

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук**

На правах рукописи

Гавриков Алексей Семенович

**Флуороген-активирующие белки для наноскопии и  
изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках**

специальность 1.5.3 Молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

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

**Научный руководитель:**

Мишин Александр Сергеевич, кандидат биологических наук

**Официальные оппоненты:**

Савицкий Александр Павлович, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии, Институт биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

Субач Федор Васильевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейронаук, Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт".

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита состоится «7» июня 2023 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 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, ул. Миклухо-Макля, д.16/10.

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

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор физико-математических наук  
В.А. Олейников**



# Характеристика работы

## **Актуальность темы исследования**

В настоящее время существует множество методов флуоресцентного мечения, основанных на разных механизмах и принципах. Активно развивается наноскопия, однако до сих пор не создано репортерных систем, пригодных для изучения белков в живых клетках, и обеспечивающих при этом достаточную для достижения высокого пространственного и временного разрешения плотность мечения, фотостабильность и молекулярную яркость меток. Для эффективного мечения многих белков желательно минимизировать размер генетически-кодируемой метки, однако подходящие для этого системы бимолекулярной комплементации в прижизненной наноскопии почти не разработаны.

Кроме визуализации внутриклеточных структур, флуоресцентное мечение используется и для изучения белок-белковых взаимодействий за счет резонансного переноса энергии (FRET) между метками. Измерение эффективности FRET с использованием флуоресцентных белков требует либо интенсивного облучения живой клетки для получения необходимых контролей, либо дорогостоящего оборудования для детекции времени жизни флуоресценции. Модулируемые акцепторы FRET могут упростить визуализацию белок-белковых взаимодействий, а также откроют возможности для длительной съемки и изучения таких взаимодействий. Однако, ряд созданных на сегодняшний день модулируемые акцепторов FRET крайне ограничен.

## **Степень разработанности области исследования**

Впервые возможность эффективной прижизненной локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения с использованием флуороген-активирующих белков была продемонстрирована в 2017 году в системе мечения на основе липокалина, разработанной в ИБХ РАН. В 2019 году система мечения на основе флуороген-активирующего белка FAST также была применена в наноскопии живых клеток. Однако, достигнутая стабильность плотности мечения и молекулярная яркость оказались недостаточными для быстрой реконструкции меченых структур в живых клетках. Помимо этого, в 2023 году были созданы новые хромофоры для белка HaloTag7, позволяющие использовать его в локализационной микроскопии, детектируя вспышки флуоресценции хромофора в момент связывания с белком.

В области разработки модулируемых FRET пар в 2016 году была показана возможность переноса энергии с флуороген-активирующего белка FAST (донор) на флуоресцентный белок (акцептор) *in vitro*. Позднее в 2021 году на примере той же системы мечения FAST был создан биосенсор на активность серин/треониновой киназы AURKA, где комплекс FAST:хромофор был использован в качестве акцептора переноса энергии. Также в литературе описаны модулируемые

светом (фотохромные) акцепторы на основе флуоресцентных белков, однако они нашли лишь ограниченное использование из-за необходимости интенсивного облучения.

### **Цели и задачи работы**

Целью данного исследования стала адаптация системы мечения на основе флуороген-активирующих белков для наноскопии и изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках.

Задачи исследования.

1. В условиях флуоресцентной микроскопии одиночных молекул определить свойства вариантов липокалина, полученных в результате рационального дизайна на основе анализа кристаллической структуры и моделирования комплекса липокалин:хромофор.
2. Разработать систему многоцветной наноскопии структур в живых клетках на основе липокалина.
3. Определить применимость систем бимолекулярной комплементации на основе липокалинов для наноскопии в живых клетках.
4. Разработать модулируемый акцептор FRET на основе комплекса липокалина с хромофором и подобрать эффективный генетически-кодируемый донор.
5. С помощью разработанной FRET пары визуализировать взаимодействие белков в живых клетках.
6. Создать модельные биосенсоры с использованием модулируемого акцептора FRET и протестировать их работу в живых клетках.

### **Научная новизна и практическая ценность работы**

На сегодняшний день, единственной системой мечения, которая сочетала бы высокую фотостабильность, возможность применения в живых клетках и субдифракционное разрешение структур в условиях локализационной микроскопии, является система мечения на основе флуороген-активирующих белков. Это семейство меток не слишком широко и включает меньше десятка систем мечения, а применимых в локализационной микроскопии среди них еще меньше. И те системы мечения, с помощью которых можно получить сверхразрешенные изображения требуют длительной съемки для получения одного субдифракционного кадра, или специального буфера для создания бескислородных условий. Система мечения на основе липокалина, рассмотренная в данной работе, превосходит все существующие системы мечения из семейства флуороген-активирующих белков в условиях наноскопии и позволяет без фиксации клеток или



специальных буферов быстро реконструировать субдифракционные кадры, также обеспечивая высокую длительность съемки.

Принцип работы многих биосенсоров, используемых для изучения белок-белковых взаимодействий в живых клетках основан на FRET с использованием флуоресцентных белков. Однако, измерение эффективности FRET в живых клетках является сложной задачей, требующей трудоемких контрольных измерений, таких как фотообесцвечивание акцептора светом высокой интенсивности. Другие подходы для количественной оценки FRET такие, как измерение времени жизни флуоресценции и измерение анизотропии флуоресценции, гораздо менее доступны для исследователей и требуют дорогостоящего оборудования.

В данной работе разработан модулируемый акцептор FRET, позволяющий исследователям получать контрольные измерения и определять эффективность FRET, используя только интенсивность флуоресценции донора. Также за счет обратимого связывания хромофора возможна многократная активация акцептора. Это, в свою очередь, позволяет измерять эффективность FRET и изучать белок-белковые взаимодействия в динамике.

### **Структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 155 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, описания полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 211 ссылок. Диссертация содержит 51 рисунок и 6 таблиц.

### **Апробация работы и публикации**

Основные материалы диссертации были изложены в виде устного доклада на всероссийской конференции XXXI Зимняя молодёжная школа ИБХ РАН (Москва, Россия, 2019 г.), в виде стендовых докладов на трех конференциях: XXIX Зимняя молодёжная школа ИБХ РАН (Москва, Россия, 2017 г.), 2-ая школа ADFLIM (Advanced fluorescence imaging methods, Санкт-Петербург, Россия, 2017), международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018» (Москва, Россия, 2018), а также в виде тезисов на международной конференции S3IC (Single-Molecule Sensors and NanoSystems International Conference, Мюнхен, Германия, 2019).

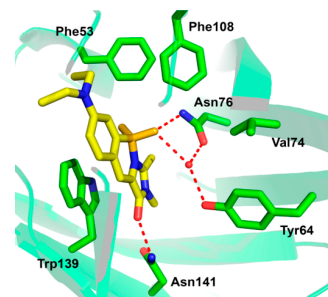
По теме диссертации опубликовано шесть статей в рецензируемых научных журналах.

## Основное содержание работы

### Рациональный дизайн улучшенных мутантов липокалина и их применение в наноскопии.

Кристаллизация липокалина DiB1 в комплексе с хромофором M739, проведенная коллегами из лаборатории рентгеноструктурных исследований биополимеров ИБХ РАН, позволила детально изучить взаимодействие хромофора с аминокислотными остатками в лиганд-связывающем кармане бактериального липокалина (Рисунок 1).

**Рисунок 1.** Сайт связывания хромофора M739 с DiB1: стэкинг-подобные взаимодействия с Trp139 и образование водородных связей с Asn141 и Asn76. Phe53, Val74, и Phe108 не взаимодействуют с хромофором M739 напрямую, но играют важную роль в его связывании с липокалинами DiB1-3. Адаптировано из [178].



Благодаря полученным данным удалось понять какие аминокислоты нужно заменить, чтобы оптимизировать связывание хромофора и улучшить фотофизические свойства комплекса.

В результате был создан ряд мутантных липокалинов с заменами, влияющими на стабильность связывания и на взаимодействие аминокислотных остатков лиганд-связывающего кармана с хромофором – DiB1/V74F, DiB1/W139S, DiB3/F53L, DiB3/F74V, DiB3/F108L, DiB3/F53L/F74L/L129M, были определены фотофизические свойства мутантов в комплексе с хромофором M739 (Таблица 1).

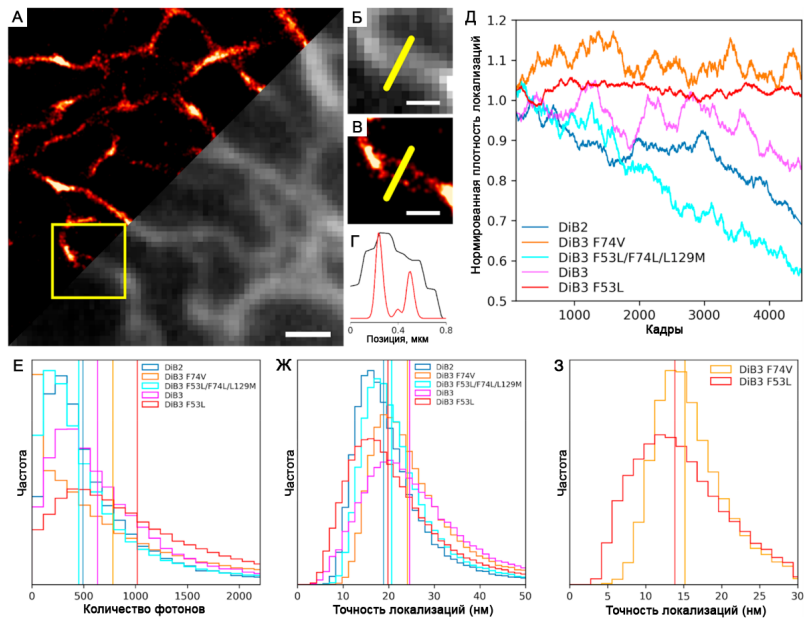
**Таблица 1.** Фотофизические свойства комплексов липокалинов с хромофором M739.

Мутант липокалина	$\lambda_{\text{возб}}$ , нм	$\lambda_{\text{эм}}$ , нм	$K_d$ , мкМ	$\epsilon$ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	QY, %
Своб. M739	520	563	н/д	53500	3.5
DiB1	513	542	0.1	45800	32
DiB2	510	539	4	51000	32
DiB3	546	565	9	45600	16
DiB1/V74F	514	542	0.4	51400	26
DiB1/W139S	520	560	н/д	н/д	н/д
DiB3/F53L	546	562	1.45	52000	26
DiB3/F74V	507	542	2.8	47600	26
DiB3/F108L	518	566	8	51000	9
DiB3/F53L/F74L/L129M	509	546	1.2	65700	51

Комплекс тройного мутанта DiB3/F53L/F74V/L129M с хромофором M739 показал самый большой квантовый выход флуоресценции (51%). Два других мутанта DiB3/F74V и DiB3/F53L представляют интерес за счет того, что, связывая один и тот же хромофор M739, они имеют спектры эмиссии с разницей между пиками ~20 нм, а также сдвиг максимума возбуждения у мутанта DiB3/F74V в зеленую область. На основе константы диссоциации комплексов, коэффициентов молярной экстинкции и квантовых выходов флуоресценции для дальнейшей работы были отобраны три варианта липокалина: DiB3/F53L, DiB3/F74V и DiB3/F53L/F74L/L129M.

Для оценки применимости вариантов липокалина в наноскопии были получены субдифракционные изображения меченого виментина в живых клетках, измерены параметры молекулярной яркости, точности локализации и стабильности мечения. Так, липокалин DiB3/F53L (Рисунок 2, А-Г) продемонстрировал четкое разрешение волокон по сравнению с дифракционно-лимитированным изображением.

**Рисунок 2.** Локализационная микроскопия сверхвысокого разрешения с липокалинами нового и старого поколения. (А-Д) Микроскопия живых клеток *HeLa* Куото временно трансфицированных конструкцией, кодирующей белок слияния виментина с липокалином DiB3/F53L в присутствии 15 нМ хромофора M739. Широкопольное изображение (Б) и сверхразрешенная реконструкция (В) по 5000 кадров; масштабные линейки 0.5 мкм. (Г) Нормированные профили интенсивности флуоресценции, взятые по желтым линиям на широкопольном и субдифракционном изображении (Б и В); черная кривая – широкопольное изображение; красная кривая – сверхразрешенное изображение. (Д) Стабильность плотности локализаций мутантов DiB3 нового поколения и сравнение с липокалинами старого поколения DiB2 и DiB3. График показывает нормированное число локализаций на протяжении съемки (поле зрения облучали 488 нм лазером мощностью 1.1 кВт\*см<sup>-2</sup> при съемке виментина, меченого DiB2, DiB3/F74V, и DiB3/F53L/F74L/L129M и 561 нм лазером мощностью 1.4 кВт\*см<sup>-2</sup> в случае виментина меченого DiB3 и DiB3/F53L). (Е) Гистограмма детектированных фотонов на каждую локализацию; вертикальные линии обозначают медианные значения фотонов. (Ж) Гистограмма точности



*определения локализаций в живых клетках; вертикальные линии обозначают медианные значения точности определения локализаций. (3) Гистограмма точности определения локализаций в фиксированных клетках; вертикальные линии обозначают медианные значения точности определения локализаций.*

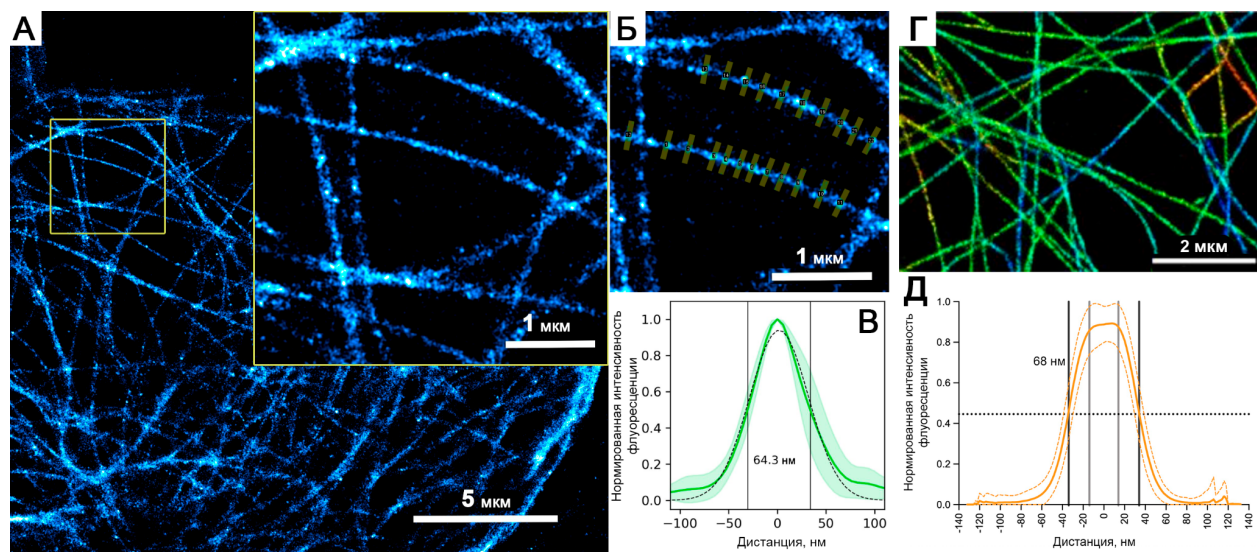
Видно, что мутанты DiB3/F74V и DiB3/F53L показывают лучшую стабильность мечения относительно мутанта DiB3/F53L/F74L/L129M и липокалинов DiB2 и DiB3 (Рисунок 2, Д). Вместе с тем, DiB3/F74V и DiB3/F53L обладают заметно большей яркостью на уровне одиночных молекул (Рисунок 2, Е). По точности определения локализаций в живых клетках липокалин DiB3/F53L превосходит спектрально близкий липокалин DiB3 (Рисунок 2, Ж).

Соотношение сигнал/шум определяет влияние на точность локализации флуоресценции одиночных молекул. Неспецифическое связывание хромофора M739 с мембраной приводит к появлению флуоресценции, снижающей соотношение сигнал/шум в зеленом (до 561 нм) канале детекции сигнала, при возбуждении лазером 488, в то время как комплекс DiB3/F53L:M739 возбуждается лазером 561 нм, что снижает фоновую флуоресценцию хромофора, связанного в мембране. Также вариант DiB3/F53L превосходит спектрально близкий родительский белок DiB3 по показателям молекулярной яркости и стабильности плотности мечения, что делает вариант DiB3/F53L оптимальной меткой для прижизненной наноскопии.

По сравнению с виментином (промежуточные филаменты), микротрубочки тоньше и представляют собой более сложную структуру для визуализации. С помощью системы мечения на основе липокалина DiB3/F53L и хромофора M739 в условиях локализационной микроскопии было проведено мечение и съемка микротрубочек с помощью мечения ассоциированного с тубулином белка энсконсина (Рисунок 3, А-В). Полуширина наиболее тонких волокон составила ~64.3 нм. Для сравнения приведена реконструкция микротрубочек, меченных антителами в фиксированных клетках близкая к пределу качества, которое можно получить в условиях стандартной локализационной микроскопии на данный момент (Рисунок 3, ГД<sup>1</sup>), где полуширина микротрубочек составила ~68 нм. Таким образом, мечение с использованием липокалина DiB3/F53L в живых клетках не уступает системам мечения, совместимым только с фиксированными клетками.

---

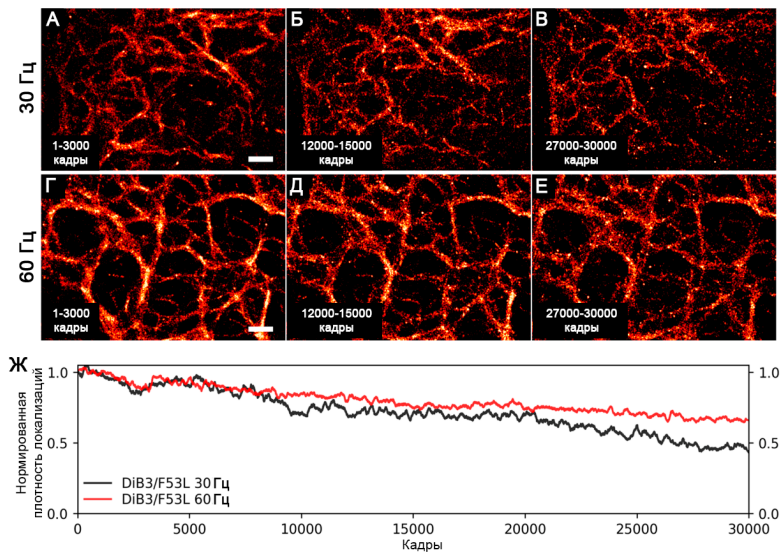
<sup>1</sup> Jimenez A., Friedl K., Leterrier C. About samples, giving examples: Optimized Single Molecule Localization Microscopy // *Methods*. 2020. Vol. 174. P. 100–114.



**Рисунок 3.** Сравнение сверхразрешения полученного с помощью нашей системы мечения и с помощью антител (А). Клетки HeLa Kyoto были временно трансфицированы конструкцией, кодирующей белок слияния энконсина с липокалином DiB3/F53L. Реконструкция проводилась по 10000 кадрам, снятым с частотой 60 Гц. Мощность 561 нм лазера составляла  $\sim 1 \text{ кВт} \cdot \text{см}^{-2}$ . Концентрация хромофора в растворе составляла 20 нМ. (Б) Увеличенная область с микротрубочками, для которых была измерена ширина. (В) Усредненный профиль интенсивности флуоресценции. Вертикальные линии обозначают ширину пика при половине интенсивности. Яркая зеленая линия обозначает среднее значение, полупрозрачная область обозначает стандартное отклонение ( $n=22$ ). Черный пунктир соответствует функции Гаусса, на которую проводилось фитирование. Усреднение профилей проводилось по областям, обозначенным желтыми прямоугольниками на фигуре (Б). (Г) Микротрубочки, окрашенные антителами в фиксированной клетке COS. (Д) Профиль интенсивности, аналогичный профилю (В).

В условиях длительной наноскопии липокалин DiB3/F53L сохраняет высокую плотность мечения, что позволяет визуализировать субдифракционные волокна в живых клетках HeLa Kyoto на протяжении более чем 15 минут (Рисунок 4).

**Рисунок 4.** Длительная съемка виментина в живых клетках HeLa Kyoto при разной выдержке в присутствии 15 нМ хромофора M739. Клетка временно трансфицирована конструкцией, кодирующей белок слияния виментина и DiB3/F53L. (А-В) Съемка с частотой 30 Гц, 30000 кадров (~16.7 минут непрерывной съемки), мощность 561 нм лазера 1.4 кВт\*см<sup>-2</sup>. Реконструкцию субдифракционных изображений проводили по трем тысячам кадров из



начала, середины и конца серии; масштабные линейки 1 мкм. (Г-Е) Съемка с частотой 60 Гц, 30000 кадров (~8.35 минут непрерывной съемки), мощность 561 нм лазера 1.4 кВт\*см<sup>-2</sup>. (Ж) Стабильность количества локализаций на протяжении длительных съемок меченого виментина в живых клетках.

Хотя ранее были попытки увеличить длительность съемки в условиях наноскопии, такие попытки сопровождались неизбежным падением плотности локализаций со временем из-за необратимого фотообесцвечивания метки. Таким образом, система мечения на основе липокалина DiB3/F53L и хромофора M739 подходит не только для получения высокого пространственного разрешения, но и добавляет к этому возможность временного разрешения на протяжении более чем 15 минут.

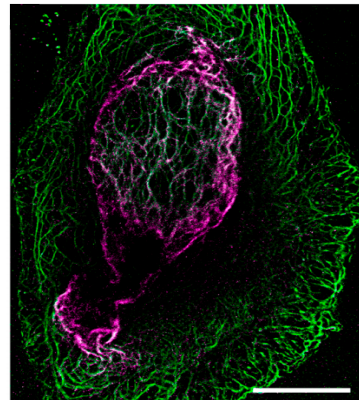
#### **Двухцветное мечение с помощью липокалинов нового поколения.**

Липокалины DiB3/F53L и DiB3/F74V в комплексе с хромофором M739 отличаются по положению максимумов возбуждения и эмиссии (~40 нм между пиками возбуждения и ~20 нм между пиками эмиссии флуоресценции, Таблица 1). Такая спектральная разница может позволить детектировать эти варианты липокалина в разных каналах и эффективно разделять их локализации.

Действительно, при коэкспрессии кератина-DiB3/F74V и виментина-DiB3/F53L сигналы детектировались в разных каналах. В результате удалось получить субдифракционное изображение живой клетки с меченым виментином и кератином (Рисунок 5). Таким образом, спектральные отличия флуоресценции комплексов хромофора M739 с липокалинами DiB3/F74V и DiB3/F53L оказались достаточными для того, чтобы провести одновременную съемку двух меченых структур в живых клетках с использованием одного и того же хромофора.



**Рисунок 5.** Двухцветная локализационная микроскопия виментина и цитокератина в живых клетках HeLa Kyoto. Клетки временно трансфицированы конструкциями, кодирующими белки слияния виментина с липокалином DiB/F53L и цитокератина с липокалином DiB3/F74V. Съемку проводили в присутствии 15 нМ M739 хромофора. Изображение реконструировано по 10 000 кадров (частота съемки 30 Гц, цикл съемки: 100 кадров при облучении 488 нм лазером мощностью 1.8 кВт\*см<sup>-2</sup>, 100 кадров при облучении 561 нм лазером мощностью 1.3 кВт\*см<sup>-2</sup>).

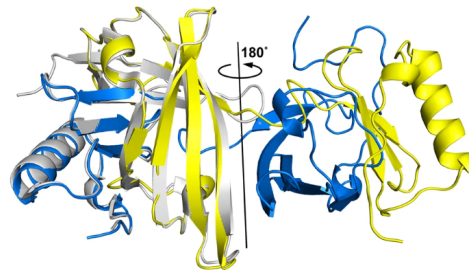


### Сплит-система на основе липокалинов DiB2 и DiB-RM.

Кристаллизация мутанта DiB1 в комплексе с хромофором M739 позволила лучше понять структурные характеристики липокалинов и провести рациональный мутагенез по аминокислотам, участвующим во взаимодействии с хромофором. Вместе с этим, используя знания об участвующих в связывании хромофора аминокислотах, в ИБХ РАН ранее провели компьютерное моделирование вариантов липокалина. Таким образом, был предложен и охарактеризован *in vitro* липокалин DiB-RM (Rosetta Mutant, таблица 2), содержащий мутации F44A, N67F, S79Y, E80V, S98A относительно DiB1.

Параллельно с этим в центре структурной биологии университета Вандербильта (США) был получен кристалл апо-формы мутанта DiB3. Интересно, что липокалины развернулись в двухдоменную структуру и образовали димер (Рисунок 6). Однако, структуры, получившиеся из N- и C-концов разных полипептидных цепей, представляют собой практически неизменный липокалиновый фолд.

**Рисунок 6.** Кристаллическая структура димера липокалинов DiB3 (синяя и желтая структуры) наложенная на структуру дикого типа липокалина Vlc (светло-серая структура, PDB-ID: 1QWD).



Такое поведение в кристалле липокалина DiB3 натолкнуло коллег из центра структурной биологии на мысль, что DiB3 и другие мутанты имеют две относительно автономные стабильные части (с 1 по 108 и с 114 по 177 аминокислоты). Таким образом, было решено попробовать создать системы бимолекулярной комплементации из вариантов DiB1, DiB2, DiB3 и DiB-RM, внося разрыв в полипептидную цепь между 109 и 110 аминокислотами. Все четыре сплит-системы оказались способны связывать хромофор M739 и усиливать его флуоресценцию (Таблица 2).

**Таблица 2.** Физико-химические свойства сплит систем на основе мутантов DiB1, DiB2 и DiB3 в сравнении с полноразмерными белками и свободным хромофором M739. Данные получены в центре структурной биологии университета Вандербильта (США)

Мутант липокалина	$\lambda_{\text{возб}}$ , нм	$\lambda_{\text{эм}}$ , нм	$K_d$ , мкМ	$\epsilon$ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	QY, %
DiB1 <sup>a</sup>	513	542	0.1	45800	32
DiB1-сплит	516	543	$0.08 \pm 0.03$	50150	32
DiB2 <sup>a</sup>	510	539	4	51000	37
DiB2-сплит	509	535	$9 \pm 0.9$	49200	<b>50</b>
DiB3 <sup>a</sup>	546	565	9	45600	15
DiB3-сплит	533	558	$14.1 \pm 2.8$	57300	16
DiB-RM	511	543	$0.17 \pm 0.04$	56000	<b>59</b>
DiB-RM-сплит	517	548	$2.8 \pm 0.4$	59400	<b>59</b>
Своб. M739 <sup>a</sup>	520	563	н/д	53500 <sup>a</sup>	3.5

<sup>a</sup> – данные взяты из Muslinkina L. et al. Structure-Based Rational Design of Two Enhanced Bacterial Lipocalin B1c Tags for Protein-PAINT Super-resolution Microscopy // ACS Chem. Biol. 2020.

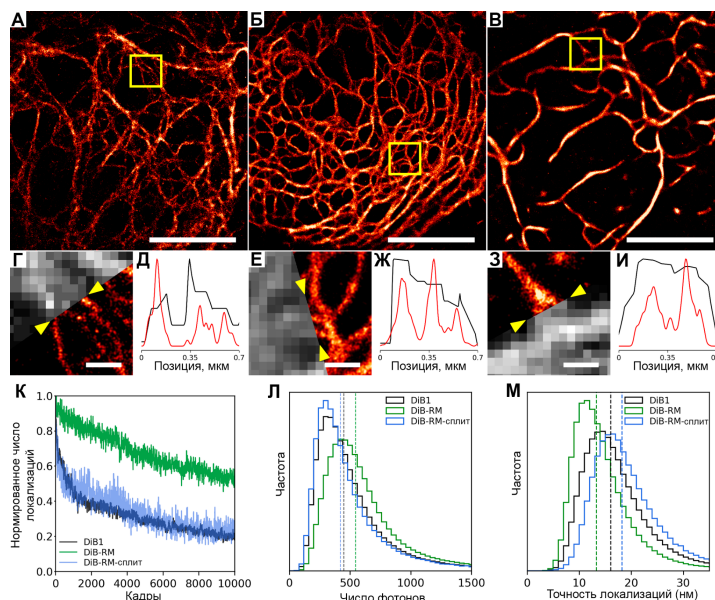
Полученная сплит-система на основе варианта DiB-RM по фотофизическим свойствам, как и полноразмерный DiB-RM, значительно превосходит DiB1. Среди сплит-систем на основе ранее разработанных липокалинов DiB1/2/3 только сплит-система на основе DiB2 показала прирост в квантовом выходе флуоресценции (50% у DiB2-сплит против 37% у полноразмерного DiB2) при сравнимом коэффициенте экстинкции. Поэтому для тестов в условиях наноскопии в живых клетках были отобраны сплит-системы на основе липокалина DiB2 и DiB-RM как потенциально более яркие.

DiB-RM и сплит на его основе тестировали в сравнении с белком DiB1, а сплит-систему DiB2 сравнивали с полноразмерным липокалином DiB2.

С помощью систем мечения на основе DiB-RM были получены субдифракционные изображения виментина в живых клетках (Рисунок 7, А-И). По стабильности плотности мечения, молекулярной яркости полноразмерный DiB-RM превосходит DiB-RM-сплит и DiB1 (Рисунок 28, К-М). Сплит-система на основе DiB-RM по этим показателям оказалась не хуже липокалина DiB1.



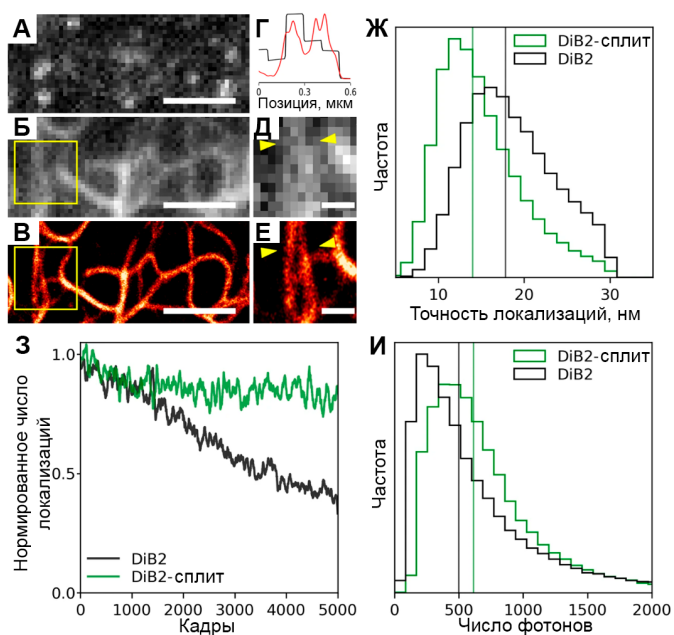
**Рисунок 7.** Сравнение DiB1, DiB-RM, и DiB-RM-сплит в условиях локализационной микроскопии живых клеток. Клетки HeLa временно трансфицированные конструкциями виментин-DiB1 (А, Г, Д), виментин-DiB-RM (Б, Е, Ж), и котрансфицированные конструкциями виментин-DiB-RM-сплитN1-109 + DiB-RM-сплитC110-177-TagBFP (В, З, И) в присутствии 20 нМ хромофора M739. Условия съемки: частота съемки 30 Гц, мощность 488 нм лазера 1.1 кВт см<sup>2</sup>. (А-В) Сверхразрешенная реконструкция по 10 000 кадров, масштабная линейка составляет 5 мкм. (Г, Е, З) Проекция средней яркости по 1 000 кадров и реконструкция по 10 000 кадров; масштабные линейки составляют 0.5 мкм. (Д, Ж, И) Нормализованные профили интенсивности между желтыми стрелками, показанными на панелях (Г, Е, З); кривая черного цвета – широкополный профиль и кривая красного цвета – сверхразрешенный профиль. (К-М) Сравнение характеристик DiB1, DiB-RM и DiB-RM-сплит в условиях локализационной микроскопии (усредненные по 7 клеткам). (К) Фотостабильность в условиях локализационной микроскопии. (Л) Количество детектированных фотонов на каждую вспышку флуоресценции; вертикальные линии соответствуют медианным значениям. (М) Гистограмма точности локализаций; вертикальные линии соответствуют медианные значения.



В случае DiB2-сплита оказалось, что использование положения разрыва между 109 и 110 аминокислотами приводит к агрегации фрагмента N<sub>1-109</sub> при экспрессии белка слияния с TagBFP в клетках млекопитающих. Смещение точки разрыва на один бета слой (в положение 125-126) привело к уменьшению степени агрегации полученного N<sub>1-125</sub> фрагмента. В результате тестирования различных фрагментов была найдена рабочая пара N<sub>1-125</sub> и C<sub>110-177</sub>, обладающая перекрытием последовательностей, которое вероятно стабилизирует структуру сплита в собранном виде.

Так же как и полноразмерный DiB2, DiB2-сплит может быть использован как метка для сверхразрешения (Рисунок 8, А-Е). DiB2-сплит показывает более высокую яркость на уровне одиночных молекул и увеличенную стабильность плотности мечения, чем у полноразмерного белка (Рисунок 25, Л-Н).

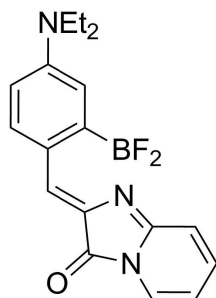
**Рисунок 8.** Применение сплит-системы на основе липокалина DiB2 в наноскопии. (А), проекция по средней яркости 2 000 кадров (Б) и реконструкция (В) по 10 000 тысячам кадров живых клеток HeLa Kyoto временно котрансфицированных парой конструкций виментин-сплит $N_{1-125}$  + сплит $C_{110-177}$ -TagBFP в присутствии хромофора M739 в концентрации 25 нМ; масштабная линейка составляет 2 мкм. (Г) Нормализованный профиль интенсивности между желтыми стрелками на широкопольной (Д) и сверхразрешенной (Е) области панелей (Б) и (В); кривая черного цвета – широкопольный профиль, кривая красного цвета – профиль сверхразрешения; масштабные линейки составляют 500 нм. Сравнение DiB2-сплита и полноразмерного липокалина DiB2 в условиях локализационной микроскопии (условия: частота съемки 30 Гц, мощность лазера 488 нм 1.1 кВт см<sup>-2</sup>) (Ж–И) на примере белка слияния с виментином. (Ж) Гистограмма точности локализаций; вертикальные линии соответствуют медианным значениям. (З) Сравнение фотостабильности; график показывает нормализованное число локализаций на кадр. (И) Гистограмма детектированных фотонов на каждую единичную вспышку флуоресценции; вертикальные линии соответствуют медианным значениям.



Таким образом, полученная сплит-система на основе липокалина DiB2 применима в условиях локализационной микроскопии, превосходит полноразмерный белок по показателям молекулярной яркости и стабильности мечения и может успешно использоваться там, где необходим небольшой размер метки (минимальный фрагмент сплит-системы DiB2 – 67 аминокислот).

### Дальнекрасный комплекс липокалина и хромофора mka67.

Для разработки FRET пары с модулируемым акцептором было решено найти дальнекрасный акцептор на основе липокалина. Ранее наши коллеги из лаборатории биофотоники ИБХ РАН совместно с группой химии гетероциклических соединений ИБХ РАН в результате скрининга вариантов липокалина с новыми синтетическими красными хромофорами нашли дальнекрасный комплекс липокалин DiB1 с хромофором mka67 (Рисунок 9, Таблица 3), который был успешно применен для флуоресцентного мечения структур в живых клетках в условиях широкопольной микроскопии.



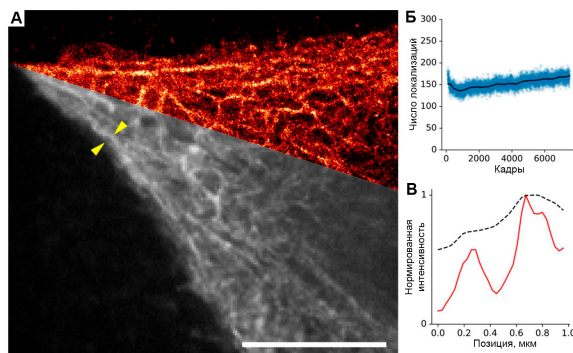
**Рисунок 9.** Структура хромофора *mka67*.

**Таблица 3.** Физико-химические свойства хромофора *mka67* в свободном виде и в комплексе с DiB1.

Мутант липокалина	$\lambda_{\text{возб}}$ , нм	$\lambda_{\text{эм}}$ , нм	$K_d$ , мкМ	$\epsilon$ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	QY, %
DiB1	605	625	0.09	55 000	29
Своб. <i>mka67</i>	603	626	н/д	55 000	12

Подобно зеленым парам липокалин-флуороген M739, обратимый комплекс DiB1 и *mka67* можно использовать в качестве двухсоставной метки в условиях локализационной микроскопии в живых клетках. Мы протестировали комплекс DiB1:*mka67* в составе белка слияния с цитокератином в условиях локализационной микроскопии (Рисунок 10). В результате было получено субдифракционное изображение цитокератина в живой клетке. Количество локализаций по ходу съемки оставалось стабильным.

**Рисунок 10.** Локализационная микроскопия клеток *HeLa Kyoto* временно трансфицированных конструкцией цитокератин-18-DiB1. Съемка проходила в присутствии 15 нМ хромофора *mka67*. (А) Широкопольная картинка, полученная усреднением интенсивности 3000 кадров (снизу) и сверхразрешенная реконструкция по 3000 кадрам (сверху); масштабная линейка составляет 10 мкм. (Б) График числа локализаций на каждый кадр.



Кадры делались с выдержкой 16 мс, мощность облучения 561 нм лазером составляла  $60 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$ . (В) Нормализованные профили интенсивности между желтыми стрелками, показанными на широкопольной картинке; кривая черного цвета - широкопольное изображение, кривая красного цвета - сверхразрешенное изображение.

## Скрининг и отбор FRET пар.

Положение пика возбуждения дальнекрасного комплекса DiB1:mka67 позволит создавать зелено-красные FRET пары, в то время как зеленые комплексы липокалина с хромофором M739 требуют синих или голубых флуоресцентных белков, что сужает область поиска потенциальных доноров.

Для поиска эффективной FRET пары необходимо было провести первичный скрининг пар липокалинов с флуоресцентными белками из разных областей спектра. Для этого были созданы конструкции, кодирующие белки слияния разных флуоресцентных белков с разными мутантами липокалина. Линкер был выбран длиной 15 аминокислот, этого достаточно, чтобы белки были довольно близко друг к другу, но в то же время их взаимная ориентация не была блокирована в узком диапазоне положений. Данные конструкции были использованы для экспрессии белков в бактериях и последующего выделения белков для анализа *in vitro*.

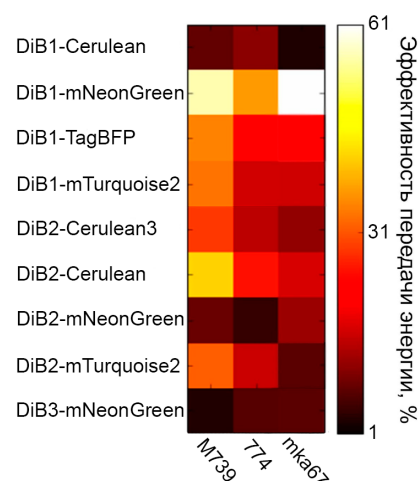
В качестве донорных флуоресцентных белков были взяты синий флуоресцентный белок TagBFP, голубые флуоресцентные белки Cerulean, mCerulean3 и mTurquoise2 и зеленый флуоресцентный белок mNeonGreen. Выбор данных белков в качестве доноров был продиктован высокими показателями квантового выхода флуоресценции и времени жизни флуоресценции, которые необходимы для высокой эффективности FRET.

В качестве акцепторных липокалинов были взяты липокалина DiB1, DiB2 и DiB3. В качестве хромофоров для них были взяты зеленые хромофоры M739, 774 и красный хромофор mka67.

Выделенные белки слияния флуоресцентных белков с липокалинами были протестированы *in vitro*, эффективность переноса энергии была определена путем сравнения спектра эмиссии донора FRET до и после добавления хромофора (активации акцептора).

Среди всех FRET пар выделяется пара mNeonGreen-DiB1:mka67, показавшая самую высокую эффективность ~60% (Рисунок 11).

**Рисунок 11.** Скрининг эффективности резонансного переноса энергии от флуоресцентных белков к комплексам липокалинов с хромофорами *in vitro*. Значения эффективности переноса энергии в процентах в каждой паре белок (строки) - хромофор (столбцы) приведены с использованием цветовой шкалы справа.



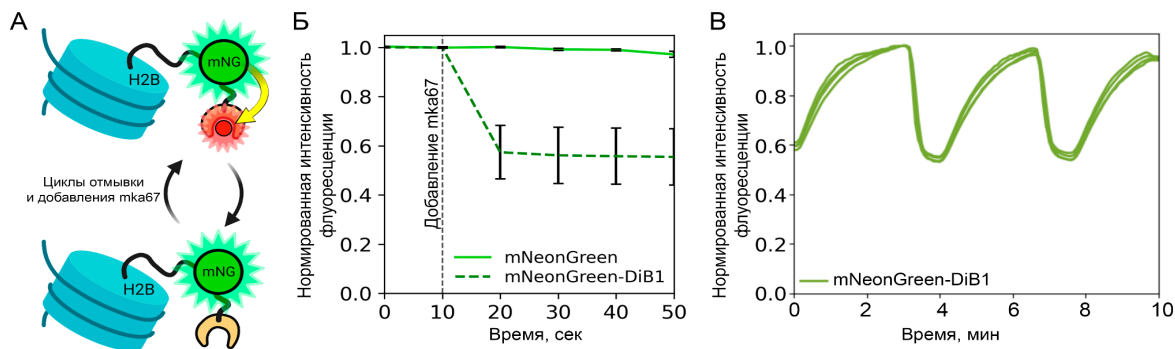
Данная пара была отобрана для дальнейшей

характеристики в качестве FRET пары с самой большой эффективностью среди протестированных.

Было решено протестировать эффективность найденной пары в живых клетках и продемонстрировать модулируемость акцептора. Для этого были созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие белок слияния гистона H2B, флуоресцентного белка mNeonGreen и липокалина DiB1 (Рисунок 12, А), а также контрольная конструкция H2B-mNeonGreen без липокалина DiB1. Была проведена временная трансфекция клеток HeLa и съемка в условиях широкопольной микроскопии до и после добавления хромофора mKa67, а также при циклической отмывке и добавлении хромофора.

В результате эффективность переноса в живых клетках составила ~45% (Рисунок 12, БВ). Также мы видим, что в клетках с контрольной конструкцией изменения интенсивности флуоресценции mNeonGreen не происходит, что свидетельствует о том, что хромофор mKa67 никак не влияет в свободном виде на флуоресценцию белка mNeonGreen в живых клетках.

При использовании перфузионной системы можно достигнуть быстрого модулирования акцептора в минутной шкале (Рисунок 12, В). Средняя эффективность FRET в повторяющихся циклах активации-деактивации акцептора соответствует полученной эффективности FRET в живых клетках при однократном добавлении хромофора (Рисунок 12, Б).



**Рисунок 12.** Измерение эффективности переноса энергии в паре *mNeonGreen-DiB1:mKa67* в живых клетках и демонстрация модулируемости акцептора. (А) Схема белка слияния гистона H2B и FRET пары *mNeonGreen-DiB1* и циклов активации и деактивации акцептора; желтая стрелка обозначает перенос энергии. (Б) Нормированная интенсивность флуоресценции донора *mNeonGreen* в живых клетках HeLa временно трансфицированных конструкцией, кодирующей H2B-*mNeonGreen* (зеленая сплошная линия) и H2B-*mNeonGreen-DiB1* (зеленая прерывистая линия); вертикальная прерывистая линия показывает момент добавления хромофора *mKa67* до финальной концентрации 3 мкМ; “усы” показывают стандартное отклонение (число технических повторностей = 23). (В) Профиль интенсивности флуоресценции *mNeonGreen* при циклической активации акцептора хромофором *mKa67* в живых клетках HeLa временно трансфицированных конструкцией, кодирующей H2B-*mNeonGreen* (Каждая зеленая линия соответствует средней интенсивности в ядре клетки, всего 4 ядра, скорость потока 120 мкл/мин).



Таким образом, FRET пара mNeonGreen-DiB1:mka67 показала высокую эффективность переноса энергии в живых клетках. Также была подтверждена модулируемость акцептора, которая позволяет измерять FRET в динамике с множеством контрольных точек.

### Изучение белок-белковых взаимодействий с помощью FRET пары mNeonGreen-DiB1:mka67.

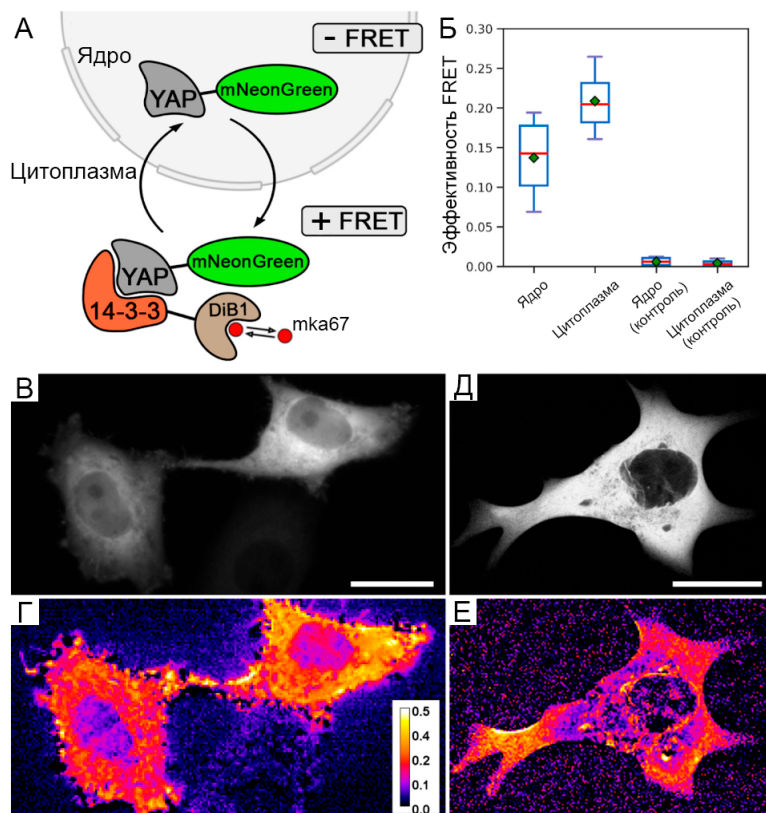
Далее FRET пара mNeonGreen-DiB1 с хромофором mka67 была применена для изучения белок-белковых взаимодействий и в составе биосенсоров.

В качестве целевых белков для изучения белок-белковых взаимодействий были выбраны 14-3-3 и YAP1. Известно, что эти белки взаимодействуют в цитоплазме, однако, с помощью FRET в условиях флуоресцентной микроскопии взаимодействие 14-3-3 и YAP1, по нашим данным, не было показано.

Как и ожидалось, эффективность FRET оказалась выше в цитоплазме (Рисунок 13, Б). В контрольных экспериментах с свободным акцептором DiB1 в цитоплазме интенсивность флуоресценции mNeonGreen при добавлении хромофора mka67 не менялась. Данный эксперимент был проведен в условиях широкопольной флуоресцентной и конфокальной микроскопии (Рисунок 13, В-Е)

#### Рисунок 13. Детекция

взаимодействия белков YAP1 и 14-3-3 в живых клетках. Линия клеток HeLa Kyoto, временно экспрессирующих (котрансфекция) YAP1-mNeonGreen и 14-3-3-DiB1. (А) Схема взаимодействия YAP1 с 14-3-3 в клетке. (Б) Эффективность FRET в ядре и цитоплазме в живых клетках при котрансфекции YAP1-mNeonGreen + 14-3-3-DiB1 и при контрольной котрансфекции YAP1-mNeonGreen + DiB1. Зеленые ромбики показывают средние значения, красные линии показывают медианные значения. (В) Широкопольное изображение живых клеток HeLa Kyoto, временно котрансфицированных конструкциями YAP1-mNeonGreen и 14-3-3-DiB1. (Г)



Визуализация эффективности FRET в клетках с панели (В); Псевдоцвета отражают эффективность FRET после добавления хромофора *tka67*. Масштабная линейка 20 мкм. (Д) Конфокальное изображение живой клетка HeLa Kyoto, временно котрансфицированной конструкциями *YAP1-mNeonGreen* и *14-3-3-DiB1*. (Е) Визуализация эффективности FRET в клетке с панели (Д); Псевдоцвета отражают эффективность FRET после добавления хромофора *tka67* (Панели Г и Е имеют один и тот же масштаб цветовой шкалы); масштабная линейка 20 мкм.

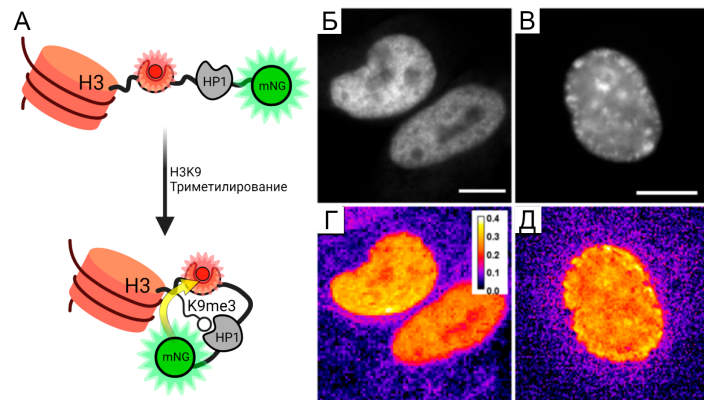
В результате впервые было наглядно показано взаимодействие YAP1 с 14-3-3 в цитоплазме живых клеток HeLa Kyoto в условиях широкопольной и конфокальной микроскопии, а также была подтверждена возможность использования FRET пары mNeonGreen-DiB1:mka67 для детекции белок-белковых взаимодействий.

### Биосенсоры на основе FRET пары mNeonGreen-DiB1.

Далее на основе разработанной FRET пары были созданы два биосенсора: на эпигенетическую модификацию H3K9me3 и на натяжение в фокальных контактах.

Биосенсор на триметилирование гистона H3 осуществляет свою функцию за счет сенсорного домена HP1, распознающего модификацию H3K9me3 (Рисунок 14, А). Адаптированный биосенсор был протестирован в живых клетках HeLa Kyoto.

**Рисунок 14.** Тестирование биосенсора на H3K9 триметилирование. (А) Схема работы биосенсора на H3K9 триметилирование с FRET парой на основе донора mNeonGreen и акцептора липокалина DiB1 с хромофором *tka67*. Живые клетки HeLa Kyoto, временно трансфицированные конструкцией *mNeonGreen-HP1-DiB1-H3*. (Б, В)



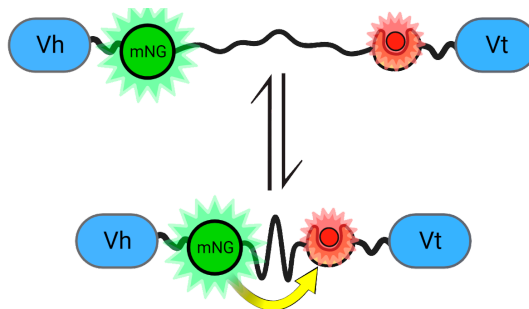
Широкопольные изображения живых клеток HeLa Kyoto, временно трансфицированных конструкцией, кодирующей модифицированный H3K9me3 биосенсор; масштабные линейки 5 мкм. (Г, Д) Визуализация эффективности FRET; Псевдоцвета отражают эффективность FRET после добавления 3 мкМ хромофора *tka67*. Панели (В) и (Г) имеют один и тот же масштаб цветовой шкалы эффективности FRET.

В результате была выявлена высокая эффективность переноса энергии в интерфазных ядрах клеток, при этом эффективность FRET распределялась по ядрам неравномерно, средняя эффективность FRET составила от 25 до 35% (Рисунок 14, ГД). Такое распределение

эффективности переноса энергии соответствует ожиданиям, поскольку модификация H3K9me3 локализована в основном в гетерохроматине, который неоднородно распределен по всему ядру клетки.

Механосенсор был выбран для демонстрации применимости модулируемого акцептора для изучения динамики натяжения в фокальных контактах в живых клетках. Схема работы сенсора с модулируемым акцептором показана на рисунке 15.

**Рисунок 15.** Схема работы биосенсора на натяжение с FRET парой на основе донора mNeonGreen и акцептора липокалина DiB1 с хромофором mka67. Vh и Vt - части винкулина. Рисунок схематично показывает изменение пространственной конфигурации биосенсора при увеличении и уменьшении натяжения.



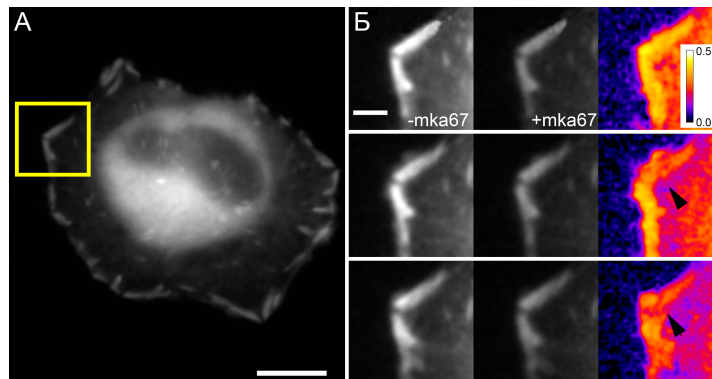
На данной схеме видно, что при сильном натяжении донор и акцептор расположены далеко друг от друга и эффективность FRET мала. Обратная ситуация наблюдается, когда натяжение слабое и линкер свернут, а донор находится близко к акцептору.

Для съемки FRET в динамике трансфицированные адаптированным биосенсором HeLa Kyoto были пересажены в специальный слайд с каналом для подачи и отвода клеточной среды. Съемка проводилась с поочередным добавлением и отмывкой хромофора mka67. Соответственно, полученные в каждом цикле кадры меченых фокальных контактов с mNeonGreen с и без хромофора делились друг на друга для получения картины эффективности переноса энергии.



В результате эксперимента удалось с помощью биосенсора с модулируемым акцептором снять динамическое изменение натяжения в фокальных контактах живой клетки HeLa Kyoto (Рисунок 16).

**Рисунок 16.** Генетически кодируемый механосенсор на основе модулируемого акцептора FRET. (А) Живая клетка линии HeLa Kyoto временно трансфицированная сенсором на натяжение, широкопольная флуоресцентная микроскопия в зеленом канале донора *mNeonGreen*. Масштабная линейка 20 мкм. Желтым квадратом выделена отдельная область фокальных контактов.



(Б) Отдельная область фокальных контактов, снятая во времени в канале донора *mNeonGreen* при динамическом добавлении и отмывке хромофора *mka67*. Стрелками указаны некоторые области, в которых заметно изменение соотношения FRET между двумя областями фокальных контактов, имеющими при этом сравнимую яркость в канале донора *mNeonGreen*. Масштабная линейка 3 мкм. Эффективность FRET показана в псевдоцветовой шкале.

Видно, что эффективность FRET в фокальных контактах со временем изменяется, что свидетельствует об изменении натяжения в тех местах. Таким образом, с помощью механосенсора с модулируемым акцептором удалось визуализировать динамику изменения эффективности FRET и натяжения в фокальных контактах живой клетки с временным разрешением в минутной шкале.

## Выводы

1. При детекции флуоресценции одиночных молекул, комплекс DiB3/F53L с флуорогеном M739 в живых клетках обладает наибольшей молекулярной яркостью (медиана – ~1 тыс. фотонов на кадр 33 мс) среди всех флуороген-активирующих белков на основе липокалина. Показано сохранение высокой плотности мечения в живых клетках на протяжении более 15 минут съемки, позволяющее разрешать пространственную динамику цитоскелета с субдифракционным разрешением.
2. Впервые была проведена двухцветная наноскопия структур в живой клетке с использованием генетически кодируемых меток за счет спектральных отличий комплексов хромофора M739 с флуороген-активирующими белками DiB3/F74V и DiB3/F53L.
3. Системы бимолекулярной комплементации DiB2-сплит и DiB-RM-сплит демонстрируют потенциал липокалинового фолда для создания более компактной флуороген-активирующей метки для сверхразрешающей микроскопии в живых клетках, что делает ее хорошей заменой полноразмерных липокалинов в случаях, когда размер молекулярной метки влияет на функционирование меченного белка.
4. Создан модулируемый акцептор FRET на основе липокалина DiB1 и хромофора tka67, и выбрана FRET-пара с эффективностью резонансного переноса энергии, достигающей 61% *in vitro* и 45% в живых клетках. Добавление и отмывка хромофора позволяет проводить многократные циклы модуляции акцептора FRET в минутной шкале времени и определять эффективность резонансного переноса энергии с использованием лишь одного канала детекции флуоресценции.
5. С помощью созданной FRET пары с модулируемым акцептором впервые в условиях флуоресцентной микроскопии показано взаимодействие белков 14-3-3 и YAP1 в живых клетках.
6. На основе новой FRET пары с модулируемым акцептором были созданы индикатор на эпигенетическую модификацию H3K9me3 и индикатор натяжения в фокальных контактах на основе винкулина. Также была продемонстрирована динамика изменения натяжения в фокальных контактах живой клетки.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи

1. **Gavrikov A.S.**, Bozhanova N.G., Baranov M.S., Mishin A.S. Add and Go: FRET Acceptor for Live-Cell Measurements Modulated by Externally Provided Ligand // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23, № 8. P. 4396.
2. Bozhanova N.G., Harp J.M., Bender B.J., **Gavrikov A.S.**, Gorbachev D.A., Baranov M.S., Mercado C.B., Zhang X., Lukyanov K.A., Mishin A.S., Meiler J. Computational redesign of a fluorogen activating protein with Rosetta // PLOS Computational Biology. 2021. Vol. 17, № 11. P. e1009555.
3. **Gavrikov A.S.**, Baranov M.S., Mishin A.S. Live-cell nanoscopy with spontaneous blinking of conventional green fluorescent proteins // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2020. Vol. 522, № 4. P. 852–854.
4. Muslinkina L.\*, **Gavrikov A.S.\***, Bozhanova N.G., Mishin A.S., Baranov M.S., Meiler J., Pletneva N.V., Pletnev V.Z., Pletnev S. Structure-Based Rational Design of Two Enhanced Bacterial Lipocalin Blc Tags for Protein-PAINT Super-resolution Microscopy // ACS Chem. Biol. 2020. Vol. 15, № 9. P. 2456–2465.  
\* - равный вклад авторов
5. Bozhanova N.G., **Gavrikov A.S.**, Mishin A.S., Meiler J. DiB-splits: nature-guided design of a novel fluorescent labeling split system // Sci. Rep. 2020. Vol. 10, № 1. P. 11049.
6. Bozhanova N.G., Baranov M.S., Baleeva N.S., **Gavrikov A.S.**, Mishin A.S. Red-Shifted Aminated Derivatives of GFP Chromophore for Live-Cell Protein Labeling with Lipocalins // International Journal of Molecular Sciences. 2018. Vol. 19, № 12.

### Тезисы докладов на конференциях

1. Mishin A.S., **Gavrikov A.S.**, Perfilov M.M., Baleeva N.S., Baranov M.S., Live-cell smFRET with transient protein-labeling tags. Single-Molecule Sensors and NanoSystems International Conference (2019)
2. **Гавриков А.С.**, Лукьянов К.А., Мишин А.С. Переключаемые акцепторы индуктивно-резонансного переноса энергии на основе двухкомпонентной системы липокалин-флуороген. XXXI ЗИМНЯЯ МОЛОДЕЖНАЯ НАУЧНАЯ ШКОЛА «ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» (2019)
3. **Гавриков А.С.**, Мишин А.С. Модулируемая система индуктивно-резонансного переноса энергии на основе белков, связывающих GFP-подобные хромофоры. Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018».
4. **Gavrikov A.S.**, Lukyanov K.A., Mishin A.S. Switchable acceptors of resonance energy transfer based on lipocalin Blc and synthetic chromophores. Advanced fluorescence imaging methods (2017).
5. **Гавриков А.С.**, Лукьянов К.А., Мишин А.С. Модулируемые акцепторы индуктивно-резонансного переноса энергии на основе липокалина Blc и синтетических хромофоров. XXIX зимняя молодежная научная школа «ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКОХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» (2017)