 положении и лейцин в 181. Различия наблюдаются только по 69, 148 и 179 положениям. Следовательно, было решено провести направленный мутагенез FusionRed с различным набором мутаций по этим позициям.

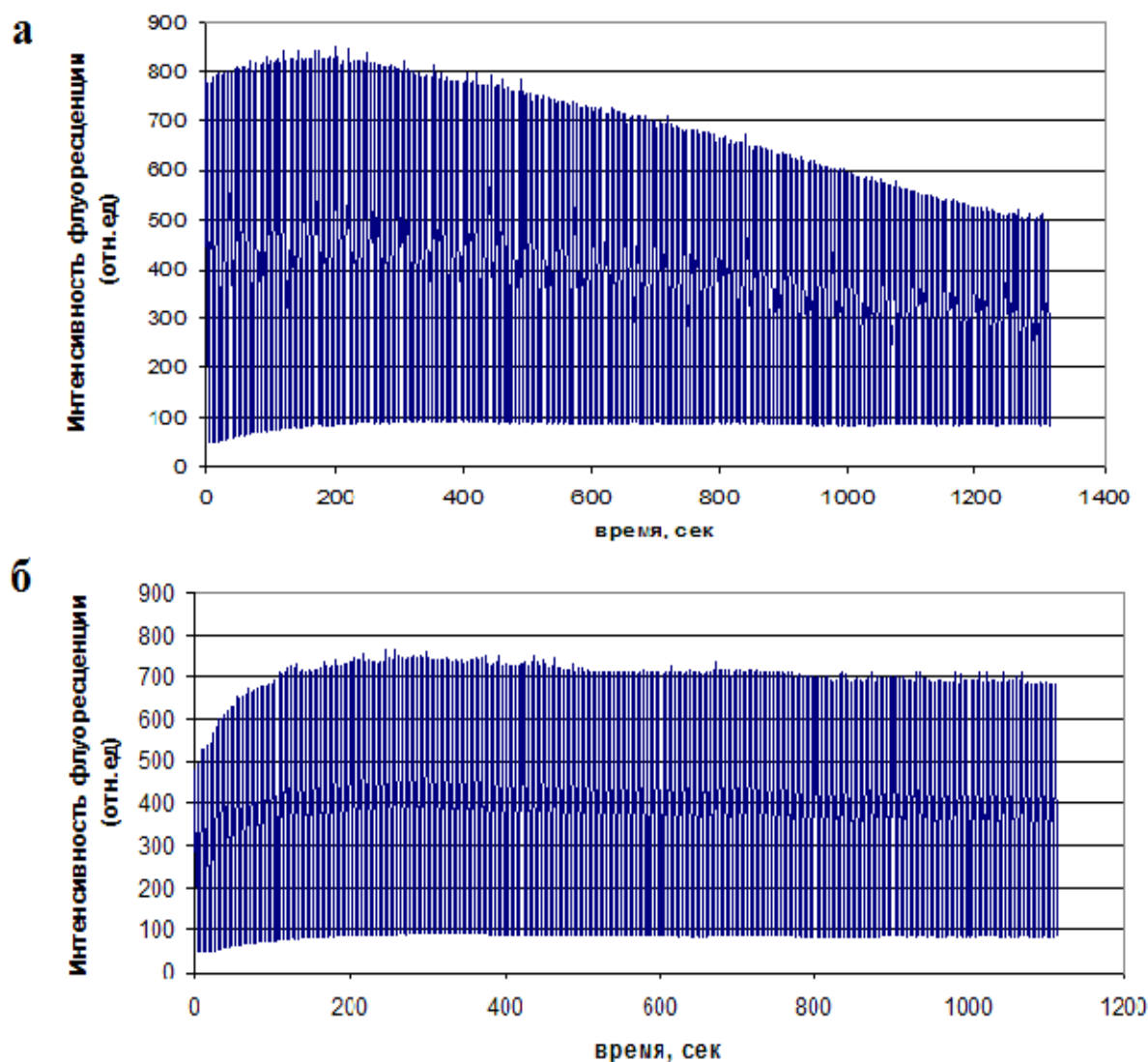
Используя специально разработанные праймеры, мы провели несколько серий сайт-специфичного мутагенеза. Нами были получены следующие варианты: FusionRedS148H; FusionRed R69K, S148H; FusionRed R69K, S148H, C179A. Отсутствие случайных замен в результирующих вариантах было подтверждено секвенированием. При этом яркость флуоресценции FusionRed R69K, S148H и FusionRed R69K, S148H, C179A была намного выше, чем яркость флуоресценции белков KFP-НС или FusionRedS148H. Варианты белка FusionRed R69K, S148H (далее mKateKFP1) и FusionRed R69K, S148H, C179A (далее mKateKFP2) демонстрировали выраженную способность к обратимому изменению флуоресцентных свойств и было принято решение продолжить работу с вариантами.

## 2.2 Изучение фотоактивационных свойств белков mKateKFP1 и mKateKFP2

Фотоактивационные свойства колонии *E.coli*, экспрессирующие варианты mKateKFP1 и mKateKFP2, изучали как при помощи микроскопа Leitz Laborlux K (объектив 40x) с высокой мощностью (100 Вт ртутная лампа), так и при помощи флуоресцентного бинокля SZX-12 (Olympus). Интенсивности флуоресценции обоих вариантов довольно быстро снижалась при облучении зеленым светом (менее чем за одну минуту). Восстановление флуоресценции происходило при облучении синим светом за две минуты или за 10 минут в темноте. Для исходного белка FusionRed в тех же условиях эффекта обратимого фотообесцвечивания не наблюдалось.

Следующим этапом нашей работы стало изучение фотоактивационных свойств иммобилизованных на металлоафиинной смоле белков mKateKFP1 и mKateKFP2 с помощью флуоресцентного микроскопа DMI 6000 В. В этих условиях достигаются более высокие локальные мощности облучения, которые также могут применяться в реальной микроскопии живых клеток. Были подобраны условия многократной фотоактивации/тушения флуоресценции данных белков. Белки mKateKFP1 и mKateKFP2 под действием зеленого света (3 с,  $\sim 3$  Вт/см<sup>2</sup>) переходят в потушенное состояние и быстро восстанавливают красный флуоресцентный сигнал при облучении синим светом (1.5-3 с,  $\sim 3$  Вт/см<sup>2</sup>). Интересно, что наблюдается возрастание интенсивности свечения флуоресцентной формы этих белков на начальных циклах фотопереключения (рис. 5). Для белка mKateKFP1 после достижения максимума

наблюдается постепенное выгорание флуоресцентной формы. Необратимое фотообесцвечивание белка mKateKFP2 при тех же условиях происходит намного медленнее. Фактически, белок mKateKFP2 не обесцвечивается даже после сотен циклов фотоактивации-фотоинаktivации при заданных условиях. Контраст между фотоинаktivированной и фотоактивированной формами флуоресценции для белка mKateKFP1 достигает 30 раз, для mKateKFP2- 20 раз.



**Рисунок 5.** Фотоконверсия иммобилизованных на смоле белков mKateKFP1(а) и mKateKFP2 (б) синим светом (1.5 с) после облучения зеленым светом (3 с). Нижний ряд точек – потушенная флуоресценция, верхний ряд точек – восстановленная флуоресценция. Интенсивность облучения около 3 Вт/см<sup>2</sup>

Были измерены спектры поглощения, возбуждения и эмиссии флуоресценции полученных белков. Для активированной формы mKateKFP1 максимум возбуждения и эмиссии флуоресценции приходятся на 572 нм и 613 нм, соответственно. Максимум эмиссии после тушения флуоресценции составляет 602 нм (сдвиг на 11 нм). Максимум возбуждения флуоресценции для активированной формы mKateKFP2 приходится на 580 нм, максимум эмиссии - на 605 нм. После тушения флуоресценции максимум эмиссии смещается на 2 нм влево и приходится на 603 нм.

Белки mKateKFP1 и mKateKFP2 имеют два максимума поглощения - 405 нм и 565 нм. При облучении зеленым светом, приводящим к падению яркости красного флуоресцентного сигнала, наблюдается падение пика поглощения при 405 нм и рост при 565 нм. Рост поглощения при 565 нм свидетельствует об увеличении коэффициента молярной экстинкции белка. Так как яркость флуоресценции пропорциональна произведению коэффициента молярного поглощения и квантового выхода, тушение флуоресценции данных белков объясняется одновременным и доминирующим уменьшением квантового выхода флуоресценции.

Полученные белки mKateKFP1 и mKateKFP2 имеют высокий контраст, быстро тушатся и восстанавливаются. Яркость флуоресценции данных белков выше яркости флуоресценции белка KFP-НС. Данные белки не содержат замен во внешней части бета-бочонка относительно FusionRed. Таким образом mKateKFP1 и mKateKFP2 наследуют мономерные свойства белка-предшественника. Это делает их оптимальными фотоактивируемыми вариантами для использования в составе белков слияния.

### **3. Дальне-красный мономерный белок**

На сегодняшний день цветовая палитра мономерных ФБ охватывает практически весь видимый спектр, от фиолетовой до красной его части. Единственным заметным пробелом остается ближняя инфракрасная область спектра. Недавно был описан дальне-красный мономерный ФБ TagRFP 657 (максимумом эмиссии флуоресценции при 657нм), разработанный на основе белка mKate. Недостатками данного белка являются низкая яркость (14% от яркости белка mKate2) и низкая скорость созревания (время полусозревания при 37<sup>0</sup>С составляет 125 мин, для белка mKate2 этот показатель составляет 48 мин). Достигнутые нами успехи в разработке красного мономерного белка

FusionRed заставили нас задуматься о получении дальне-красного мономерного белка с батохромным сдвигом максимума поглощения. Такой ФБ должен сохранять мономерные свойства даже при высоких концентрациях (более 1 мг/мл), не должен быть склонным к неспецифичным взаимодействиям в живых клетках, не должен проявлять цитотоксических свойств. Важно также отметить, что белок с максимум возбуждения флуоресценции более 600 нм может быть эффективно возбужден стандартными 633нм или 635нм лазерными линиями.

### 3.1 Получение дальне-красного мономерного белка

Поиск ключевых аминокислотных остатков для сайт-специфичного мутагенеза был основан на анализе кристаллической структуры белка mKate и аминокислотной последовательности белка TagRFP 657.

Для сайт-специфического мутагенеза мы выбрали следующие аминокислотные остатки, потенциально способные влиять на спектральные характеристики белка:

1. 44 аминокислотный остаток, который находится в непосредственной близости от хромофора. Следует отметить, что остаток метионина в положении 44 подвергся замене в недавно опубликованных дальне-красных флуоресцентных белках: mNeptune, полученном на основе mKate; E2-Crimson, полученном на основе DsRed-Express2; eqFP650 и eqFP670, полученные в нашей лаборатории на основе белка Katushka 9-5; белок TagRFP 657 также несет замену в 44 положении.

2. 69 и 152 аминокислотные остатки. Исходя из выравнивания аминокислотных последовательностей флуоресцентных белков, боковая цепь аминокислоты в 69 и 152 положениях обращена внутрь белковой глобулы и ориентирована на хромофор.

4. 148, 165, 167 и 203 аминокислотные остатки. Природа этих аминокислотных остатков обуславливает смещение равновесия между анионной и протонированной формами хромофора, его изомеризацию (*цис*- или *транс*-) и определяет нековалентные взаимодействия, влияющие на степень поляризации хромофора. Разработанный ранее в нашей лаборатории дальне-красный флуоресцентный белок eqFP670 на основе белка Katushka 9-5 подвергся заменам по 148 и 165 положению. Введение замены 203Y - ароматическое кольцо остатка тирозина в положении 203 способно входить в стэкинг-



взаимодействие с системой сопряжённых связей хромофора и смещать спектр эмиссии белка в длинноволновую область спектра.

5. 181 аминокислотный остаток, который находится в непосредственной близости от хромофорной группы. Мы предположили, что замена L181F может увеличить яркость флуоресценции.

Для получения библиотеки с аминокислотными заменами M44QEC, K69HN, S148HN, L152M, A165T, M167ML, L181F, R203YF (всего 48 вариантов) мы провели серию сайт-специфичных ПЦР-мутагенезов.

На этом этапе работы нашей основной задачей являлся отбор вариантов, обладающих максимумами эмиссии флуоресценции, сдвинутыми в дальне-красную область видимой части спектра. Отбор вариантов, характеризующихся батохромным сдвигом относительно белка FusionRed, проводили с использованием бинокля Olympus SZX-12 с соответствующим набором светофильтров. Спектры эмиссии флуоресценции мутантных вариантов, обладавших наиболее яркой флуоресценцией в дальне-красной области, снимали с помощью спектрофотометра SMS2VIS. Самый яркий вариант содержал следующие аминокислотные замены: M44Q, K69N, S148N, L152M, A165T, M167L, L181F, R203Y. Полученный белок характеризуется сильным батохромным сдвигом как спектра возбуждения (пик 610 нм), так и спектра эмиссии флуоресценции (пик 657 нм).

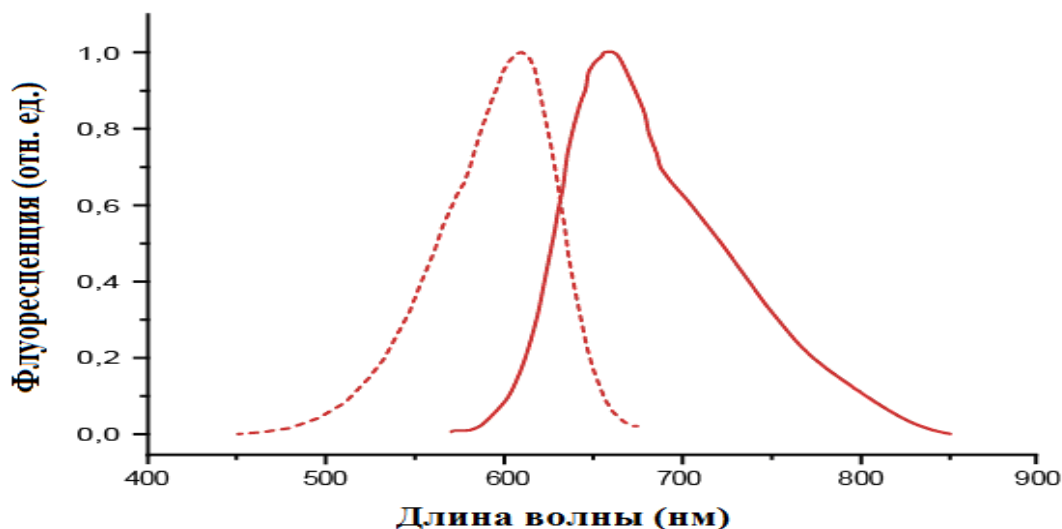
Для оптимизации яркости и скорости созревания полученного варианта, мы решили провести несколько раундов случайного мутагенеза для последующего отбора вариантов с дополнительными заменами в окружении хромофора.

На первом раунде нами было подвергнуто скринингу порядка 10000 индивидуальных клонов. Было отобрано 12 наиболее ярких клонов с максимумами эмиссии флуоресценции в диапазоне от 653нм до 660нм. По результатам секвенирования мы отобрали 4 варианта, не содержащих нежелательных внешних (потенциально димеризующих) замен.

На основе этих четырех вариантов был проведен второй раунд случайного мутагенеза. На этом этапе было отобрано 16 клонов. По результатам секвенирования было отобрано 4 варианта. Для этих клонов были выделены рекомбинантные белки. Полученные варианты мы сравнили по яркости флуоресценции и скорости созревания.

Лучший вариант по этим показателям получил название FusionRed-657. Он содержит дополнительные аминокислотные замены S31C, E210G, возникшие в ходе случайного мутагенеза.

Мы определили спектральные характеристики белка FusionRed-657. Измерили спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции. Спектры имеют узкую форму пиков. Максимум возбуждения флуоресценции составил 609 нм, а максимум эмиссии- 657нм (рис. 6).



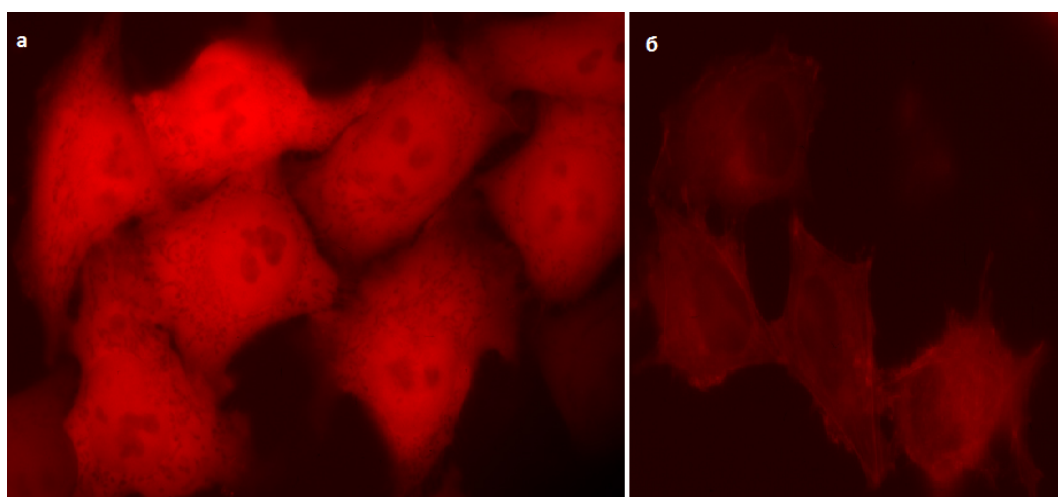
**Рисунок 6.** Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции FusionRed-657R (пунктирная и прямая красная линии соответственно).

Для полученного белка были определены коэффициент молярной экстинкции и квантовый выход флуоресценции. По результатам измерений значения коэффициентов молярной экстинкции для белка FusionRed-657R составил  $43000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ . Для расчета квантового выхода флуоресценции данного белка были измерены спектры поглощения и эмиссии флуоресценции при комнатной температуре и соотнесены с белком TagRFP 657, для которого квантовый выход флуоресценции составляет 0.1. Было определено, что квантовый выход флуоресценции для белка FusionRed-657 составляет 0.06.

Следующим этапом нашей работы стало тестирование белка FusionRed-657 *in vivo*. Для тестирования белка FusionRed-657 в клетках млекопитающих была получена нуклеотидная последовательность данного белка под контролем CMV-промотора. Мы провели ряд трансфекций клеток линии HeLa. При экспрессии в живых клетках FusionRed-657 унаследовал низкотоксичные свойства белка-предшественника.

Достаточно яркий дальне-красный флуоресцентный сигнал появлялся через 24 часа после трансфекции, что свидетельствует о довольно быстром созревании полученного белка в клетках млекопитающих. Через три дня после трансфекции мы не наблюдали формирование белковых агрегатов (рис. 7).

Для проверки возможности использования полученного дальнекрасного белка для мечения белков слияния мы использовали модель визуализации  $\beta$ -актина. Для этого нами была получена химерная конструкция FusionRed-657- $\beta$ -актин. После проведения трансфекций клеток линии HeLa полученной рекомбинантной плазмидой, мы наблюдали специфичное мечение актиновых филаментов (рис. 7). Однако следует признать, что относительная яркость флуоресцентного сигнала была недостаточна для надежного использования FusionRed-657 в составе белков слияния, и требуется дальнейшая работа по усовершенствованию этого варианта.



**Рисунок 7. Белок FusionRed-657 в живых клетках**

**а.** Клетки линии HeLa, трансфецированные рекомбинантной плазмидой pFusionRed-657, 3 дня после трансфекции **б.** Клетки линии HeLa, трансфецированные рекомбинантной плазмидой pFusionRed-657- $\beta$ -actin, 48 часов после трансфекции.

	10	20	30	40	50	
avGFP	MSKGEELFTGVVPI	LVLELDGDVNGHKFS	SVSGEGEGDATYGKLT	LKFICTTG-KLPVPWPT		
DsRed	MRSSKNVIKEFMRFKV	RMEGTVNGHEFEIE	EGEGEGRPYEGHNTV	KLKVTKGGPLPFAWDI		
eqFP578	MSELIKENMHMKLYME	GTVNNHHFKCTSEGE	RKPYEGTQTMRIKVV	EGGGLPFAFDI		
TagRFP	MSELIKENMHMKLYME	GTVNNHHFKCTSEGE	RKPYEGTQTMRIKVV	EGGGLPFAFDI		
mKate	MSELIKENMHMKLYME	GTVNNHHFKCTSEGE	RKPYEGTQTMRIKVV	EGGGLPFAFDI		
mKate2	MSELIKENMHMKLYME	GTVNNHHFKCTSEGE	RKPYEGTQTMRIKVV	EGGGLPFAFDI		
mKate2.5	MSELIKENMHMKLYME	GTVNNHHFKCTSEGE	RKPYEGTQTMRIKVV	EGGGLPFAFDI		
FusionRed	MSELIKENMPMKLYME	GTVNNHHFKCTSEGE	RKPYEGTQTMRIKVV	EGGGLPFAFDI		
mKateKFP1	MSELIKENMPMKLYME	GTVNNHHFKCTSEGE	RKPYEGTQTMRIKVV	EGGGLPFAFDI		
mKateKFP2	MSELIKENMPMKLYME	GTVNNHHFKCTSEGE	RKPYEGTQTMRIKVV	EGGGLPFAFDI		
FusRed-657	MSELIKENMPMKLYME	GTVNNHHFKCTCEGE	RKPYEGTQTCRIKVV	EGGGLPFAFDI		
	60	70	80	90	100	110
avGFP	LVTTFSYGVQCFSRY	PDHMKQHDFFKSAM	PEGYVQERTIFFKDD	GNKYKTRAEVKFEGDT		
DsRed	LSPQFQYGSKVYVKH	PADIP--DYKKLSF	PEGFKWERVMNFEDG	GVVTVTQDSSLQDGC		
eqFP578	LATSFMYGSKTFINHT	QGIP--DLFKQSF	PEGFTWERITTYEDG	GVLTATQDTSLQNGC		
TagRFP	LATSFMYGSRTFINHT	QGIP--DFFKQSF	PEGFTWERVTTYEDG	GVLTATQDTSLQDGC		
mKate	LATSFMYGSKTFINHT	QGIP--DFFKQSF	PEGFTWERVTTYEDG	GVLTATQDTSLQDGC		
mKate2	LATSFMYGSKTFINHT	QGIP--DFFKQSF	PEGFTWERVTTYEDG	GVLTATQDTSLQDGC		
mKate2.5	LATSFMYGSKTFINHT	QGIP--DFFKQSF	PEGFTWERVTTYEDG	GVLTATQDTSLQDGC		
FusionRed	LATSFMYGSR	HTFIKHPPGIP--	DFFKQSFPEGFTWER	VTTYEDGGVLTATQD	TSLQDGC	
mKateKFP1	LATSFMYGSKTFIKH	PPGIP--DFFKQSF	PEGFTWERVTTYEDG	GVLTATQDTSLQDGC		
mKateKFP2	LATSFMYGSKTFIKH	PPGIP--DFFKQSF	PEGFTWERVTTYEDG	GVLTATQDTSLQDGC		
FusRed-657	LATSFMYGSR	HTFIKHPPGIP--	DFFKQSFPEGFTWER	VTTYEDGGVLTATQD	TSLQDGC	
	120	130	140	150	160	170
avGFP	LVNRIELKGI	DFKEDGNILGHKLE	YNYNSHN	VYIMADKQKNGIKV	NFKIRHNIEDGSVQL	
DsRed	FIYKVKFIGVNF	PSDGPVMQKKT	M-GWEASTERLYPR--	DGVLKGEIHKALKL	KDGGHYL	
eqFP578	LIYNVKINGVNF	PSNGSVMQKKT	L-GWEANTEMLYPA--	DGGLRGHSQMAL	KLVGGGYLH	
TagRFP	LIYNVKIRGVNF	PSNGPVMQKKT	L-GWEANTEMLYPA--	DGGLEGRSDMAL	KLVGGGHLI	
mKate	LIYNVKIRGVNF	PSNGPVMQKKT	L-GWEASTEMLYPA--	DGGLEGRSDMAL	KLVGGGHLI	
mKate2	LIYNVKIRGVNF	PSNGPVMQKKT	L-GWEASTETLYPA--	DGGLEGRADMAL	KLVGGGHLI	
mKate2.5	LIYNVKIRGVNF	PANGPVMQKKT	L-GWEASTETLYPA--	DGGLEGACDMAL	KLVGGGHLI	
FusionRed	LIYNVKIRGVNF	PANGPVMQKKT	L-GWEASTETMYPA--	DGGLEGACDMAL	KLVGGGHLI	
mKateKFP1	LIYNVKIRGVNF	PANGPVMQKKT	L-GWEAHTETMYPA--	DGGLEGACDMAL	KLVGGGHLI	
mKateKFP2	LIYNVKIRGVNF	PANGPVMQKKT	L-GWEAHTETMYPA--	DGGLEGACDMAL	KLVGGGHLI	
FusRed-657	LIYNVKIRGVNF	PANGPVMQKKT	L-GWEAHTETMYPA--	DGGLEGATDLAL	KLVGGGHLI	
	180	190	200	210	220	230
avGFP	ADHYQQNTPIGD	-GPVLLPDNHYLST	QSALS	KDPNEKRDMVLL	LEFVTAAGITHGMDELYK	
DsRed	VEFKSIYMAKPP	---VQLPGY	YVDSKLDITSH-NEDY	TIVEQYERTEGRHHLFL		
eqFP578	CSFKTTYRSK	PKAKNLKMPGFHFV	DHRLERIKE-ADKETY	VEQHEMAVAKYCDL	PSKLGHR	
TagRFP	CNFKTTYRSK	PKAKNLKMPGVYV	DHRLERIKE-ADKETY	VEQHEVAVARYCDL	PSKLGHK	
mKate	CNLKTTYRSK	PKAKNLKMPGVYV	DRRLERIKE-ADKETY	VEQHEVAVARYCDL	PSKLGHK	
mKate2	CNLKTTYRSK	PKAKNLKMPGVYV	DRRLERIKE-ADKETY	VEQHEVAVARYCDL	PSKLGHR	
mKate2.5	CNLETTYRSK	PKPATNLKMPGVYV	DRRLERIKE-ADNETY	VEQHEVAVARYSTGGAGDGGK		
FusionRed	CNLETTYRSK	PKPATNLKMPGVYV	DRRLERIKE-ADDETY	VEQHEVAVARYSTGGAGDGGK		
mKateKFP1	CNLETTYRSK	PKPATNLKMPGVYV	DRRLERIKE-ADDETY	VEQHEVAVARYSTGGAGDGGK		
mKateKFP2	ANLETTYRSK	PKPATNLKMPGVYV	DRRLERIKE-ADDETY	VEQHEVAVARYSTGGAGDGGK		
FusRed-657	CNFETTYRSK	PKPATNLKMPGVYV	DRRLERIKG-ADDETY	VEQHEVAVARYSTGGAGDGGK		

## Рисунок 8 . Выравнивание аминокислотных последовательностей

Структурно важные регионы отмечены серым цветом. Отмечены следующие замены аминокислотных остатков: голубым выделены мономеризующие замены; замены, увеличивающие скорость созревания белка, показаны желтым; замены микроокружения хромофора показаны зеленым. Нумерация аминокислотных остатков представлена относительно avGFP.

#### 4. Заключение

В результате данной работы мы получили и охарактеризовали четыре красных и дальне-красных мономерных флуоресцентных белка. Белок FusionRed по результатам HPLC сохраняет мономерные свойства при высоких концентрациях (10 мг/мл) и обладает низкой цитотоксичностью. Показано, что качество работы FusionRed в составе химерных конструкций с белками слияния не уступало лучшим мономерным зеленым белкам, таким как mEGFP или mEmerald.

На основе белка FusionRed были получены белки с различными спектральными характеристиками.

Обратимо фотоконвертируемые белки mKateKFP1 и mKateKFP2 способны ко многим сотням циклов фотопереключения без существенного фотообесцвечивания. mKateKFP1 является ярким ФБ, обладающим высоким контрастом (до 30 раз), быстро тушится и восстанавливается и может быть использован в качестве обратимо фотоконвертируемой мономерной флуоресцентной метки для локального оптического мечения, а также для микроскопии сверхвысокого разрешения. Белок mKateKFP2 немного уступает по яркости и контрасту mKateKFP1.

Сайт-специфический мутагенез M44C, R69H, S148H, C165T, M167L, L181F и H203Y в сочетании с найденными в ходе случайного мутагенеза заменами S31C и E210G привели к получению дальне-красного белка FusionRed-657. Показана применимость белка FusionRed-657 для мечения белков слияния.

Во всех трех случаях отсутствуют внешние (потенциально димеризующие) аминокислотные замены относительно белка FusionRed (рис. 8), следовательно, мономерные и низкотоксичные свойства белка FusionRed не должны были измениться.

Полученные флуоресцентные белки могут быть полезны в качестве маркеров для мечения белков в живых клетках, в том числе при многоцветовом мечении и микроскопии сверхвысокого разрешения, а также, мы надеемся, послужат основой для разработки новых улучшенных вариантов ФБ и биосенсоров.

## Выводы

1. Получен и охарактеризован красный флуоресцентный белок FusionRed, сохраняющий мономерные свойства даже при высоких концентрациях.
2. Показано, что качество работы белка FusionRed в составе белков слияния не уступает зеленым мономерным белкам. Показано преимущество белка FusionRed по сравнению с другими красными мономерными флуоресцентными белками *in vivo*: FusionRed демонстрирует низкую цитотоксичность и низкую склонность к агрегации.
3. Получены обратимо фотоконвертируемые белки на основе FusionRed, изучены их фотоактивационные свойства. Установлено, что замены R69K, S148H и C179A обуславливают эффект обратимой фотоактивации данных белков.
4. Получен и охарактеризован дальне-красный мономерный флуоресцентный белок с батохромным сдвигом максимума поглощения - FusionRed-657.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи

1. Shcherbo D., Souslova E.A., Goedhart J., Chepurnykh T.V., Gaintzeva A., **Shemiakina I.I.**, Gadella T.W., Lukyanov S., Chudakov D.M. *Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins*. BMC Biotechnol. 2009. 9:24.
2. Shcherbo D., **Shemiakina I.I.**, Ryabova A.V., Luker K.E., Schmidt B.T., Souslova E.A., Gorodnicheva T.V., Strukova L., Shidlovskiy K.M., Britanova O.V., Zraisky A.G., Lukyanov K.A., Loschenov V.B., Luker G.D., Chudakov D.M. *Near-infrared fluorescent proteins*. Nat Methods. 2010 7(10):827-9.
3. Pletneva N.V., Pletnev V.Z., **Shemiakina I.I.**, Chudakov D.M., Artemyev I., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev S. *Crystallographic study of red fluorescent protein eqFP578 and its far-red variant Katushka reveals opposite pH-induced isomerization of chromophore*. Protein Sci. 2011 20(7):1265-74.
4. **Shemiakina I.I.**, Ermakova G.V., Cranfill P.J., Baird M.A., Evans R.A., Souslova E.A., Staroverov D.B., Gorokhovatsky A.Y., Putintseva E.V., Gorodnicheva T.V., Chepurnykh T.V., Strukova L., Lukyanov S., Zraisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M., Shcherbo D. *A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity*. Nat Commun. 2012;3:1204.
5. Горященко А.С., Жердева В.В., Щербо Д.С., **Шемякина И.И.**, Савицкий А.П. *Дальнекрасный FRET-сенсор для детекции активации каспазы-3*. Современные проблемы науки и образования. 2013, № 4, <http://www.science-education.ru/110-9774>

### Тезисы докладов на конференциях

1. Souslova E.A., Shcherbo D, **Shemiakina I.I.**, Lukyanov K.A., Chudakov D.M. *Novel far-red and near infra-red fluorescent proteins*. Physiology 2010 Meeting. Manchester, UK, 2010.
2. Shcherbo D., **Shemyakina I.I.**, Zraisky A.G., Davidson M.W., Luker G.D., Chudakov D.M. *Near-infrared fluorescent proteins for whole-body imaging*. III International Symposium "Topical Problems of Biophotonics". St.Petersburg – Nizhny Novgorod, Russia, 2011