

**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

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Мишин Александр Сергеевич

Москва – 2023

<b>Список сокращений.</b>	<b>4</b>
<b>1. Введение.</b>	<b>7</b>
1.1. Цель исследования.	9
1.2. Задачи исследования.	9
1.3. Предмет и объекты исследования.	10
1.4. Актуальность исследования.	10
1.5. Научная новизна исследования.	11
1.6. Область применения и практическая значимость исследования.	12
1.7. Публикации и апробация работы.	13
<b>2. Обзор литературы.</b>	<b>15</b>
2.1. Флуоресцентное мечение.	15
2.2. Локализационная микроскопия.	19
2.3. Ферстеровский резонансный перенос энергии.	25
2.3.1. Физическая природа резонансного переноса энергии.	26
2.3.2. Способы детекции и измерения резонансного переноса энергии.	31
2.3.3. Применение резонансного переноса энергии в биологических исследованиях.	39
2.3.4. Резонансный перенос энергии на уровне одиночных молекул.	41
2.4. Сплит системы для белок-белковых взаимодействий.	42
2.5. Флуороген-активирующие белки.	45
2.6. Бактериальный липокалин как флуороген активирующий белок.	51
<b>3. Материалы и методы.</b>	<b>59</b>
3.1. Среды.	59
3.2. Синтетическая ДНК.	59
3.3. Клонирование генно-инженерных конструкций.	60
3.4. Химическая трансформация клеток <i>E.coli</i> .	63
3.5. Выделение плазмидной ДНК.	63
3.6. Экспрессия и очистка белков.	64
3.7. Спектроскопия.	65
3.8. Определение эффективности переноса энергии <i>in vitro</i> .	66
3.9. Работа с культурами клеток млекопитающих.	66
3.9.1. Культуры клеток млекопитающих.	66
3.9.2. Ведение эукариотических культур клеток.	67
3.9.3. Трансфекция эукариотических клеток.	67
3.10. Методы микроскопии.	69
3.10.1. Широкопольная флуоресцентная микроскопия.	69
3.10.2. Конфокальная микроскопия.	69

3.10.3. Локализационная микроскопия сверхвысокого разрешения.	70
3.11. Попеременное добавление и отмывка хромофора.	71
3.12. Детекция эффективности FRET in cellulo.	71
3.12.1. По падению интенсивности флуоресценции донора.	71
3.12.2. По уменьшению времени жизни флуоресценции донора.	72
<b>4. Результаты и их обсуждение.</b>	<b>74</b>
4.1. Рациональный дизайн улучшенных мутантов липокалина и их применение в микроскопии и наноскопии.	74
4.2. Двухцветное мечение с помощью липокалинов нового поколения.	89
4.3. Сплит-система на основе липокалина DiB2.	92
4.4. Сплит-система на основе Rosetta Mutant липокалина.	100
4.5. Дальнекрасный комплекс липокалина и хромофора mka67.	106
4.6. Модулируемые акцепторы FRET на основе комплекса липокалин:хромофор.	109
4.6.1. Скрининг и отбор FRET пар.	110
4.6.2. Изучение белок-белковых взаимодействий с помощью FRET пары mNeonGreen-DiB1:mka67.	123
4.6.3. Биосенсоры на основе FRET пары mNeonGreen-DiB1.	129
4.6.4. FRET с липокалином на уровне одиночных молекул. Поиск подходящих доноров.	135
4.6.5. FRET с липокалином на уровне одиночных молекул.	139
<b>Заключение.</b>	<b>141</b>
<b>Выводы.</b>	<b>142</b>
<b>Список литературы.</b>	<b>144</b>

## Список сокращений.

ИПТГ – Изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид

ПФА – Параформальдегид

ФБС – Фетальная бычья сыворотка

ЭДТА – Этилендиаминтетрауксусная кислота

ЯМР – Ядерный магнитный резонанс

ABDI-BF<sub>2</sub> – Аминобензилиден-имидазолинон-BF<sub>2</sub>

BGSBD – 4-сульфанил-7-аминобензоксадиазол-Об-бензилгуанин.

BFP – Синий флуоресцентный белок

BODIPY – 4,4-дифтор-4-бора-3а,4а-диаза-s-индацен

BphP – Бактериальный фитохромный фоторецептор

CFP – Голубой флуоресцентный белок

CyOFP – Циан-возбуждаемый оранжевый флуоресцентный белок

DFHBI – 3,5-дифлуоро-4-гидроксибензилиден-имидазолинон

DFHBI-1T – 3,5-дифлуоро-4-гидроксибензилиден-2-метил- 1-трифлуороэтил

DiB (Dye in Blc) – Краситель в липокалине Blc

DMAC – 7-диметиламинокумарин

DMEM – Модифицированная среда Игла Дульбекко

DMFA – N,N-Диметилформаид

DMSO – Диметилсульфоксид

DNA-PAINT – (DNA-based Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography) накопление точек для визуализации в наноразмерной топографии основанное на использовании ДНК

EGFP – Улучшенный зеленый флуоресцентный белок

ECFP – Улучшенный циановый флуоресцентный белок

FbFP – Флавинмоноклеотид-связывающий флуоресцентный белок

FLIM – Микроскопия времени жизни флуоресценции

FRET – Ферстеровский резонансный перенос энергии

FMN – Флавинмоноклеотид

GFP – Зеленый флуоресцентный белок  
NHBS - Хэнкс/хепес буфер  
HMBR – 4-гидрокси-3-метилбензилиден-роданин  
HP1 - Хромобелок I  
iRFP – Инфракрасный флуоресцентный белок  
LB – Среда Лурия-Бертани  
LOV – Свет кислород вольтаж  
LSS – Длинный Стоксовский сдвиг  
mFAP – Мономерный флуороген-активирующий белок  
MoClo – Модульное клонирование  
mTFP1 – Мономерный бирюзовый флуоресцентный белок 1  
NIR – Ближний инфракрасный диапазон  
PAGFP – Фотоактивируемый зеленый флуоресцентный белок  
PAFP – Фотоактивируемый флуоресцентный белок  
PALM – Фотоактивационная локализационная микроскопия  
PrFbFP – Флавиномононуклеотид-связывающий флуоресцентный белок из *P. putida*.  
PBS – Фосфатно-солевой буфер  
pHOBDI – Парагидроксибензилиден-имидазолинон  
PSF – Функция рассеяния точки  
PYP-tag – Метка на основе фотоактивного желтого белка  
QY – Квантовый выход флуоресценции  
sCMOS – Комплементарная структура металл-оксид-полупроводник, модифицированная для научных целей  
smFRET (Single-molecule FRET) – Ферстеровский резонансный перенос энергии на уровне одиночных молекул  
SNAP-tag – “щёлк”-метка  
SOB – Супер-оптимальная среда  
SRRF – Сверхразрешение радиальных флуктуаций  
STED – Микроскопия стимулированного подавления эмиссии

STORM – Микроскопия стохастической оптической реконструкции

TIRF – Флуоресценция полного внутреннего отражения

TMBDMA – 2-(4-меркаптобензамидо)-N,N,N-триметилэтанамин-7-диметиламинокумарин-3-карбоксил кислота

TMP – Триметоприм

TMP-tag – Триметоприм-связывающая метка

X-Gal – 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- $\beta$ -D-галактопиранозид

YAP – Белок ассоциированный с Yes-киназой

Y-FAST – Желтая активирующая флуоресценцию и сдвигающая поглощение метка (Также - FAST)

YFP – Желтый флуоресцентный белок

YPet – Желтый флуоресцентный белок для переноса энергии

## 1. Введение.

Флуоресцентное мечение - один из самых распространенных методов изучения локализации, динамики и взаимодействия молекул в живых системах. Флуоресцентные белки за счет возможности генетического кодирования получили очень широкое распространение в прижизненной микроскопии. В настоящее время подобные исследования часто требуют высокого разрешения изображений, вплоть до визуализации одиночных молекул. Этого невозможно достичь из-за дифракционного предела используя стандартную широкопольную микроскопию.

Появление новых методов, таких как, например, локализационная микроскопия сверхвысокого разрешения, основанная на регистрации вспышек флуоресценции отдельных молекул и расчета их математического центра, накладывает определенные требования на используемую флуоресцентную метку, которым обычные флуоресцентные белки не удовлетворяют. В то же время существует множество методов с использованием антител или олигонуклеотидов меченых синтетическими хромофорами, однако, эксперименты с ними чаще всего требуют фиксации клеток. В последнее время стали появляться системы мечения на основе флуороген-активирующих белков, которые связывают синтетические хромофоры и активируют их флуоресценцию.

Для изучения взаимодействий белков в клетках широко используется ферстеровский резонансный перенос энергии (FRET). При этом изменение расстояния или взаимной ориентации компонентов FRET-пары (донор-акцептор) приводит к легко детектируемым изменениям во флуоресценции донора (интенсивности, времени жизни). Однако, использование генетически кодируемых флуоресцентных меток для точных, количественных измерений FRET крайне затруднено. Это связано с тем, что в живом образце сложно получить контрольное измерение при котором перенос энергии отсутствует. Так, традиционный прием – фотообесцвечивание

акцептора FRET интенсивным светом необратимо выключает акцептор а также может навредить живой клетке. По этой причине изучение белок-белковых взаимодействий в динамике на протяжении длительного времени с использованием обычных флуоресцентных белков невозможно. Для изучения FRET в динамике в качестве акцепторов применяются обратимо фотопереключаемые флуоресцентные белки, которые при облучении светом определенной длины волны меняют спектральные свойства. Тем не менее, для переключения такого акцептора тоже требуется облучение, а также оно может происходить не полностью. Однако, с помощью флуороген-активирующих белков в качестве модулируемых акцепторов FRET можно многократно выключать акцептор отмывкой хромофора, обеспечивая измерение эффективности FRET в динамике на протяжении длительного времени.

В настоящей работе мы осветим применение современных флуороген-активирующих белков на основе лиганд-связывающих белков бактериальных липокалинов с синтетическими хромофорами аналогами хромофора GFP в качестве перспективных меток для локализационной микроскопии, а также в качестве модулируемых акцепторов резонансного переноса энергии (FRET).



## **1.1. Цель исследования.**

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

## **1.2. 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.

### **1.3. Предмет и объекты исследования.**

Объектом данного исследования является система флуоресцентного мечения на основе флуороген-активирующего белка липокалина и синтетических флуорогенов, аналогов хромофора GFP.

Предметом данного исследования является применение данной системы для изучения локализации и динамики внутриклеточных структур в условиях локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения в живых клетках, а также применение этой системы в качестве модулируемого акцептора FRET для изучения белок-белковых взаимодействий и их динамики.

### **1.4. Актуальность 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 акцепторы FRET крайне ограничен.

### **1.5. Научная новизна исследования.**

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.

## **1.6. Область применения и практическая значимость исследования.**

Система мечения на основе липокалина, исследуемая в данной работе, превосходит существующие системы мечения из семейства флуороген-активирующих белков в условиях наноскопии и позволяет быстро реконструировать субдифракционные кадры, также обеспечивая высокую длительность съемки и двухцветное мечение в живых клетках.

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.

## 1.7. Публикации и апробация работы.

### 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

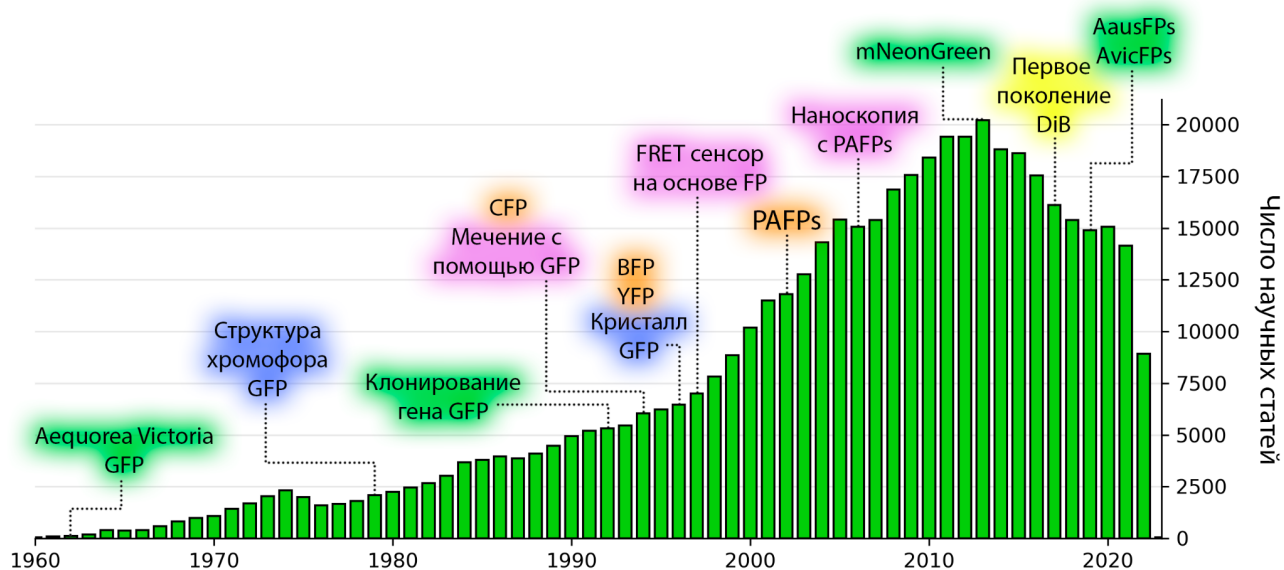
**Тезисы докладов на конференциях**

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 МОЛОДЁЖНАЯ 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 B1c 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 B1c и синтетических хромофоров. XXIX зимняя молодежная научная школа «ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ФИЗИКОХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ» (2017)

## 2. Обзор литературы.

### 2.1. Флуоресцентное мечение.

Первый флуоресцентный белок, зеленый флуоресцентный белок GFP, был выделен в 1962 году в ходе выделения люминесцентного акворина [1]. Позднее был описан перенос энергии с акворина на GFP [2]. С открытия этого белка прошло более 30 лет до того момента, как впервые была показана возможность *in vivo* визуализации с его помощью [3]. С тех пор возник огромный интерес к структуре, функционированию и биофизике флуоресцентных белков, что привело к взрывному росту числа публикаций (Рисунок 1) с изучением и применением флуоресцентных белков из разных организмов и их улучшенных вариантов для решения основных задач молекулярной и клеточной биологии, а также бурному развитию методов флуоресцентной микроскопии [4–8].



**Рисунок 1.** Хронология основных достижений в области разработки флуоресцентных белков. Гистограмма отражает число публикаций с использованием флуоресцентных белков. Зеленым цветом подсвечены основные исследования природного разнообразия GFP-подобных белков; Синим цветом подсвечены структурные исследования; Рыжим цветом подсвечена разработка новых вариантов флуоресцентных белков; Фиолетовым цветом подсвечено появление разных технологий с использованием

флуоресцентных белков. Желтым цветом подсвечено появление флуороген-активирующих белков DiB, которые положили начало данной работе.

Флуоресцентные белки семейства GFP имеют в своем составе 220-240 аминокислот (25 кДа). Структурно белок представляет собой бочонок, образованный из 11  $\beta$ -листов, который пронизан полипептидной цепью [9]. Хромофор флуоресцентного белка образуется уникальной посттрансляционной модификацией трех аминокислотных остатков пронизывающей цепи в положениях 65-67 (нумерация соответствует GFP). При этом аминокислота в положении 65 может различаться у разных белков, в то время как 66 и 67 аминокислоты строго консервативны (Тирозин и глицин соответственно) среди всех природных флуоресцентных белков семейства GFP [4]. Получаемый хромофор находится в самом центре бочонка и хорошо защищен от контакта с окружающим растворителем. Кроме того бочонок дополнительно стабилизируется множественными нековалентными взаимодействиями, которые обеспечивают высокую устойчивость к тепловой или химической денатурации, а также к протеолизу [10].

Аминокислотные остатки, которые обращены внутрь бочонка играют ключевую роль в автокатализе хромофора и его спектральных свойствах. Самые важные остатки располагаются в центре  $\beta$ -листов, ближе всего к хромофорной группе аминокислот.

Отдельно стоит упомянуть класс NIR флуоресцентных белков, которые излучают в ближнем инфракрасном диапазоне (NIR). Они широко используются для визуализации глубоких тканей или всего тела мелких млекопитающих за счет минимального поглощения инфракрасного спектра гемоглобином, меланином и водой в “оптическом окне” (650-900 нм) [11]. NIR флуоресцентные белки из семейства GFP (обладающие автокатализом хромофора) представлены белками TagRFP657 [12] и TagRFP675 [13] с пиками эмиссии на 657 и 675 нм соответственно. Однако, пики возбуждения данных белков лежат вне



“оптического окна”. Чтобы преодолеть ограничения существующих флуоресцентных белков [14], которые находятся по спектроскопическим показателям вне “оптического окна”, для создания подобных меток стали использовать другие семейства белков. Например, бактериальные фитохромные фоторецепторы (BphP), принадлежащие большому семейству фоторецепторов, обнаруженных в растениях, водорослях, грибах, бактериях и цианобактериях, которые используют в качестве хромофора линейные тетрапирролы, также известные как билины [15]. Среди всех фитохромов именно бактериальный фитохром является лучшей отправной точкой для разработки инфракрасных флуоресцентных меток. В отличие от растительных и цианобактериальных фитохромов бактериальный фитохром использует в качестве лиганда самый дальнекрасный по поглощению билин – биливердин IXa [16,17]. Другим плюсом данного билина является то, что он образуется в результате деградации гема, следовательно присутствует во многих эукариотических организмах, включая рыб и млекопитающих. Таким образом, использование BphP фитохрома настолько же простое, как и использование GFP, так как для его работы требуется только энзиматическая реакция с эндогенным лигандом [18].

Другой интересной группой флуоресцентных белков являются флавинмононуклеотид-связывающие белки FbFP. Среди них есть такие представители как PrFbFP и iLOV, представляющие собой мутантные формы флавин-связывающих доменов [19,20]. Эти белки связывают эндогенный флавинмононуклеотид, который присутствует практически во всех клетках в значительном количестве. По сравнению с обычными флуоресцентными белками, у флавин-связывающих есть несколько преимуществ, среди которых меньший размер, способность комплексов флуоресцировать в бескислородных условиях и быстрое созревание, по сути являющееся временем фолдинга после трансляции. Но есть и недостатки, например, они в 5-10 раз менее яркие, чем флуоресцентный белок EGFP.

Еще одним интересным классом флуоресцентных меток являются ферментативные системы мечения. Первыми представителями данного класса

являются метки HaloTag [21,22]. Они являются двухкомпонентными и состоят из лиганд-связывающего белка, мутантной формы дегалогеназы DhaA, и органической молекулы с двумя функциональными частями. Одна функциональная часть специфично связывается с лиганд-связывающим белком (реакционный линкер), вторая группа является флуоресцентной (хромофор). Существенно, что хромофор является изначально флуоресцентным, а связывающаяся с белком группа представляет собой хлоралкан и выполняет роль линкера между хромофором и лиганд-связывающим белком, обеспечивая специфичность мечения. Как и у флавин-связывающих белков, использование данной системы мечения позволяет исключить ожидание автокаталитического созревания хромофора, а получить флуоресцентное окрашивание путем добавления и отмывки хромофора с линкером. В данном методе прокрашивания структур есть один значительный недостаток. Из-за того, что хромофоры изначально флуоресцентные, визуализация структур обязательно требует отмывки свободного хромофора из среды.

Другим представителем класса лиганд-связывающих систем мечения является RYP-tag [23,24]. Он ковалентно связывает производные диметинаминокумарина (DMAC, TMBDMA), при этом происходит переход флуорогена из полярной среды в низкополярное окружение сайта связывания, и наблюдается увеличение флуоресценции по сравнению с фоновой флуоресценцией свободного флуорогена. Флуорогены хорошо проникают через мембраны, а связывание с RYP-tag и активация флуоресценции происходит быстро. Размер RYP-tag всего 125 аминокислот, что заметно меньше, чем размер обычных флуоресцентных белков. RYP-tag наряду с небольшим размером имеет хорошую кинетику связывания и активации флуоресценции, а также высокое соотношение сигнал-шум.

Еще одна система мечения, SNAP-tag [25,26], ковалентно связывает BGSBD в гидрофобном кармане, обладает более быстрой кинетикой связывания флуорогена и более высоким показателем разгорания флуоресценции при связывании флуорогена (увеличение яркости в 280 раз по отношению к

флуоресценции свободного флуорогена).

У систем белок-флуороген есть много преимуществ, но такие метки как RYP-tag, SNAP-tag и HaloTag при взаимодействии с флуорогеном образуют ковалентную связь. Другими словами, мечение с использованием данных систем является необратимым, что имеет свои недостатки и ограничения. В отличие от этих систем, TMP-tag нековалентно связывает молекулу триметоприма (TMP), с которым конъюгирована молекула хромофора [27–29]. Однако аффинность триметоприма находится в наномолярной области, а хромофор изначально флуоресцентный, то есть отсутствует эффект активации флуоресценции при изменении микроокружения хромофора.

## **2.2. Локализационная микроскопия.**

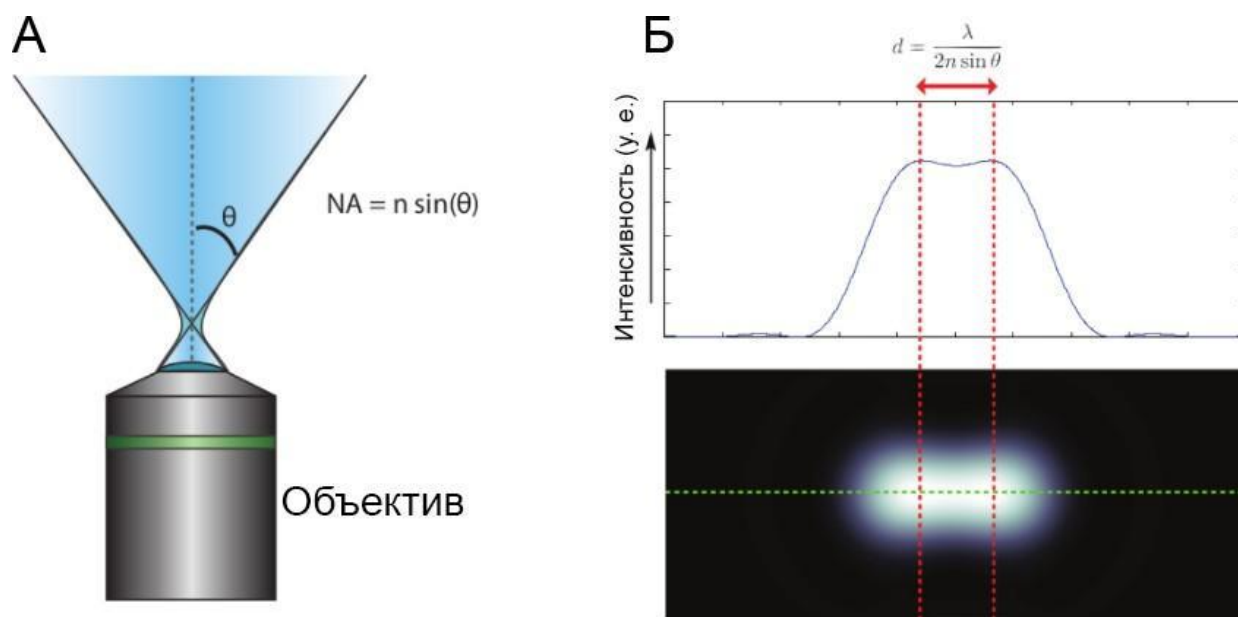
За последние несколько десятилетий флуоресцентная микроскопия значительно расширила возможности ученых по изучению биологических процессов на клеточном и субклеточном уровне благодаря своей молекулярной специфичности и возможностям одновременной визуализации множества меченых структур.

Свет распространяется как волна, и при фокусировке света в пятно, размер этого пятна всегда будет больше фактического размера флуорофора. Волновой фронт эмиссии дифрагирует на краю апертуры объектива, за счет чего фронт расширяется. Высокочастотные компоненты, придающие изображению резкость, теряются из-за конечной числовой апертуры объектива, собирающего свет. Это приводит к размытию изображения. Другими словами, результирующее изображение представляет собой свертку реального объекта с так называемой функцией рассеяния точки (PSF) оптической системы. PSF - это “реакция” оптической системы на точечный излучатель из-за дифракционного предела и несовершенства оптической системы.

Размер центрального дифракционно-лимитированного пятна составляет приблизительно половину длины волны. Точнее это соотношение было определено Эрнстом Аббе в следующем виде [30]:

$$d = \frac{\lambda}{2NA} \quad (2.1)$$

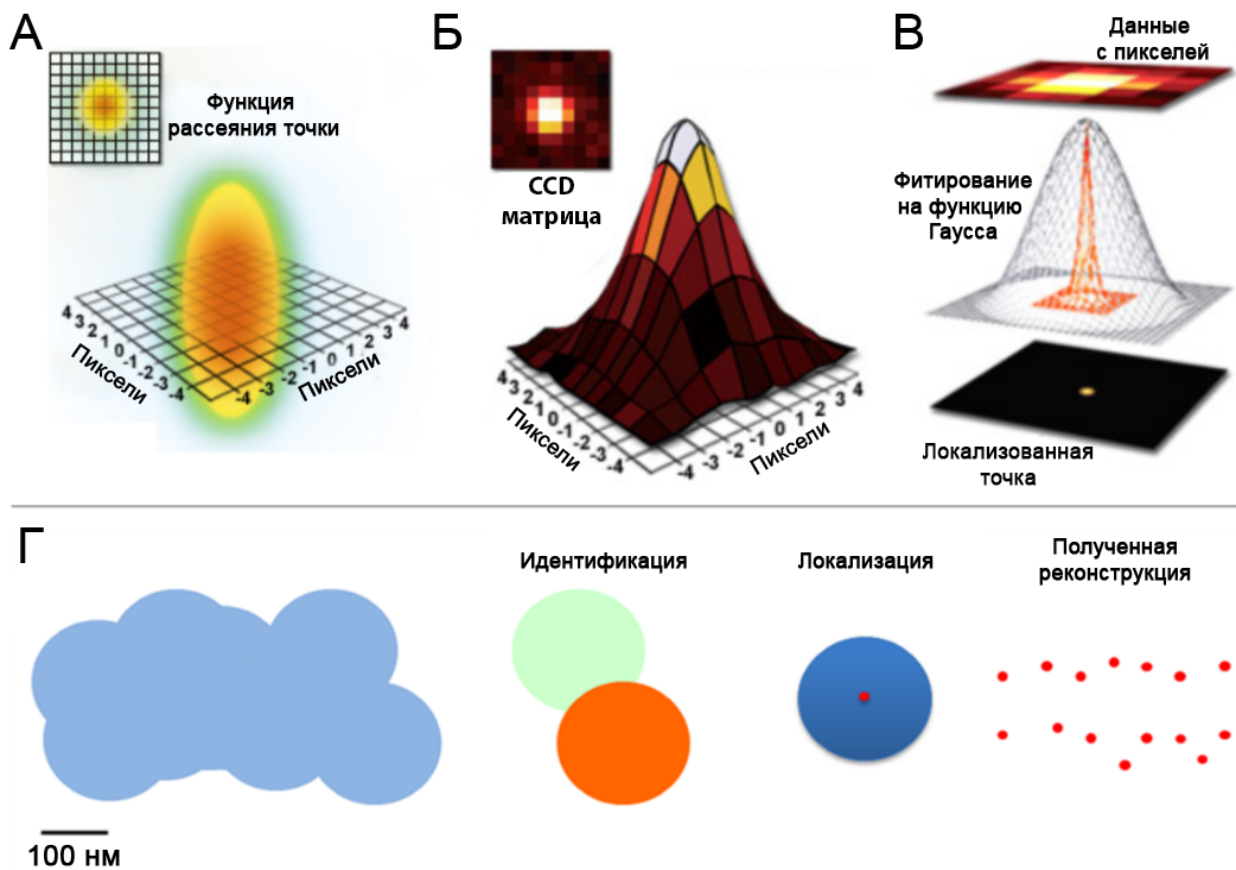
Где  $\lambda$  - длина волны света, а NA - числовая апертура объектива. В свою очередь числовая апертура объектива равна  $n \cdot \sin(\theta)$ , где  $n$  - показатель преломления, а  $\theta$  - апертурный угол (Рисунок 2). В 1896 году Рэлей уточнил уравнение Аббе, чтобы учесть, как далеко должны быть друг от друга два флуорофора, чтобы различать их. Позднее эта формула была уточнена для углового расстояния, в результате чего появился критерий Рэля, где в числителе появился коэффициент 1.22 [31].



**Рисунок 2.** Дифракционный предел светового микроскопа. (А) Иллюстрация числовой апертуры (NA) объектива, (Б) Две точки размыты и соединены из-за дифракции света. Наименьшее расстояние между двумя точками, на котором они могут быть разрешены, определяется формулой  $d = \lambda / (2n \sin \theta)$ . Адаптировано из [32].

Используя критерий Рэлея для флуоресцентного белка GFP, расстояние, необходимое для различения двух молекул GFP с помощью объектива с числовой апертурой 1,4 составит приблизительно 222 нм. В масштабе клетки такое расстояние довольно велико и использование широкопольной микроскопии не позволяет изучать мембранные рецепторы или тонкие волокна, которые могут быть на очень близком расстоянии друг от друга. Только с помощью методов микроскопии сверхвысокого разрешения можно преодолеть дифракционный предел и визуализировать мельчайшие структуры в клетках.

Мы остановимся на одном из методов сверхразрешающей микроскопии, а именно локализационной микроскопии. Этот метод основан на детекции отдельных флуоресцентных молекул от кадра к кадру путем случайного “включения” и “выключения” флуоресценции этих молекул. Каждая снятая вспышка флуорофора аппроксимируется, и определяется ее центр, в результате чего мы получаем множество точек, представляющих собой уточненные локализации флуорофоров (Рисунок 3). Исходные данные, состоящие из тысяч отдельных кадров, реконструируются в одно изображение, содержащее все локализованные флуорофоры, для получения окончательной субдифракционной реконструкции.



**Рисунок 3.** Схема процесса локализации вспышки флуоресценции флуорофора. (А) Функция рассеяния точки, соответствующей флуорофору. (Б) Данные яркости на каждом пикселе. (В) Получение уточненной локализации флуорофора путем фитирования яркости пикселей на функцию Гаусса. (Г) Схематичный процесс локализации вспышек. Без локализационной микроскопии (слева) флуорофоры сливаются в единое пятно. С использованием локализационной микроскопии (справа) мы имеем возможность установить локализации флуорофоров и разрешить их в пространстве.

Для локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения размер пикселя на матрице обычно составляет примерно 100 нм, чтобы уложиться в  $\frac{1}{2}$  длины волны, что соответствует теореме Котельникова [33] (она же теорема Найквиста-Шеннона [34]). Флуорофор может быть локализован с точностью около 10 нм, что позволяет локализовать несколько флуорофоров в разных местах на одном пикселе за счет фитирования на функцию Гаусса и учета интенсивности флуоресценции на соседних пикселях относительно самого

яркого. Чем ярче флуорофор и больше фотонов собрано, тем точнее можно установить локализацию.

Все методы локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения имеют в основе одну и ту же концепцию индивидуальной локализации отдельных флуорофоров с помощью их разрешения в пространстве и времени. Они отличаются только способами “включения” и “выключения” флуоресценции флуорофоров.

Фотоаквационная локализационная микроскопия (PALM) впервые была продемонстрирована в 2006 году Эриком Бетцигом и Харальдом Хессом [35]. Они использовали фотоактивируемые флуоресцентные белки для мечения интересующих структур. Ключевой особенностью фотоактивируемых флуоресцентных белков является то, что они находятся в нефлуоресцентном состоянии до тех пор, пока не будут активированы светом определенной длины волны. Для фотоактивации небольшого количества молекул флуоресцентных белков используется короткая вспышка лазера подходящей длины волны. При этом флуоресцентные белки активируются случайным образом, а вероятность активации пропорциональна интенсивности активирующего лазера. После активации молекулы способны флуоресцировать, если облучить их лазером длины волны подходящей для возбуждения. Количество активированных и возбужденных флуоресцентных белков достаточно мало, чтобы вспышки отдельных молекул можно было детектировать и локализовать по отдельности. Таким образом с помощью чередования активирующих и возбуждающих вспышек света собираются локализации и реконструируются меченые структуры с субдифракционным разрешением.

Другой метод локализационной микроскопии - микроскопия стохастической оптической реконструкции (STORM) [36,37]. Ключевое отличие от PALM в том, что в STORM используются органические красители вместо фотоактивируемых белков. Мощное облучение переводит молекулы хромофоров в нефлуоресцентное состояние, из которого они спонтанно возвращаются в флуоресцентное. В этот момент они могут перейти в

возбужденное состояние, начать флуоресцировать и снова перейти в нефлуоресцентное состояние. Этот цикл занимает очень малое время и наблюдается в виде вспышек флуоресценции.

Позднее появился метод DNA-PAINT [38,39]. Основой данного метода является комплементарное взаимодействие цепей ДНК. Интересующая структура помечена одной цепью ДНК, а вторая цепь с хромофором находится в свободном виде. Изначально детекция осуществлялась за счет того, что при связывании комплементарных цепей ДНК, флуоресцирующий хромофор останавливался на месте и регистрировался. С помощью подбора последовательности и ее длины контролировалась кинетика связывания.

Как видно, в локализационной микроскопии можно использовать совершенно разные системы мечения. Не так давно было показано, что некоторые зеленые флуоресцентные белки способны при мощном облучении переходить в нефлуоресцентное состояние и затем спонтанно из него возвращаться [40,41]. Тем самым они могут быть использованы аналогично синтетическим хромофорам в STORM микроскопии, но как генетически-кодируемые метки в физиологических условиях без использования дополнительных бескислородных буферов.

Также, помимо высокого пространственного разрешения в локализационной микроскопии удалось достичь и временного разрешения на уровне  $\sim 30$  субдифракционных кадров в секунду [42]. В этом подходе был использован фотоактивируемый флуоресцентный белок mEOS3.2 в сочетании с очень высокой мощностью облучения возбуждающим (съемка) синим и активирующим (фотоконверсия) ультрафиолетовым светом ( $7-18 \text{ кВт}\cdot\text{см}^{-2}$  и  $0.3-1.8 \text{ кВт}\cdot\text{см}^{-2}$  соответственно). Однако, в таких условиях mEOS3.2 быстро необратимо фотообесцвечивается, что ведет к потере сигнала и невозможности провести длительную съемку.



### 2.3. Ферстеровский резонансный перенос энергии.

Ферстеровский резонансный перенос энергии (FRET) является электродинамическим феноменом и может быть объяснен с точки зрения классической физики. FRET возникает между молекулой в возбужденном состоянии, называемой донором, и молекулой в базовом (невозбужденном) состоянии, называемой акцептором. Чаще всего молекула донора при этом излучает в более коротковолновой области, чем акцептор, при этом спектр эмиссии донора накладывается на спектр поглощения акцептора.

Ферстеровский резонансный перенос на данный момент очень широко применяется в биологии и биофизике. Такое распространение использования FRET продиктовано расстоянием, на котором происходит перенос энергии. Это расстояние примерно соответствует среднему размеру белковой молекулы или толщине мембраны. Резонансный перенос энергии часто используется для определения межмолекулярных расстояний или для установления того, собираются ли исследуемые макромолекулы в комплекс или нет [43]. Измерения времени жизни флуоресценции при FRET активно используются в микроскопии [44–46]. Применение FRET быстрыми темпами расширяется в биотехнологической области, особенно в применении в ДНК чипах и других системах для масштабных параллельных систем анализа [47,48]. Помимо этого перенос энергии был использован для получения информации о конформационной динамике единичных макромолекул и их комплексов [49], а также были разработаны методы, комбинирующие флуоресцентную корреляционную спектроскопию и FRET [50,51].

Подходы к изучению межмолекулярных взаимодействия на основе FRET стали очень популярны за счет большого интерпретационного потенциала в отношении динамики ассоциации молекулярных систем в клеточной биологии [52,53]. С использованием знания о геометрическом поведении макромолекулярных комплексов, которые могут быть получены с помощью измерений FRET, можно с большой достоверностью формировать модели взаимодействий макромолекул и связывать их с функционированием

биологических систем [54]. Все эти знания позволяют задавать более специфические вопросы к динамике межмолекулярных взаимодействий в живых системах.

### **2.3.1. Физическая природа резонансного переноса энергии.**

Резонансный перенос энергии происходит без излучения фотона донором и является результатом диполь-дипольного взаимодействия. Эффективность переноса энергии зависит от спектрального перекрытия эмиссии донора и поглощения акцептора, времени жизни возбужденного состояния донора, его квантового выхода флуоресценции, расстояния между молекулами и взаимного расположения их диполей [55].

История открытия резонансного переноса энергии отсылает нас в начало двадцатого века. В 1922 году Г. Карио и Дж. Франк впервые зафиксировали явление переноса энергии [56,57]. В эксперименте смешивались пары ртути и таллия при давлении, соответствующему 0,25 мм для ртути и 2 мм для таллия, затем пары ртути возбуждались с помощью дуговой лампы. Такие значения были выбраны как оптимальные для высокой частоты эффективных столкновений атомов ртути и таллия. При этом наблюдались спектральные линии, соответствующие таллию, из чего был сделан вывод о том, что при столкновениях возбужденных атомов ртути с атомами таллия происходит перенос энергии, а электрон возбужденного атома безызлучательно возвращается на свой основной энергетический уровень.

В 1927 году Нобелевский лауреат Жан Перрен предложил первое теоретическое объяснение этому процессу, основываясь на классической физике [58]. Он предположил, что передача энергии от возбужденного к невозбужденному атому возможна путем диполь-дипольного взаимодействия. В его теории атомы представлены осцилляторами с электроном, осциллирующим с определенной частотой. Осцилляторы могут взаимодействовать друг с другом, находясь близко друг к другу, и входить в резонанс, если их частоты совпадают. При этом происходит тот самый резонансный перенос энергии.

Позже Фрэнсис Перрен расширил теорию, дополнив ее квантовомеханическими представлениями [59,60]. Новая теория была построена на работах Калмана и Лондона, но включала в себя не только модели взаимодействия в газовой фазе, но и взаимодействие в растворах, при этом молекулы в растворе были рассмотрены с учетом вибронных взаимодействий [61].

Расширяя теорию обоих Перренов, Теодор Ферстер усовершенствовал обоснование процесса резонансного переноса энергии. Он заметил, что перенос энергии больше всего зависит от величины спектрального перекрытия эмиссии донорной молекулы и поглощения акцепторной молекулы, а также от межмолекулярного расстояния. Именно он установил, что скорость переноса энергии от донора к акцептору пропорциональна расстоянию и убывает как  $r^{-6}$ , где  $r$  - расстояние между донором и акцептором [62,63]. Эффективность переноса энергии от донора к акцептору определяется как отношение количества событий резонансного переноса энергии к числу событий возбуждения молекулы донора. Позднее зависимость скорости переноса энергии от расстояния была подтверждена, для чего были использованы химические соединения в которых донорная и акцепторная группа находились в рамках одной и той же молекулы, но расстояния между ними в разных соединениях были разными [64]. Именно с этого момента FRET стал использоваться в спектроскопии для изучения расстояний между хромофорами и конформационных изменений в макромолекулах [65–67].

Расстояние между молекулами донора и акцептора, при котором скорость переноса составляет 50% от максимальной, называется радиусом Ферстера. В упрощенном виде уравнение константы скорости переноса энергии записывается следующим образом:

$$k_T(r) = \frac{1}{\tau_D} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (2.2)$$

Где  $\tau_D$  - время жизни возбужденного состояния молекулы донора в отсутствии акцептора,  $R_0$  - радиус Ферстера,  $r$  - фактическое расстояние между

молекулами донора и акцептора. Таким образом константа скорости переноса энергии равняется скорости перехода возбужденного донора в флуоресценцию ( $1/\tau_D$ ) при расстоянии между донором и акцептором равном Ферстеровскому радиусу для данной пары донор-акцептор. Радиус Ферстера для разных пар донор-акцептор находится в диапазоне от 2 до 8 нм, что хорошо подходит для изучения макромолекул и их комплексов.

Наряду с резонансным переносом энергии существует также перенос электронов или перенос Декстера. Он происходит, когда молекулы донора и акцептора находятся очень близко, на расстоянии меньшем 2 нм. Возбужденный электрон донора с низшей вакантной молекулярной орбитали переносится на акцептор, а электрон с высшей занятой молекулярной орбитали акцептора переносится на молекулу донора [68–70]. Акцептор при этом остается в возбужденном состоянии, тогда как донор оказывается полностью погашен. В отличие от резонансного переноса энергии, у переноса электронов Декстера нет аналогов в классической физике, он является полностью квантовомеханическим эффектом.

Полное уравнение константы скорости переноса энергии было предложено Ферстером чуть позднее, в 1951 году [71,72]. Оно включало в себя ориентационный фактор, коэффициент преломления и некоторые спектральные характеристики. Выглядит расширенное уравнение следующим образом:

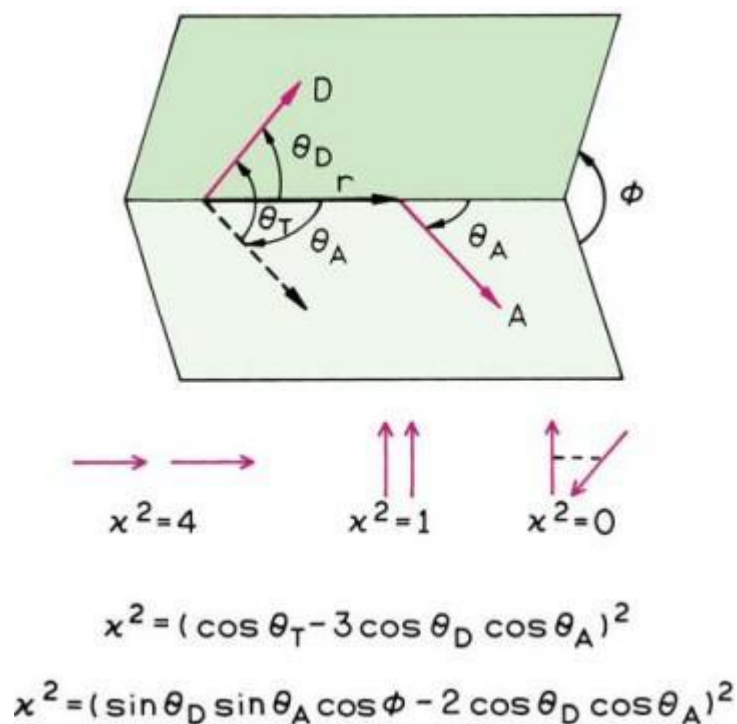
$$k_T(r) = \frac{Q_D \kappa^2}{\tau_D r^6} \left( \frac{9000(\ln 10)}{128\pi^5 N n^4} \right) J(\lambda) \quad (2.3)$$

Где  $Q_D$  - квантовый выход флуоресценции донора,  $\tau_D$  - время жизни флуоресценции донора,  $N$  - число Авогадро,  $n$  - показатель преломления среды (для биологических макромолекул в водном растворе чаще всего равен 1.4),  $r$  - расстояние между молекулами донора и акцептора,  $\kappa^2$  - ориентационный фактор, который принято считать равным  $2/3$  [73]. Величина  $J(\lambda)$  равна интегралу перекрытия спектром эмиссии донора и поглощения акцептора и может быть записана следующим образом:

$$J(\lambda) = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.4)$$

Где  $F_D(\lambda)$  - интенсивность флуоресценции молекулы донора в диапазоне длин волн от  $\lambda$  до  $\lambda + \Delta\lambda$ , нормированная на единицу,  $\varepsilon_A(\lambda)$  - коэффициент экстинкции акцептора при длине волны  $\lambda$ .

Ориентационный фактор  $\kappa^2$  характеризует расположение донорного и акцепторного диполей в пространстве относительно друг друга и может принимать значения в диапазоне от нуля до четырех. При этом нулю он равен, когда диполи перпендикулярны друг другу, единице, если параллельны и четырем, если находятся на одной прямой (Рисунок 4).



**Рисунок 4.** Зависимость величины ориентационного фактора  $\kappa^2$  от взаимного расположения диполей донора (D) и акцептора (A). Красными стрелками изображены диполи.  $r$  - расстояние между донором и акцептором,  $\theta_T$  - угол между диполями донора и акцептора,  $\theta_A$  и  $\theta_D$  - углы между диполями и вектором расстояния между ними,  $\phi$  - линейный угол двугранного угла, образованного плоскостями, в которых находятся донор и акцептор.

Таким образом с использованием уравнений выше можно вывести уравнения расчета Ферстеровского радиуса для пары донор-акцептор, и оно будет выглядеть так:

$$R_0^6 = \frac{9000(\ln 10)Q_D \kappa^2}{128\pi^5 N n^4} \int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2.5)$$

С помощью этого уравнения возможно рассчитать радиус Ферстера, зная спектральные характеристики донора и акцептора, и квантовый выход флуоресценции донора. Это уравнение выглядит немного громоздким, его можно упростить, комбинируя константы. Если длина волны будет выражена в нм, тогда  $F_D(\lambda)$  будет в  $M^{-1}cm^{-1}nm^4$  и Ферстеровский радиус в ангстремах будет выражен как:

$$R_0 = 0.221(Q_D \kappa^2 n^{-4} J(\lambda))^{1/6} \quad (2.6)$$

Как упоминалось выше, эффективность переноса энергии является отношением количества событий резонансного переноса энергии к числу событий возбуждения молекулы донора. Другими словами это  $\frac{D}{D}$  фракция фотонов, которые были поглощены донором и далее переданы акцептору путем резонансного переноса. Эту фракцию можно выразить через эффективность переноса энергии:

$$E = \frac{k_T(r)}{\tau_D^{-1} + k_T(r)} \quad (2.7)$$

Здесь мы видим уже знакомые величины, константу скорости переноса энергии  $k_T(r)$  и скорость перехода возбужденного состояния во флуоресценцию  $\tau^{-1}$ . Вместе они составляют скорость “распада” возбужденного состояния донора, часть в виде флуоресценции, часть в виде резонансного переноса.

Исходя из всего вышесказанного, резонансный перенос энергии сопровождается уменьшением интенсивности флуоресценции донора, а также уменьшением времени жизни его возбужденного состояния, или другими словами времени жизни флуоресценции. На практике эффективность переноса

энергии часто измеряют, используя отношение интенсивности флуоресценции донора в присутствии ( $F_{DA}$ ) и отсутствии ( $F_D$ ) акцептора. Формула выглядит следующим образом:

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (2.8)$$

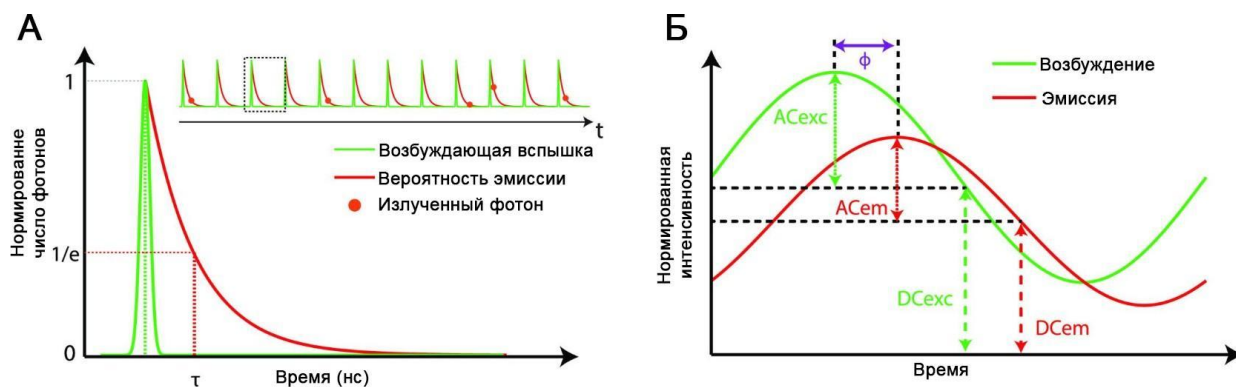
Точно так же можно измерять эффективность переноса энергии, используя отношение времени жизни флуоресценции донора в присутствии ( $\tau_{DA}$ ) и отсутствии ( $\tau_D$ ) акцептора:

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (2.9)$$

Уравнения 2.1, 2.4 и 2.5 являются ключевыми в теоретическом описании резонансного переноса энергии. На практике же чаще всего нас интересуют уравнения 2.8 и 2.9. Ключевыми изменениями при возникновении резонансного переноса энергии, на которых основаны практически все основные методы детекции FRET, является уменьшение интенсивности флуоресценции донора и уменьшение времени жизни флуоресценции донора.

### 2.3.2. Способы детекции и измерения резонансного переноса энергии.

В основе измерения резонансного переноса энергии лежат вышеупомянутые изменения яркости и времени жизни флуоресценции донора. Так как данная работа посвящена разработке системы мечения, мы будем рассматривать измерения FRET в условиях микроскопии. Остановимся подробнее на измерении времени жизни флуоресценции, а именно микроскопии времени жизни флуоресценции (FLIM). Типичные времена жизни флуоресценции находятся в диапазоне от субнаносекунд до сотен наносекунд. Поэтому неотъемлемой частью FLIM экспериментов является быстрая электроника в сочетании с эффективными детекторами. На данный момент широкое распространение имеют два подхода - анализ фазового сдвига и детекция времени эмиссии фотонов. Принципы, которые лежат в основе вышеупомянутых подходов показаны на рисунке 5 [74].



**Рисунок 5.** Схемы принципов детекции времени жизни флуоресценции. (А) Измерение на основе детекции фотонов основано на коротком импульсе возбуждающего света (зеленый) и детекции фотонов эмиссии (красный) при “распаде” возбужденного состояния. (Б) При анализе фазового сдвига возбуждающий свет синусоидально модулирован (зеленый), также получается модулирована и сдвинута по фазе эмиссия (красный) за счет задержки на время жизни возбужденного состояния. Адаптировано из [74].

При анализе числа фотонов используются короткие вспышки возбуждающего света (их длительность должна быть меньше типичных времен жизни флуоресценции). После каждой вспышки детектор фиксирует фотоны, высвеченные возбужденными молекулами, строится гистограмма числа фотонов от времени после возбуждающей вспышки [75,76]. Затем происходит фитирование полученного графика “распада” возбужденного состояния молекул на экспоненту и нахождение времени жизни флуоресценции. Часто “распад” возбужденного состояния содержит несколько компонент и не является моноэкспоненциальным для флуоресцентной молекулы. Во FRET экспериментах с помощью мультиэкспоненциального фитирования можно рассчитать фракции взаимодействующего и не взаимодействующего с акцептором донора.

Альтернативой подсчету времени детекции фотонов эмиссии является анализ фазового сдвига эмиссии (Рисунок 5, Б) [77]. Этот подход основан на том, что возбуждающий свет синусоидально модулирован. Соответственно эмиссия также синусоидально модулирована, но сдвинута по фазе относительно



возбуждающего света за счет задержки, которая возникает из-за времени существования возбужденного состояния. Сигнал эмиссии сдвинут не только по фазе, но и по амплитуде. Эти параметры визуализируются путем построения графиков фазовых изменений в диапазоне частот модуляции, затем результирующий синусоидальный сигнал демодулируется для количественной оценки задержки, вызванной экспоненциальным “распадом” возбужденного состояния донора.

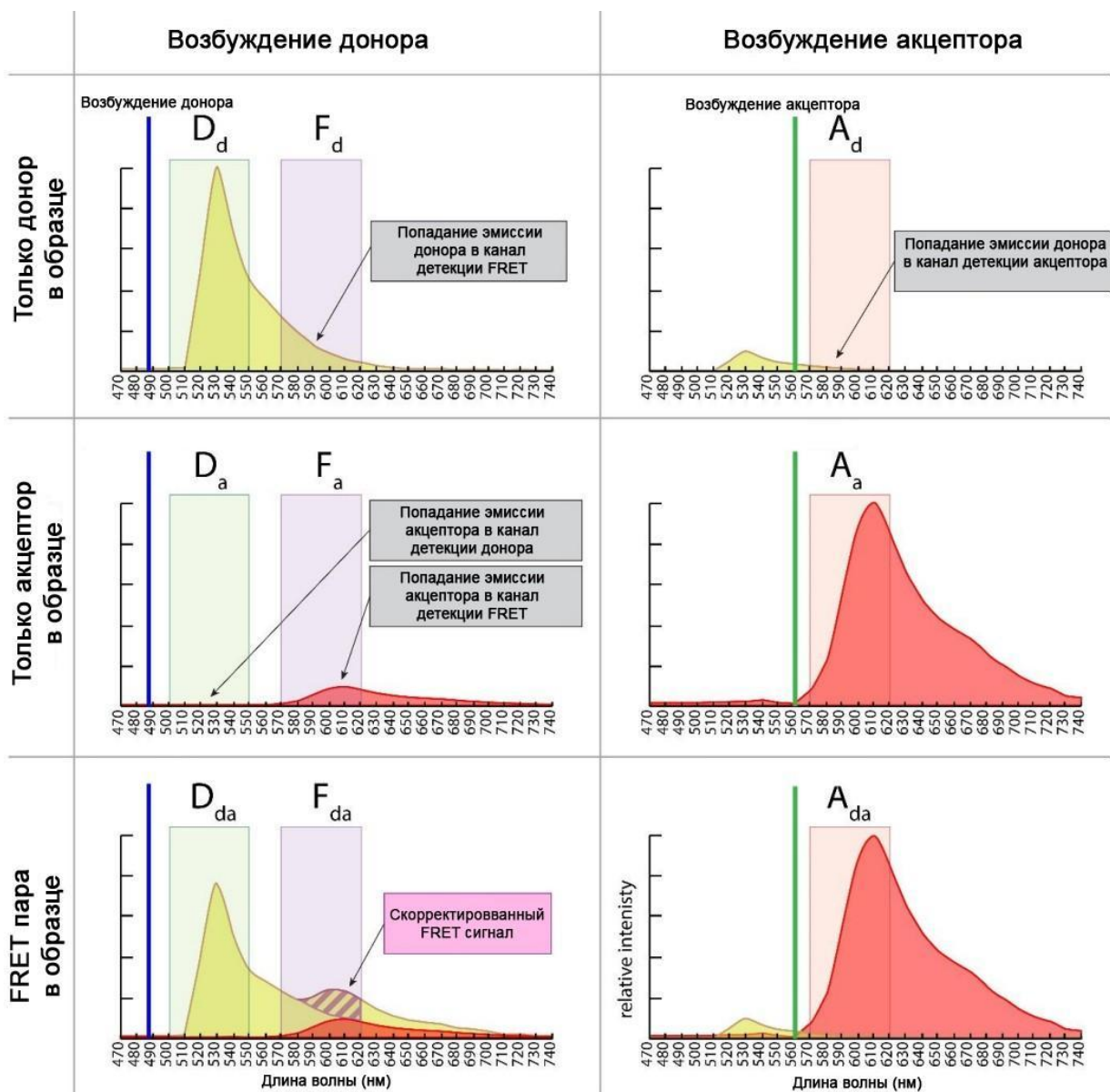
Альтернативой анализа времени жизни флуоресценции донора во FLIM является метод измерения FRET основанный на изменении интенсивности флуоресценции при сближении донора с акцептором. Этот подход наиболее широко распространен на данный момент, потому что не требует специального оборудования для создания синусоидально модулированного света или детекции одиночных фотонов. FRET эксперименты с интенсивностью донора и акцептора могут быть проведены с использованием обычных широкопольных флуоресцентных микроскопов, что делает этот подход наиболее доступным. При этом результаты измерений FRET по интенсивности флуоресценции также дают точные результаты [78].

Один из широко используемых методов детекции FRET по интенсивности флуоресценции включает в себя полное фотообесцвечивание акцептора для получения контрольного измерения интенсивности донора в отсутствие акцептора [79,80]. За счет длительной экспозиции и высокой мощности облучения этот метод довольно трудно применить для сложных экспериментов в живых клетках. Кроме того, в этом методе возможны ошибки из-за того, что мощное облучение акцептора может привести к его фотоконверсии в формы, спектрально близкие к донору, либо повлиять на молекулы донора, фотообесцветив часть из них [81,82].

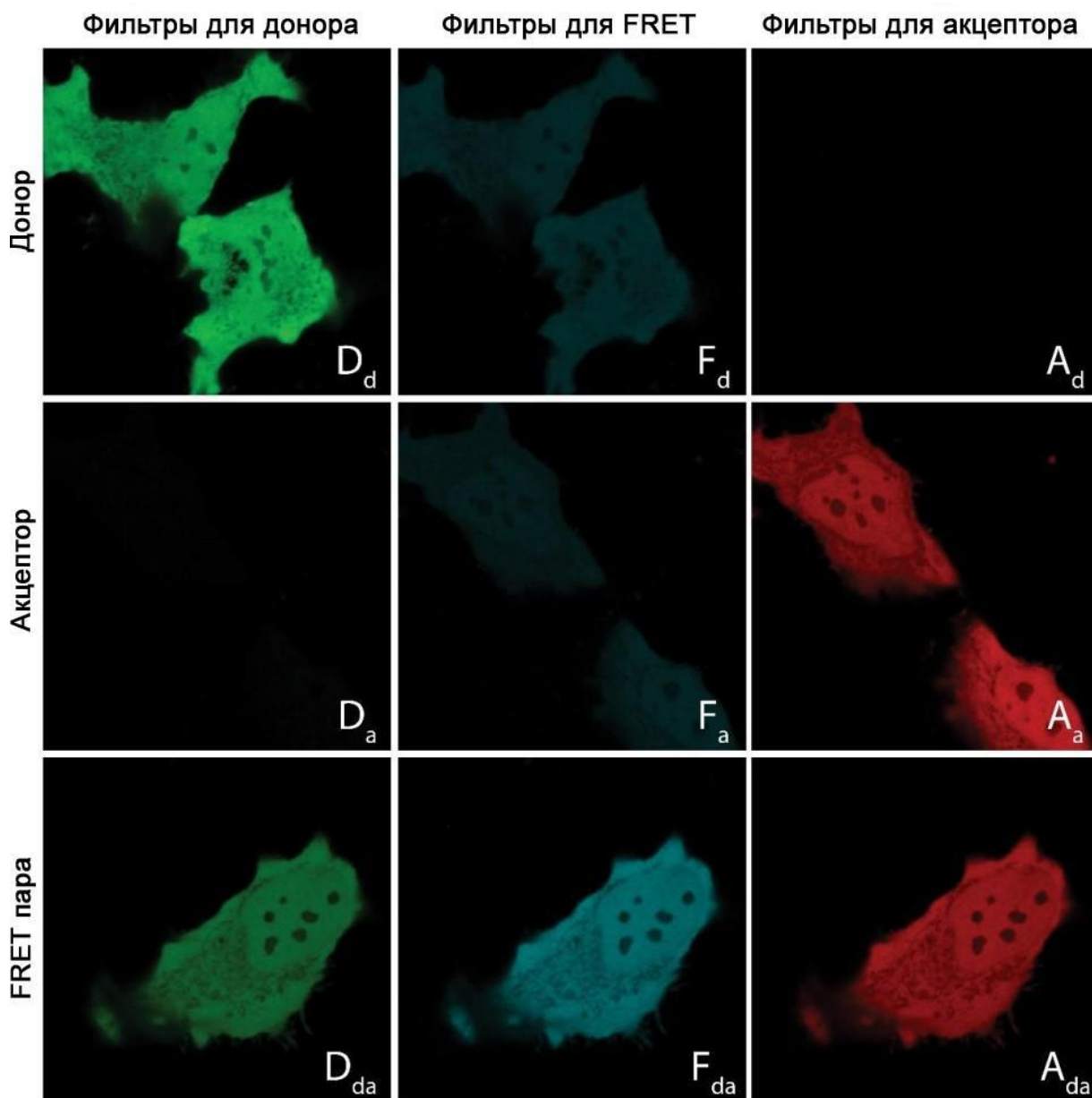
Другим методом является трех-фильтренный FRET (3F-FRET) [83]. Этот подход основан, на использовании трех комбинаций возбуждающих и эмиссионных фильтров. Эти комбинации фильтров используются для получения следующих трех каналов:

1. Канал донора. Фильтр на возбуждение и эмиссию донора.
2. FRET канал. Фильтр на возбуждение донора и фильтр на эмиссию акцептора. То есть в данном случае детектируется интенсивность флуоресценции акцептора, которая получается в результате возбуждения донора и резонансного переноса энергии.
3. Канал акцептора. Фильтр на возбуждение и эмиссию акцептора.

Сигналы, получаемые при разных комбинациях фильтров позволяют скорректировать значения интенсивностей флуоресценции и рассчитать эффективность FRET (Рисунки 6, 7). Дизайн эксперимента при этом очень прост и может быть легко масштабирован для высокопроизводительного скрининга, включая съемки на слайдах [84] и проточную цитометрию [85,86].



**Рисунок 6.** Графическое представление различных сигналов, получаемых в ходе 3F-FRET экспериментов и их номенклатура. Спектры эмиссии донора и акцептора в трех основных образцах: Содержащем только донор (верхняя строка), только акцептор (средняя строка) и FRET пару (нижняя строка). Большие буквы обозначают канал детекции: D = канал донора, F = FRET канал, A = канал акцептора. Маленькие буквы обозначают то, что было в образце: d = в образце только донор, a = в образце только акцептор, da = в образце FRET пара. Адаптировано из [87].



**Рисунок 7.** Пример изображений, получаемых в ходе 3F-FRET микроскопии в разных каналах детекции. Сверху обозначены наборы фильтров для детекции. Слева обозначены содержащиеся в образце компоненты. На самих изображениях большие буквы обозначают канал детекции: D = канал донора, F = FRET канал, A = канал акцептора. Маленькие буквы обозначают состав образца: d = в образце только донор, a = в образце только акцептор, da = в образце FRET пара. Адаптировано из [87].

Проточная цитометрия позволяет получать значения FRET по всей популяции клеток, что существенно для правильной статистической обработки, но при этом полностью теряется пространственная информация о том, в каких частях клетки происходит интересующее взаимодействие белков, меченых донором и акцептором. Поэтому микроскопия является неотъемлемой частью FRET экспериментов с биосенсорами или изучением белок-белковых взаимодействий.

Метод 3F-FRET не позволяет получать эффективность FRET в виде основных выходных данных из-за различных спектральных свойств донора и акцептора и из-за использования трех комбинаций фильтров. Для того, чтобы из съемок 3F-FRET получить информацию о эффективности переноса энергии было разработано несколько алгоритмов, таких как  $FRET^C$  [88],  $N_{FRET}$  [89] и  $FRET_N$  [90]. Эти алгоритмы направлены на коррекцию FRET сигнала на сигналы донора и акцептора, однако, имеют недостатки. Эмиссия донора и акцептора, которые вступили во FRET взаимодействие, может быть представлена как сумма пяти величин [80]:

1. Флуоресценция донора:
  - 1.1. Флуоресценция свободного донора.
  - 1.2. Флуоресценция донорно-акцепторного комплекса.
2. Флуоресценции акцептора:
  - 2.1. Флуоресценция свободного акцептора.
  - 2.2. Флуоресценция напрямую возбужденного акцептора в донорно-акцепторном комплексе.
  - 2.3. Флуоресценция акцептора в донорно-акцепторном комплексе за счет резонансного переноса энергии.

3F-FRET широко распространен, однако, напрямую эффективность резонансного переноса энергии с использованием обычных флуоресцентных белков можно получить только с использованием FLIM или при необратимом фотообесцвечивании акцептора.

Более перспективным методом FRET является фотохромный pcFRET, для которого используются фотопереключаемые флуоресцентные белки. Так, в 2010 году был разработан белок rsTagRFP, который при облучении светом с длиной волны 550 нм конвертируется в нефлуоресцентное состояние, а при облучении светом длиной волны 440 нм конвертируется обратно [91]. Как было показано для пары EYFP-rsTagRFP, двух изображений одной и той же клетки с акцептором rsTagRFP в “включенном” и “выключенном” состоянии достаточно для детекции сигнала FRET. Еще одним преимуществом подхода pcFRET является то, что для него требуется только широкопольный микроскоп или стандартный конфокальный микроскоп. Такой подход с использованием фотопереключаемого флуоресцентного белка в качестве модулируемого акцептора позволил получать контрольное измерение FRET многократно путем обратимого переключения в нефлуоресцентную форму. Помимо rsTagRFP существует множество фотопереключаемых белков, которые использовались в pcFRET как в качестве доноров, так и в качестве акцепторов энергии. Dendra2, mEos2, Kaede, mKikGR, mClavGR2 и их производные спектр эмиссии с зеленого до красного при облучении фототоксичным ультрафиолетом (длина волны 390-410 нм). Также есть белки PSCFP и PSCFP2, меняющие спектр эмиссии с синего на зеленый, однако их фотоконверсия тоже требует использования ультрафиолета [92]. Позднее был создан мономерный белок PSmOrange. PSmOrange изначально флуоресцирует в оранжевой области спектра, но становится дальнекрасным при облучении сине-зеленым светом (480-540 нм). Этот белок был первым фотопереключаемым белком, для фотопереключения которого не требовался фототоксичный ультрафиолет [93].

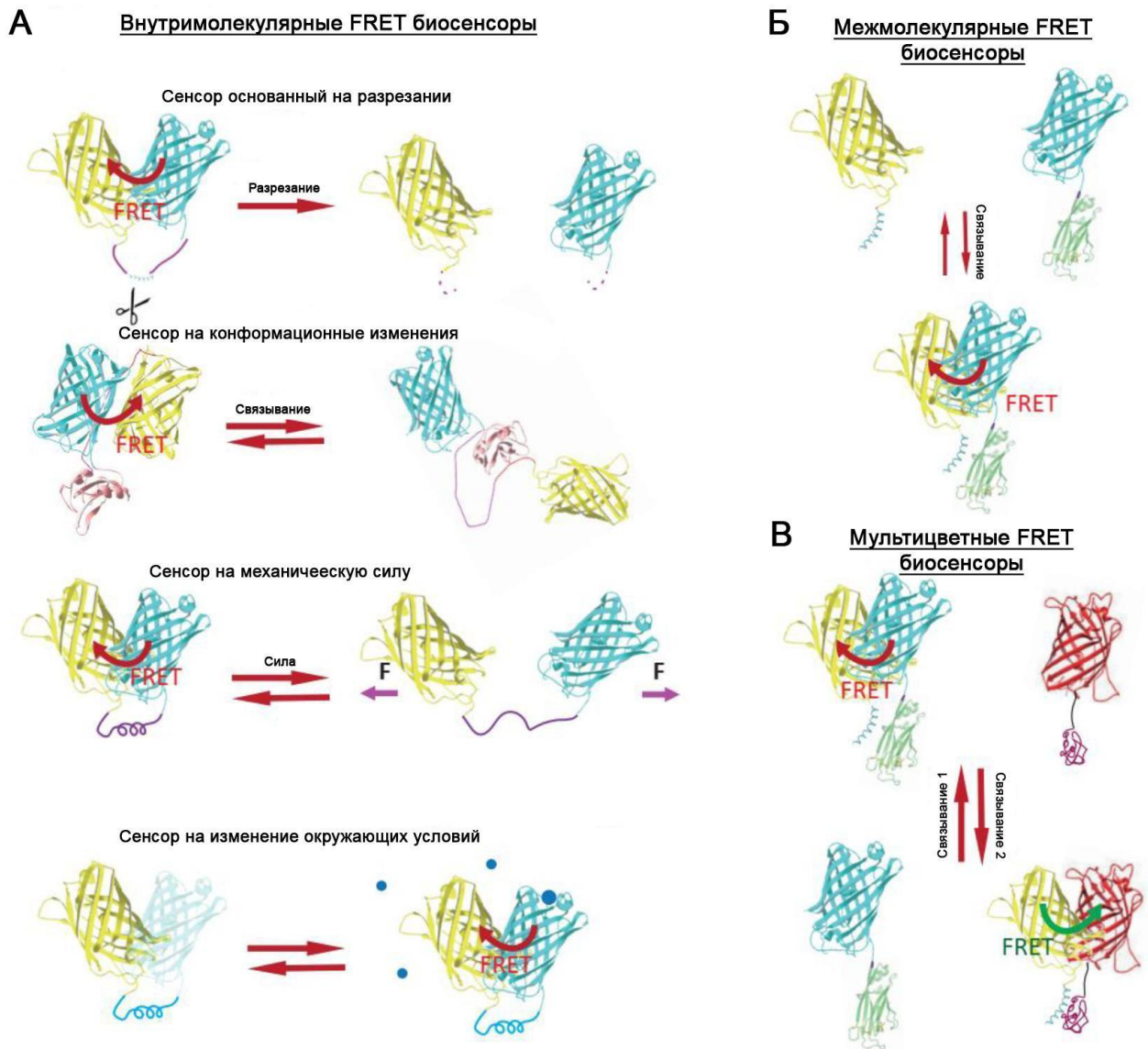
Таким образом, метод изучения белок-белковых взаимодействий на основе фотопереключаемых флуоресцентных белков позволяет отслеживать динамику взаимодействия между белками в живых клетках, что является его главным преимуществом перед другими методами. Однако, для фотопереключения требуется облучение, которое постепенно приводит к необратимому фотообесцвечиванию и может быть фототоксично для клеток.

### **2.3.3. Применение резонансного переноса энергии в биологических исследованиях.**

Благодаря своей чувствительности к межмолекулярному расстоянию и взаимной ориентации донора и акцептора, FRET пары нашли широкое применение в биосенсорах [94]. В качестве FRET пар для исследования живых систем использовали органические флуорофоры [95], квантовые точки [96,97], и флуоресцентные белки [94]. Флуоресцентные белки в качестве FRET пар распространены наиболее широко за счет того, что они хорошо совместимы с экспериментами в живых клетках и целых организмах [98].

Классической FRET парой является пара голубого флуоресцентного белка CFP и желтого флуоресцентного белка YFP [99]. Позднее была разработана FRET пара с улучшенными версиями этих флуоресцентных белков - ECFP и YPet, которые обеспечивают более высокую чувствительность [100,101]. Флуоресцентные белки, излучающие в других областях спектра также успешно применяются в составе биосенсоров. Например, зеленый флуоресцентный белок mNeonGreen является хорошим донором для красных флуоресцентных белков, таких как mCherry и mScarlet [102]. Также есть и FRET пары в красной области видимого спектра, например, красный флуоресцентный белок mKate2 и дальнекрасный флуоресцентный белок iRFP [103].

Частью любого биосенсора кроме самой FRET пары является сенсорная часть, за счет которой происходит изменение конформации биосенсора и сближение или отдаление донорного и акцепторного флуоресцентного белка. Основные виды FRET биосенсоров показаны на рисунке 8.



**Рисунок 8.** Классификация FRET биосенсоров. Основываясь на том, находится ли FRET пара в рамках одной молекулы или нет можно разделить биосенсоры на внутримолекулярные (А) и межмолекулярные (Б). Внутримолекулярные биосенсоры в свою очередь можно разделить на сенсоры изменения дистанции между компонентами FRET пары, либо на изменение свойств флуоресцентных белков в составе FRET пары. (В) Многоцветные FRET биосенсоры обычно включают в себя более двух флуоресцентных белков и могут быть использованы для микроскопии различных внутриклеточных событий. Адаптировано из [104].

С помощью таких биосенсоров можно измерять большой спектр внутриклеточной активности, от концентрации определенных веществ или



метиляции хроматина, до детекции силы натяжения при движении клетки [105–108].

Кроме сенсоров на внутриклеточную активность с помощью FRET можно изучать взаимодействия различных белков в клетке [109–111]. Чаще всего для этого создаются генно-инженерные конструкции, кодирующие белки слияния интересующих потенциально взаимодействующих белков и флуоресцентных белков донора и акцептора. Такие FRET эксперименты позволяют не только детектировать белок-белковые взаимодействия как таковые, но и изучать их в зависимости от состояния клеток в разных условиях [112].

#### **2.3.4. Резонансный перенос энергии на уровне одиночных молекул.**

В молекулярном масштабе с помощью FRET становится возможным выявление основ функциональной конформационной динамики белков. При этом охватывается практически весь возможный временной диапазон от наносекунд до секунд. Спектроскопия FRET на уровне одиночных молекул (smFRET) может быть поделена на две основные группы на основе покрываемых временных диапазонов. Медленная конформационная динамика (10 мс - 1 с) изучается на молекулах, иммобилизованных на определенной поверхности, а быстрая (нс - мкс) на диффундирующих в растворе молекулах. В обоих случаях молекулы должны быть помечены одновременно двумя флуоресцентными молекулами, донором и акцептором. Хотя существуют работы, где использовали три [113] и четыре [114] флуоресцентные метки одновременно.

Иммобилизованные молекулы можно наблюдать непрерывно в течение длительного времени, которое ограничивается только фотостабильностью флуоресцентных меток. Такие эксперименты чаще всего проводятся с помощью TIRF микроскопии, а интенсивность флуоресценции донора и акцептора детектируются одновременно на двух половинках матрицы [115]. Полученные таким образом временные траектории одиночных молекул используются для определения подробной динамической модели, которая включает количество

соответствующих конформационных состояний и скоростей перехода между ними.

Многие белки обладают очень быстрой конформационной подвижностью в диапазоне от наносекунд до микросекунд. Динамику таких белков можно изучать в растворе используя сфокусированный пучок лазера конфокального микроскопа [116]. Типичное время прохождения молекулы через фокусный объем пучка лазера составляет около 1 мс. Вспышки фотонов, излучаемых при прохождении молекулы через пучок собираются с помощью высокочувствительных фотодиодов, которые позволяют регистрировать время появления донорных и акцепторных фотонов с пикосекундным разрешением [116]. Затем эффективность FRET может быть рассчитана на основе числа зарегистрированных фотонов.

Помимо внутримолекулярной динамики smFRET позволяет изучать белок-белковые взаимодействия. Наиболее сложным является изучение таких взаимодействий в живых системах. Не так давно был предложен универсальный метод для изучения трансмембранных олигомерных белковых комплексов на примере димеров G-белок сопряженных рецепторов [117]. В нем используется система ковалентного сайт-специфического мечения SNAP [118], которая позволяет использовать яркие самовосстанавливающиеся органические флуорофоры, эффективность которых не зависит от присутствия в среде токсичных флостабилизирующих агентов.

#### **2.4. Сплит системы для белок-белковых взаимодействий.**

Помимо резонансного переноса энергии белок-белковые взаимодействия можно изучать с помощью бимолекулярной комплементации. Бимолекулярная флуоресцентная комплементация основана на том, что два нефлуоресцентных фрагмента флуоресцентного белка (N и C фрагменты) при сближении образуют полноразмерный функциональный белок. В этой структуре путем автокатализа образуется хромофор и восстанавливается флуоресценция белка [119]. Подобная система из двух фрагментов также называется сплит-системой.

Метки для бимолекулярной комплементации были созданы на основе многих флуоресцентных белков, например, на основе eYFP и mVenus [120,121]. В ходе разработки подобных меток было найдено несколько рабочих позиций для расщепления и создания собирающихся фрагментов. На примере eYFP, первая позиция - между Ala154 и Asp155, находится между седьмым и восьмым  $\beta$ -листом флуоресцентного белка [119]. Вторая позиция между Glu172 и Asp173, разделяет восьмой и девятый  $\beta$ -лист [122]. Третья и наиболее частая позиция для флуоресцентных систем комплементации находится после 210 аминокислотного остатка и разделяет десятый и одиннадцатый  $\beta$ -листы [123]. В результате разделения цепи в этом месте полученная сплит-система состоит из почти полноценного флуоресцентного бочонка и очень короткого фрагмента, который представляет из себя последний 11-ый  $\beta$ -лист.

Хотя разделение по положению 172, по-видимому, приводит к наибольшей интенсивности сигнала флуоресценции eYFP, оно также усиливает фоновую флуоресценцию. Сплит по положению 154 обладает меньшей фоновой флуоресценцией [124]. Также, разделение после остатка 210 значительно снижает неспецифическую сборку полноразмерного белка и уровень фоновой флуоресценции [123,125].

Неотъемлемой особенностью бимолекулярной комплементации флуоресцентных белков является необратимость образования полноразмерного функционального белка. Собранный флуоресцентный белок стабилизируется за счет обширной поверхности взаимодействия между двумя фрагментами, которая, в случае eYFP, включает более 30 водородных связей [126]. Эта особенность в значительной степени препятствовала использованию методов, основанных на бимолекулярной комплементации, для анализа динамики образования белковых комплексов или динамики белок-белковых взаимодействий. С другой стороны исключительная стабильность образующейся флуоресцентной метки облегчает визуализацию даже слабых или кратковременных взаимодействий (например, взаимодействий протеинкиназ с их субстратами), которые часто трудно обнаружить альтернативными методами [127].

Позднее была создана сплит-система, основанная на инфракрасном флуоресцентном белке IFP1.4 из *Deinococcus radiodurans* [128]. В отличие от предыдущих сплит-систем, сборка полноразмерного IFP является обратимой, что позволяет, например, анализировать пространственно-временную динамику индуцированных гормонами сигнальных комплексов в живых клетках дрожжей и млекопитающих [128]. Текущие ограничения анализа комплементации IFP заключаются в его низком квантовом выходе, низкой яркости и необходимости экзогенно добавляемого биливердина при использовании в клетках млекопитающих и дрожжей.

Другим ограничением систем бимолекулярной комплементации, которое усиливается необратимым характером восстановления полноразмерного флуоресцентного белка, является тенденция к неспецифической самосборке сплит-системы, что приводит к ложноположительному флуоресцентному сигналу. Когда концентрация обоих фрагментов eYFP (или других флуоресцентных белков) превышает определенный порог, функциональный флуоресцентный белок может собираться спонтанно, в отсутствие взаимодействия между анализируемыми белками [119,129]. Особенно актуальна данная проблема в экспериментах, в которых проводится временная трансфекция и оверэкспрессия белков интереса. Наряду с необратимостью восстановления полноразмерного флуоресцентного белка оверэкспрессия может привести к появлению артефактных взаимодействий между белками интереса, которые обычно не взаимодействуют при физиологических концентрациях.

Таким образом, сплит-системы для изучения белок-белковых взаимодействий должны обязательно обладать обратимостью образования полноразмерного функционального белка и отсутствием спонтанной самосборки фрагментов. Отсутствие хотя бы одного из этих свойств приведет к неверным интерпретациям результатов и невозможности оценки белок-белковых взаимодействий.

## 2.5. Флуороген-активирующие белки.

Современным классом меток для флуоресцентной микроскопии являются флуороген-активирующие белки. Они состоят из двух компонентов: лиганд-связывающего белка и флуорогена. Функционирование данных меток основано на том, что при связывании меняются физико-химические свойства флуорогена, при этом связывание флуорогена с белком нековалентно. Механизм подобной активации это комплексный процесс, состоящий из блокировки торсионных поворотов вокруг одинарных связей флуорогена, стабилизации конформации и изменении полярности микроокружения флуорогена при связывании в кармане флуороген-активирующего белка. Чаще всего при связывании увеличивается квантовый выход флуорогена и происходит сдвиг пиков возбуждения и эмиссии флуоресценции.

Одной из первых работ в области взаимодействия флуорогенов с белками была работа, в которой вещество из класса флуоресцентных молекулярных роторов связывалось с полимеризующимся тубулином *in vitro*. При этом блокировалась ротационная релаксация молекулы флуорогена и увеличивалась ее флуоресценция [130]. Другая научная группа получила моноклональные антитела на вещества из того же класса молекулярных роторов [131]. Эта работа послужила своеобразной демонстрацией возможности создания антител на флуорогенные молекулы, с помощью которых можно стабилизировать конформацию флуорогенов и усиливать их флуоресценцию. Данная работа предвосхитила создание системы флуоресцентного мечения на основе антител к флуорогенным молекулам.

В 2008 году Szent-Gyorgyi с коллегами получили одноцепочечные антитела специфически связывающие тиазоловый оранжевый и малахитовый зеленый. Эти антитела с флуорогенами были успешно использованы для визуализации поверхности клетки и секреторный аппарат [132]. Данная система на основе антител к флуорогенам стала довольно быстро развиваться. Появился очень широкий спектр антител на различные флуорогены, в сумме покрывающие практически весь видимый спектр света от синего до ближнего

инфракрасного [133,134]. Быстро расширялась и область применения данной системы. Были созданы pH сенсоры [135], фотосенсибилизатор [136] и так называемые аффибоди [137–139]. Аффинность большинства флуорогенов к антителам очень высока и находится в области нескольких наномоль [132]. Система мечения на основе флуороген-активирующих антител также была успешно использована в условиях локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения как в живых так и в фиксированных клетках [140].

Другой представитель флуороген-активирующих белков - белок UnaG, который обратимо связывает эндогенный лиганд билирубин [141]. Этот белок впервые был найден в скелетных мышцах японского угря, в основном в мышечных волокнах небольшого диаметра [142]. Масса UnaG меньше, чем у обычных флуоресцентных белков и составляет около 15,6 кДа. Несмотря на то, что аффинность UnaG к билирубину очень высокая ( $K_d = 98$  пМ), эту систему успешно применили в условиях локализационной микроскопии. Хорошая обменяемость может объясняться тем, что кислород переключает билирубин в нефлуоресцентное состояние, при этом окисленный билирубин может легко покидать лиганд-связывающий карман [143]. Кинетику этого процесса можно легко контролировать меняя мощность облучения и концентрацию экзогенного билирубина. При этом действительная константа диссоциации окисленного билирубина остается неизвестной.

Позднее был разработан флуороген-активирующий белок Y-FAST (далее - FAST) [144]. Он был получен путем направленной эволюции фотоактивного желтого белка RYR. Этот белок практически в два раза меньше, чем обычные флуоресцентные белки (~14 кДа). Ядро флуорогеном для белка FAST похожи на хромофор флуоресцентного белка GFP. Уникальной особенностью этой системы мечения является высокое соотношение сигнал-шум, которое объясняется батохромным сдвигом спектра возбуждения флуорогена внутри лиганд-связывающего кармана FAST. Первым флуорогеном, разработанным для белка FAST был HMBR (4-hydroxy-3-methylbenzylidene-rhodanine). В связанном состоянии пик спектра возбуждения находится на 481 нм, а пик эмиссии на 540

нм. Такой сдвиг возбуждения происходит из-за депротонирования хромофора при связывании с FAST. При этом свободный HMBR полностью протонирован при физиологических значениях pH. Несмотря на относительно невысокую аффинность ( $K_d \sim 130$  нМ, время жизни комплекса  $\sim 160$  мс при  $25^\circ\text{C}$ ), при мечении структур в живых клетках достигается очень высокое отношение сигнал-шум [144]. Система флуоресцентного мечения на основе белка FAST быстро развивалась, что привело к разработке многих хемогенетических инструментов на ее основе. Например, была получена мутантная версия - белок iFAST, отличающийся более высокой яркостью и тандемный td-iFAST на его основе [145]. Было создано большое количество хромофоров, флуоресцирующих в красной области спектра. Разнообразие флуорогенов разных цветов и общее свойство обменяемости позволило провести мультицветное мечение белков в живых клетках с помощью поочередного добавления и отмывки разных флуорогенов [146–149]. Авторами системы на основе FAST были созданы многие полезные хемогенетические инструменты: сплит-система [150], ортогональные мутанты greenFAST и redFAST, каждый из которых связывает соответственно только зеленый и только красный флуорогены [151,152], и новые улучшенные варианты белка FAST с новыми вариантами флуорогенов [153]. Также была показана возможность применения нового варианта FAST как акцептора для переноса энергии. Так, был создан FRET биосенсор на основе серин/треониновой киназы AURKA [153]. Совсем недавно нам совместно с коллегами из ИБХ РАН удалось с помощью анализа структуры комплекса FAST-флуороген, полученной с помощью ЯМР, укоротить белок FAST и создать флуороген-активирующий белок длиной всего 98 аминокислот [154].

Также система на основе FAST была опробована в условиях локализационной микроскопии в живых и фиксированных клетках. За счет обменяемости флуорогена и активации флуоресценции при связывании, моменты связывания можно детектировать в виде вспышек, что позволяет реконструировать сверхразрешенное изображение [155]. Однако реконструкция

клеточных структур, меченых белком FAST, не такая простая задача. Флуороген не фотостабилен и при малых его концентрациях быстро фотообесцвечивается при высокой мощности облучения. Но добавление специального буфера с глюкозооксидазой и каталазой, для создания условий с пониженной концентрацией кислорода снижает скорость фотообесцвечивания хромофора и позволяет проводить более длительные съемки. Тем не менее, чтобы реконструировать волокно тубулина у авторов ушло около часа непрерывной съемки и 90000 кадров, чтобы реконструировать микротрубочку. Это связано с очень невысокой плотностью локализаций при съемке. Плохая применимость FAST в условиях локализационной микроскопии компенсируется тем, что за счет обменяемости флуорогена можно детектировать радиальные флуктуации яркости. Это свойство позволяет провести SRRF анализ и получить сверхразрешенное изображение меченой структуры [156].

Вскоре после первого появления системы FAST, появилась аналогичная система под названием DiB (“Dye in Blc”) на основе GFP-подобных флуорогенов и белка бактериального липокалина Blc [157]. Эта система мечения разрабатывалась в нашей лаборатории. Акцент при разработке системы мечения был сделан именно на съемку в условиях локализационной микроскопии в живых клетках и низкую аффинность хромофора, как ключ к высокой фотостабильности и стабильности плотности мечения. Первые варианты системы мечения были получены путем *in silico* моделирования библиотеки мутантов липокалина Blc и виртуального докинга с хромофором GFP. Далее лучшие виртуальные варианты (DiB1, DiB2 и DiB3) заклонированы в экспрессионные вектора, выделены и проскринированы *in vitro* против библиотеки флуорогенов. Одним из лучших хромофоров для всех трех вариантов липокалина оказался M739, у которого имеется отличительная особенность. Он имеет в своем составе флуороборатную группу (-BF<sub>2</sub>), которая блокирует фотоизомеризацию, увеличивая квантовый выход флуоресценции. Константы диссоциации этих мутантов с флуорогеном M739 находятся в диапазоне от 0,1 до 9 мкМ. Система мечения на основе липокалинов показывает



более высокую фотостабильность, чем большинство обычных флуоресцентных белков. За счет высокой фотостабильности липокалина можно использовать в условиях STED микроскопии, для которых требуется мощное облучение. Но лучше всего данная система мечения показывает себя в локализационной микроскопии, значительно превосходя FAST.

Методы компьютерного моделирования, молекулярной динамики и предсказания сворачивания белков активно развиваются в настоящее время. Недавние достижения в этой области позволили *de novo* создать белок типа бета-бочонок, связывающий и активирующий флуоресценцию флуорогенов [158]. Впервые таким образом были созданы белки mFAP1 и mFAP2, связывающие DFHBI с константами диссоциации 0,18 и 0,56 мкМ соответственно. Однако квантовый выход флуоресценции оказался слишком низким, всего 2%, что соответствует яркости в 35 раз меньшей относительно яркости флуоресцентного белка EGFP. Несмотря на это, *de novo* бета-бочонок стал хорошей платформой для внедрения в биосенсорных функций. Таким образом была получена сплит-система для детекции ассоциации и диссоциации белков, сенсоры на изменение pH и колебаний концентрации кальция [159]. Вместе с новыми сенсорами была создана улучшенная версия бета-бочонка mFAP10, который в комплексе с флуорогеном DFHBI-1T дает квантовый выход флуоресценции около 23%, что соответствует яркости всего в два раза меньшей, чем у флуоресцентного белка EGFP.

Как это ни удивительно, одна из последних разработок в области флуороген-активирующих белков основана на димерных транскрипционных факторах LamR и RamR [160]. Создатели этой системы сделали акцент на применимости метки для *in vivo* мечения бактериальных белков и коммерческой доступности флуорогенов. В транскрипционные факторы были внесены замены для того, чтобы свести к минимуму ДНК связывающую функцию. Интересно, что в одном гомодимере LamR есть два лиганд-связывающих участка в отличие от RamR, в гомодимере которого всего один такой участок. В качестве рабочих флуорогенов для этих белков подходят широко известные и легкодоступные

хромофоры из семейств DFHBI и BODIPY. Константы диссоциации комплексов лежат в диапазоне от субмикромоль до нескольких микромоль, что позволяет отмывать хромофор от клеток и добавлять другой хромофор.

Самая последняя разработка в этой области - система флуоресцентного мечения на основе белка HaloTag7 с новым классом синтетических хромофоров, у которых изменена часть структуры, отвечающая за связывание с белком [161]. Это изменение позволило сделать взаимодействие белка с хромофором нековалентным и обеспечить обмениваемость метки. Система мечения с новыми хромофорами была протестирована в условиях наноскопии фиксированных клеток. Однако, время нахождения хромофора в связанном состоянии в среднем составляет более одной секунды. За счет этого вспышки флуоресценции, наблюдаемые в локализационной микроскопии, живут слишком долго для того, чтобы обеспечить оптимальную скорость съемки и обеспечить быструю реконструкцию внутриклеточных структур.

Системы флуоресцентного мечения на основе флуороген-активирующих белков являются мощным инструментом. С их помощью становится возможным проведение очень длительных съемок или замена флуорогена, что не может быть достигнуто с помощью флуоресцентных белков. Также флуороген-активирующие белки можно с успехом использовать в условиях сверхразрешающей микроскопии в живых и фиксированных клетках.

Интересно, что более десяти лет прошло с момента первого получения антитела к молекуле из класса молекулярных роторов до того, как принцип связывания флуорогена с специальным белком был использован для создания системы флуоресцентного мечения. Но на данный момент класс меток на основе флуороген-активирующих белков развивается довольно быстро и разные представители этого класса заняли отдельные ниши в микроскопии и флуоресцентном мечении. Метки из семейства FAST отлично подходят для мечения белков в живых клетках и даже в целых организмах в условиях широкопольной флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Также возможно многоцветное мечение с использованием ортогональных вариантов

белка FAST с двумя флуорогенами. Очень низкая неспецифическая флуоресценция в мембранах и высокие соотношения сигнал-шум делает белки FAST хорошей системой для флуоресцентного мечения. Семейство меток DiB на основе бактериального липокалина B1c немного уступает в этом поле системе FAST за счет более высокого флуоресцентного фона флуорогенов в клеточных мембранах. Однако, в условиях локализационной микроскопии в живых клетках системе на основе липокалинов DiB нет равных. Высокая стабильность плотности локализаций в комбинации с высокой яркостью на уровне одиночных молекул делает семейство меток DiB лучшим для сверхразрешения в живых клетках, включая наноскопию с разрешением во времени.

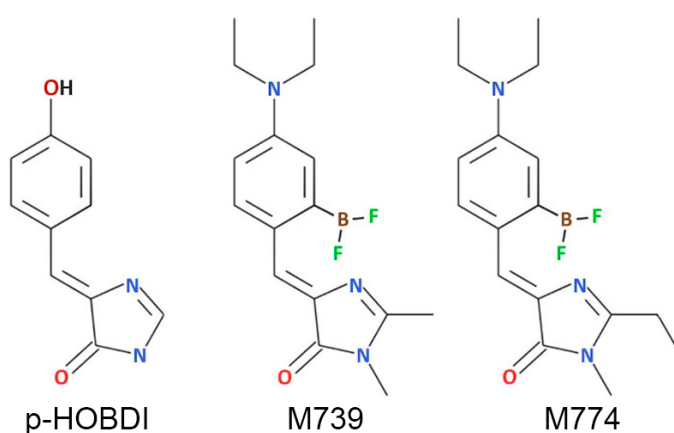
Несмотря на широкое разнообразие флуороген-активирующих систем флуоресцентного мечения, все из них имеют свои плюсы и минусы, и ни одна из них пока что не может претендовать на универсальность.

## **2.6. Бактериальный липокалин как флуороген активирующий белок.**

Система мечения, тестируемая в данной работе, является двухкомпонентной и состоит из лиганд-связывающего белка бактериального липокалина и синтетических аналогов хромофора флуоресцентного белка GFP.

Хромофор GFP является продуктом автокатализа трех аминокислот Ser65, Tyr66 и Gly67 [162,163], а его ядро представляет из себя соединение *p*-HOBDI (Рисунок 9). Ранее было получено два аналога хромофора GFP с высоким квантовым выходом флуоресценции: *p*-HOBDI-BF<sub>2</sub> и *p*-HOpyDI:Zn [164]. Оба эти вещества конформационно заблокированы и являются первыми синтетическими аналогами хромофора GFP с полностью планарной конформацией. Хромофор с цинком блокируется обратимо, в то время как хромофор с флуороборатной группировкой заблокирован жестко. Подобная блокировка конформации позволяет значительно увеличить квантовый выход флуоресценции, за счет запрета фотоизомеризации. Позднее на основе

хромофора с флуороборатной группировкой был создан класс аминированных аналогов хромофора GFP (ядро ABDI-BF<sub>2</sub>) [165,166]. Новые аминированные производные с заблокированной фотоизомеризацией имеют больший квантовый выход, спектр эмиссии за счет аминирования сдвинут в красную область, стабильны в физиологическом диапазоне pH и быстро проникают сквозь клеточные мембраны [165,166]. Данное заблокированное ядро ABDI-BF<sub>2</sub> является хорошей базой для модификации за счет внесения различных заместителей (Рисунок 9) для получения широкого разнообразия спектральных свойств хромофоров.



**Рисунок 9.** Химические структуры ядер хромофоров GFP и его аминированных флуороборатных аналогов. (А) Структура хромофора p-HOBDI. (Б) Структура некоторых представителей синтетических конформационно заблокированных аминированных аналогов хромофора GFP.

В качестве второй части двухкомпонентной системы мечения выступает бактериальный липокалин B1c [167,168]. Он является хорошей стартовой точкой в качестве основы для дальнейшей разработки флуороген-активирующего белка за счет своей способности связывать низкомолекулярные лиганды.

Липокалины представляют собой суперсемейство функционально разнообразных белков, определяемых хорошо консервативной третичной структурой, несмотря на вариации в последовательности. Третичная структура представляет собой бочонок из 8 бета-складок и C-концевой домен с альфа-спиралью (Рисунок 10). В то же время липокалины очень слабо

консервативны по аминокислотной последовательности. Было описано всего несколько более менее общих сигнатур, среди которых, например, GXW мотив на N-конце белка [169]. Систематизация липокалиновых последовательностей привела к выделению ~14 клад [170]. Первая клада корневая и содержит в основном бактериальные липокалины, вторая клада - липокалины насекомых. Остальные липокалины эукариот содержатся в более высоких кладах.



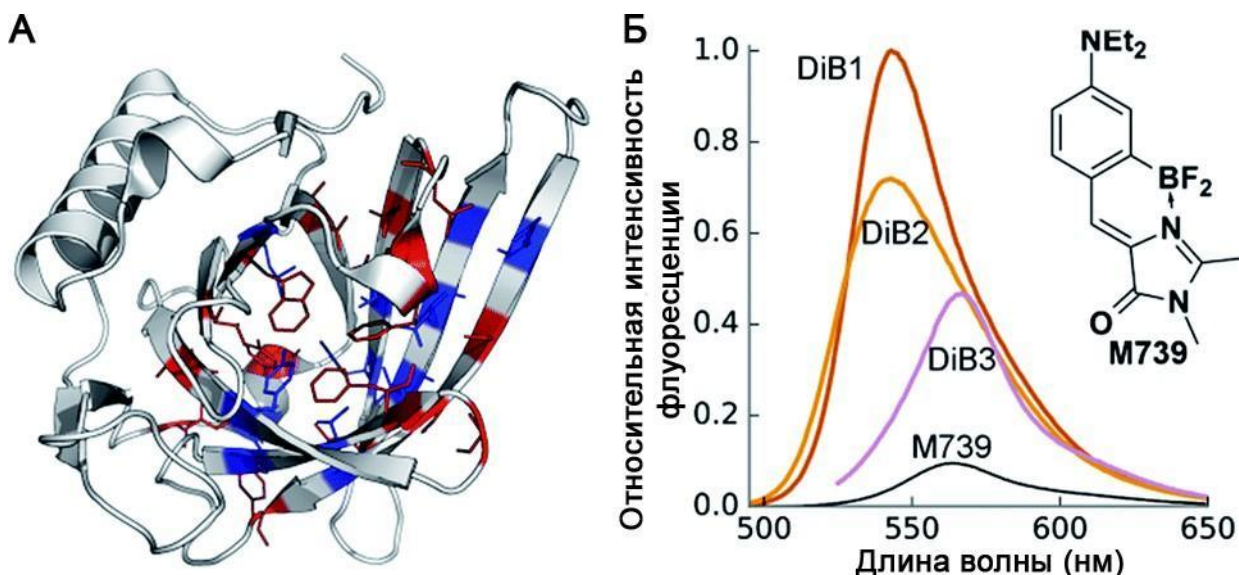
**Рисунок 10.** Структура бактериального липокалина B1c (кристалл PDB ID: 1QWD).

Первый бактериальный липокалин был идентифицирован в *Escherichia coli*, как липопротеин внешней мембраны. Его экспрессия чаще всего активируется в ответ на стресс, такой как голод или высокая осмолярность. От большинства других белков семейства липокалинов, бактериальный липокалин отличается отсутствием внутримолекулярных дисульфидных мостиков [171]. Функцией бактериальных липокалинов является перенос липидов. Кристаллизация бактериального липокалина позволила увидеть, что его структура довольно схожа с структурой билин-связывающего белка [172]. В отличие от билин связывающего белка, лиганд-связывающий карман липокалина удлинен, за счет чего предположили его неспособность связывать большие лиганды, такие как билины или гем. Было показано, что акой

лиганд-связывающий карман вполне подходит для связывания двух цепей жирных кислот, расположенных бок о бок [173]. Однако, позднее на основании массспектрометрических анализов, молекулярного моделирования и совместной кристаллизацией бактериального липокалина B1c с гемом было доказано, что липокалин способен связывать и такие большие лиганды, как гем [174].

Ранее в лаборатории биофотоники Божановой Н.Г. и др. была разработана первая серия мутантных форм липокалина, использованных для флуоресцентного мечения внутриклеточных структур в условиях широкопольной микроскопии, локализационной и микроскопии STED [175].

В основе разработке лежал *in silico* мутагенез лиганд-связывающего кармана бактериального липокалина B1c и последующий виртуальный докинг молекулы хромофора GFP в полученные мутантные структуры. На основании докинг-метрик было выбрано 19 лучших мутантов липокалина для дальнейшего клонирования, выделения и очистки белков. Полученные 19 мутантов липокалина были *in vitro* проскринированы против библиотеки хромофоров синтетических аналогов GFP. По ходу скрининга были отфильтрованы хромофоры, показывающие слишком высокую кросс-реактивность среди липокалинов, а также имеющие выраженную автофлуоресценцию в клеточных культурах млекопитающих. В результате было получено 3 мутанта липокалина с наилучшими показателями разгорания флуоресценции хромофора M739 в комплексе (Рисунок 11). Они были названы DiB1, DiB2 и DiB3 (объединенное название - липокалина первого поколения) [176]. Были измерены их спектральные свойства и относительная фотостабильность (Таблица 1).



**Рисунок 11.** Структура лиганд-связывающего кармана липокалина B1c и спектры флуоресценции комплексов мутантов липокалина. (А) Структура липокалина B1c (PDB ID: 1QWD) с выделенными аминокислотами, образующими лиганд-связывающий карман. Аминокислоты подвергнутые мутагенезу и проверке *in vitro* обозначены синим цветом. (Б) Изменение флуоресценции после формирования комплекса липокалин-хромофор. Показаны спектры эмиссии комплексов мутантных форм липокалина в присутствии одинаковой насыщающей концентрации хромофора M739. Спектры нормализованы на максимум эмиссии комплекса DiB1:M739. Адаптировано из [177].

**Таблица 1.** Характеристики комплексов липокалинов DiB1, DiB2 и DiB3 с хромофором M739. Адаптировано из [177].

	Мутации	$\lambda_{\text{возб.}}$ нм	$\lambda_{\text{эмиссии}}$ нм	QY, %	$\epsilon$ , $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$	Разгорание флуор.**	$K_d$ , мкМ	Фотостаб. ***
DiB1	A27C/ L132N	513	542	32	45800	52	0,1	x2 (EGFP)
DiB2	A27C	510	539	32	51000	64	4	x6 (EGFP)
DiB3	V74F/ L132Q	546	565	15	43000	11	9	x10 (mKate)
M739	-	520	563	3.5	53500	-	-	-

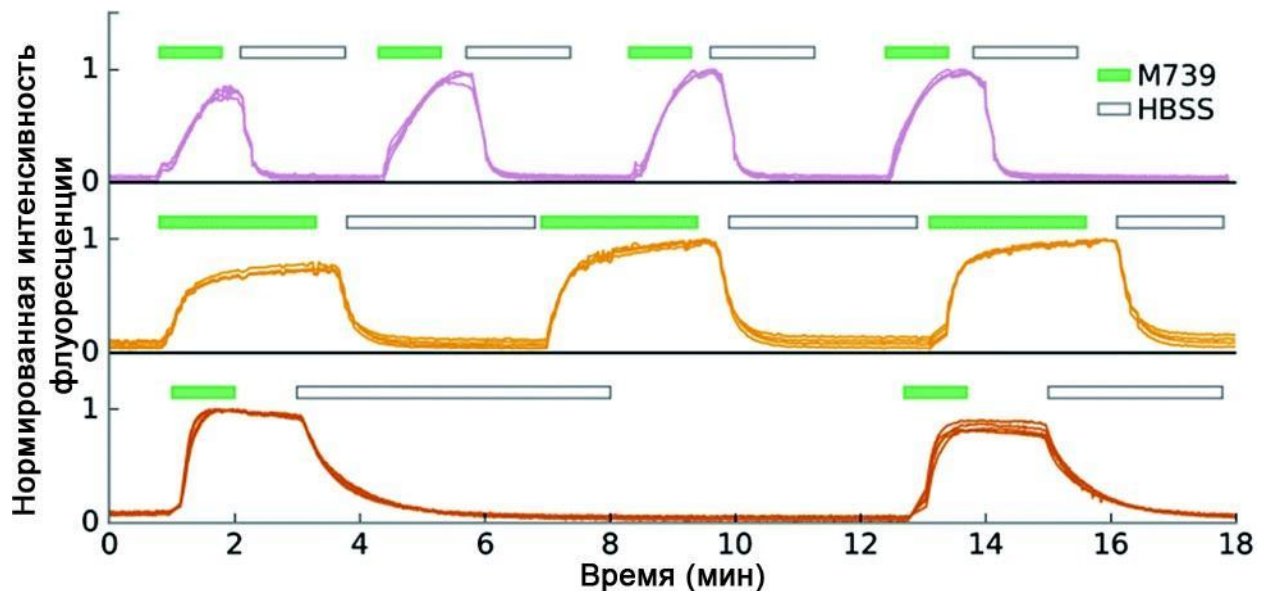
\* - квантовый выход флуоресценции.

\*\* - Разгорание флуоресценции относительно свободного хромофора M739 в условиях конфокальной микроскопии (возбуждение 488, детекция 500-530 нм для DiB1 и DiB2, и возбуждение 561, детекция 580-620 нм для DiB3)

\*\*\* - Фотостабильность комплексов относительно спектрально близких флуоресцентных белков EGFP и mKate. За величину сравнения взято время, за которое интенсивность флуоресценции падает на 50%.

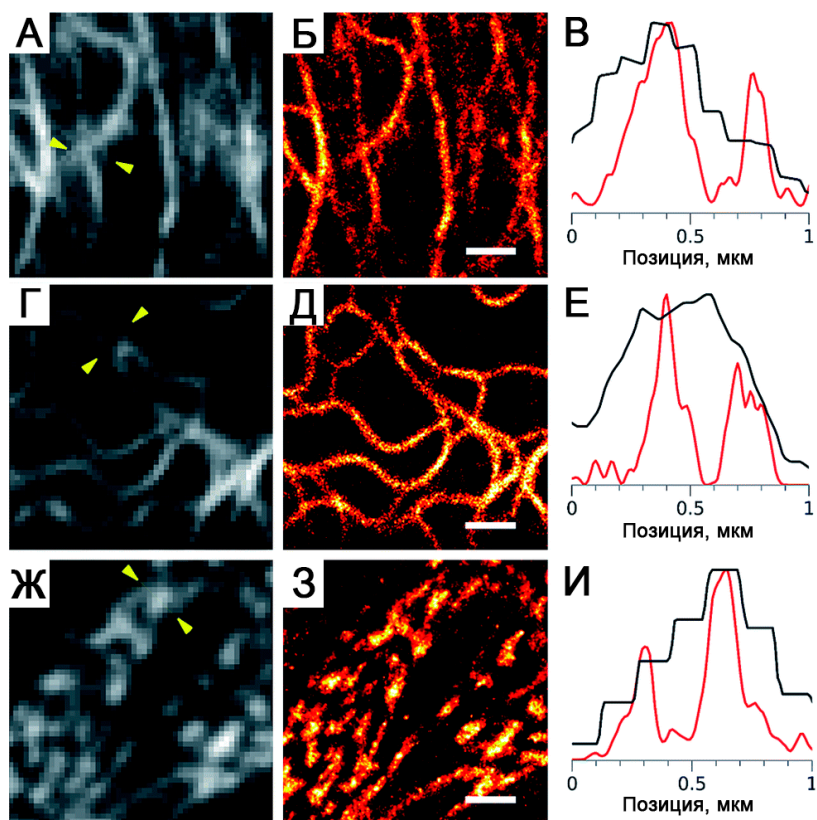
Основной особенностью этой системы мечения является нековалентное связывание хромофора и низкая аффинность. На этом свойстве строятся все преимущества этой системы мечения относительно флуоресцентных белков, систем ферментативного мечения и антител. Три отобранных липокалина DiB имеют разные константы диссоциации хромофора M739, за счет чего отличается и кинетика отмывки-прокрашивания меченых структур в клетках (Рисунок 12).





**Рисунок 12.** Поочередной добавление и отмывка хромофора к клеткам HeLa Kyoto временно трансфицированным генноинженерными конструкциями, кодирующими белок слияния гистона H2B с тремя разными мутантными формами липокалина (сверху-вниз: DiB3, DiB2, DiB1). Зеленый и белый прямоугольники обозначают добавление хромофора M739 (0,5  $\mu\text{M}$ ) и промывку клеток буфером HBSS соответственно. Отдельные кривые соответствуют отдельным клеткам. Адаптировано из [178].

Также нековалентное связывание и активация флуоресценции позволяет использовать нашу систему мечения в локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения, регистрируя события образования комплексов липокалин-хромофор в виде вспышек. С помощью липокалинов DiB1/2/3 были получены субдифракционные реконструкции виментина, цитокератина и  $\alpha$ -актинина (Рисунок 13).



**Рисунок 13.** Локализационная микроскопия сверхвысокого разрешения с использованием системы мечения на основе липокалина и хромофоров. Живые клетки HeLa Kyoto были временно трансфицированы конструкциями, кодирующими цитокератин-DiB1 (А-В), виментин-DiB2 (Г-Е) и  $\alpha$ -актинин-DiB3 (Ж-И). Широкопольные изображения (А, Г и Ж) и сверхразрешенные реконструкции (Б, Д и З) по 5000 кадрам; масштабные линейки равны 1 мкм. (В, Е и И) Нормализованные профили интенсивности флуоресценции между желтыми стрелками в условиях широкопольной (черные кривые) и локализационной (красные кривые) микроскопии. В качестве возбуждающего лазера были использованы лазеры 488 нм ( $4.5 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$ , (А-Е)) и 561 нм ( $120 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$ , (Ж-И)). Адаптировано из [176].

### 3. Материалы и методы.

#### 3.1. Среды.

- Для подращивания трансформированных бактерий использовали жидкую бактериальную среду SOB: 2% бакто-триптон (Difco), 0,55% бакто-дрожжевой экстракт (Difco), 10 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ MgSO<sub>4</sub>, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>.
- Для выращивания ночных бактериальных культур для выделения ДНК или для наработки белков использовали жидкую среду для *E. coli* (LB): 1% бакто-триптон (Difco), 0,5% бакто-дрожжевой экстракт (Difco), 1% NaCl.
- Для заливки чашек и выращивания трансформированных бактериальных колоний использовали твердую питательную среду для *E. coli* LB-агар: жидкая питательная среда LB, 1,5% бакто агар (Difco).
- Для ведения клеточных культур HEK293T, HeLa, HeLa Kyoto использовали DMEM с 2 мМ глутамином и 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, Thermo Scientific) и 100 мкг/мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко).
- Для съемки клеток млекопитающих использовали раствор Хенкса без фенолового красного (ПанЭко) с содержанием 25 мМ HEPES (Диаэм).

#### 3.2. Синтетическая ДНК.

Для сборки необходимых генно-инженерных конструкций использовали синтетическую ДНК, которая кодировала интересующие гены с адаптерами для клонирования по протоколу MoClo, содержащими сайты рестриктазы BsaI или BpiI. Синтез интересующих генов заказывали в компании Клонинг Фасилити (ИБХ РАН). Подобным образом были заказаны гены, кодирующие липокалина нового поколения, сплит-системы на основе липокалина DiB2 и DiB-RM, флуоресцентные белки, использованные в качестве доноров FRET, целевые белки для создания локализационных конструкций (виментин, энсконсин, цитокератин), биосенсоры (части винкулина, гистон H3, домен HP1) и белки для

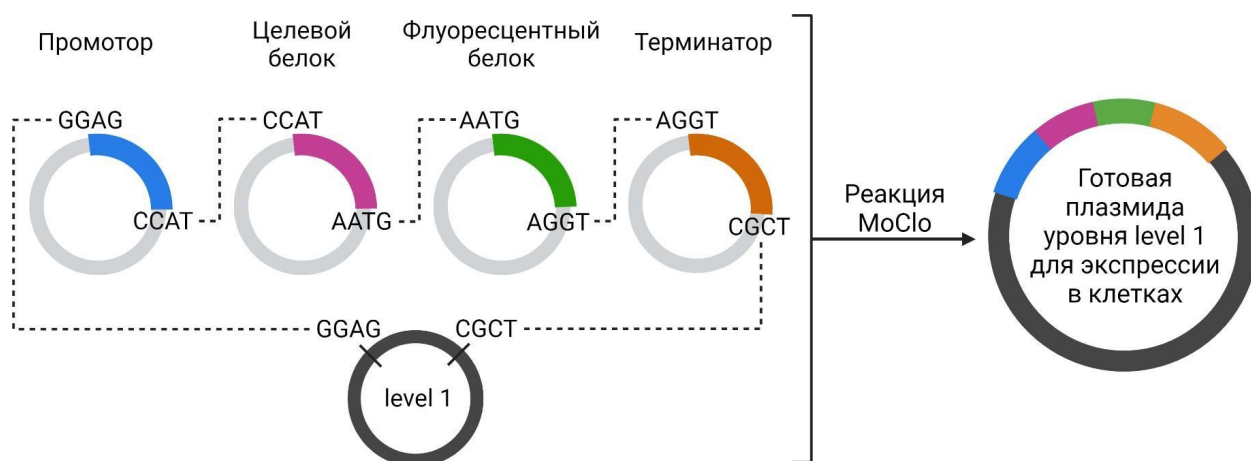
изучения белок-белковых взаимодействий (YAP1, 14-3-3).

### **3.3. Клонирование генно-инженерных конструкций.**

Клонирование всех генно-инженерных конструкций, использованных в данной работе проводили по протоколу модульного клонирования MoClo [179–181].

Метод MoClo клонирования основан на эндонуклеазах рестрикции типа II, а именно рестриктазах BpI (BbsI) и BsaI (Eco31I). Особенность этих рестриктаз заключается в том, что они производят разрез ДНК не в самом сайте узнавания, а рядом. Это позволяет, используя одни и те же рестриктазы, создать панель из различных липких концов. Таким образом создаются изначальные базовые плазмиды-модули, несущие элементарные структурные единицы, такие как промоторы, терминаторы, линкеры, белки интереса и всевозможные белки для мечения. Каркасами для плазмид-модулей служат базовые вектора, содержащие необходимые для функционирования плазмиды элементы, ориджин репликации и ген устойчивости к антибиотику. Для каждого типа элементарных модулей определены некоторые положения (комбинации липких концов), за счет которых существует определенный стандарт сборки более высокоуровневых плазмид. Например, флуоресцентные белки в модульных плаزمиде чаще всего имеют липкие концы AATG-AGGT.

Из базовых плазмид-модулей, по другому они называются плазмиды level 0, за счет того, что модули имеют разные липкие концы, можно собрать плазмиду level 1, которая будет кодировать транскрипционную единицу с промотором, терминатором и экспрессируемый белок. Схематичный пример сборки плазмиды level 1 показан на рисунке 14.



**Рисунок 14.** Схема сборки плазмиды level 1 из плазмид-модулей по протоколу MoClo. На схеме показаны составные части будущей транскрипционной единицы с подписанными липкими концами, по которым в результате реакции рестрикции-лигирования они будут лигироваться. Серые векторы - плазмиды-модули уровня level 0, несущие последовательности, кодирующие составные элементы будущей транскрипционной единицы. Черный вектор - каркас будущей плазмиды уровня level 1, в который будут встраиваться элементарные части транскрипционной единицы.

Таким образом, сборка по протоколу MoClo представляет собой реакцию рестрикции и лигирования в одной пробирке. При сборке плазмиды level 1, кодирующей транскрипционную единицу, в реакцию добавляются все необходимые плазмиды level 0 с составными частями и каркасный вектор level 1, в который произойдет встройка всех составных частей по липким концам. Также все базовые вектора для создания MoClo конструкций имеют гены для бело-голубой селекции.

Стандартный протокол реакции MoClo выглядел следующим образом: Реакционная смесь имела объем 20 мкл, из них 2 мкл 10x буфера T4 лигазы, 1 мкл T4 лигазы (Thermo Scientific) и 1 мкл эндонуклеазы рестрикции BsaI (для сборки level 1 из level 0 используется рестриктаза BsaI). К смеси добавляли ~100 нг каркасной плазмиды level 1 и по ~200-300 нг каждой

плазмиды-модуля level 0. Оставшийся объем до 20 мкл заполняли бидистиллированной водой MQ.

Реакционную смесь ставили в программируемый термостат Termix (Biolabmix) и запускали программу, которая обеспечивала циклы попеременных стадий рестрикции и лигирования. Программа выглядела следующим образом:

Количество циклов - 30. Стадии цикла:

1. 90 секунд при 37°C;
2. 180 секунд при 16°C;

В конце программы реакционную смесь подвергали обработке более высокой температурой, а именно 80°C на протяжении 5 минут для инактивации ферментов в реакционной смеси.

После завершения программы клетки XL10-Gold трансформировали 5-10 мкл реакционной смеси и растили на твердой селективной среде. Отбор бактериальных колоний, несущих правильно собранную конструкцию level 1 осуществляли с помощью бело-голубой селекции. В случае level 1 в среду добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и X-Gal до конечной концентрации 10 мкг/мл. Для наработки и очистки плазмидной ДНК отбирали белые колонии.

Ранее в нашей лаборатории были созданы следующие плазмиды-модули level 0 для сборки level 1:

- Промоторы (CMV).
- Терминаторы (SV40).
- Структурные белки (Цитокератин, виментин, гистон H2B).
- Флуоресцентные белки (mNeonGreen, mTurquoise2, Cerulean, mCerulean3, TagBFP).
- Липокалины (DiB1, DiB2, DiB3).

В рамках данной работы были созданы следующие плазмиды-модули level 0 для сборки level 1:

- Структурные белки (Энсконсин).
- Белки для изучения белок-белковых взаимодействий (YAP1, 14-3-3 сигма изоформа).
- Липокалины нового поколения (DiB3/F74V, DiB3/F53L, DiB3/F53L/F74L/L129M).
- Липокалин DiB-RM, сплит-система на его основе, а также сплит-система на основе липокалина DiB2.
- Составные части биосенсоров (Гистон H3, хромодомен HP1, Части винкулина Vh и Vt, модуль натяжения mNeonGreen-линкер-DiB1).

### **3.4. Химическая трансформация клеток *E.coli*.**

Компетентные клетки объемом 100 мкл (штаммов XL10-Gold или XJb(DE3) Autolysis (Zymo Research)) размораживали во льду в течение 15 минут. После этого добавляли 5-10 мкл реакционной смеси MoCl<sub>6</sub> или 50-100 нг ДНК в случае с перетрансформацией плазмидной ДНК. Клетки с ДНК инкубировали на льду в течение 30 мин, а затем 80 секунд в термостате при 42°C (тепловой шок). После теплового шока клетки снова помещали в лед на 3 минуты. Затем к ним добавляли 200 мкл питательной среды SOB. Суспензию инкубировали в термостате при 37°C в течение 40 минут при периодическом перемешивании. Полученную бактериальную суспензию использовали для посева на чашки Петри с агаризованной средой LB с добавлением селективного антибиотика: ампициллина (100 мкг/мл) или канамицина (40 мкг/мл). Чашки инкубировали при 37°C в течение 16-18 часов.

### **3.5. Выделение плазмидной ДНК.**

Часть колонии *E. coli*, содержащей рекомбинантную плазмиду, переносили в фалькон на 15 мл, содержащий 3,5 мл среды LB с селективным антибиотиком и инкубировали в течение 16-18 часов при 37°C на качалке при интенсивном перемешивании (~240 оборотов в минуту).

Далее проводили выделение плазмидной ДНК по протоколу Plasmid

Miniprep (Evrogen).

Клеточную культуру осаждали при 13000 об/мин 30 секунд, супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в 250 мкл ресуспендирующего раствора и добавляли 250 мкл лизирующего раствора. Перемешивали и инкубировали не более 1 минуты. Далее добавляли 350 мкл нейтрализующего раствора и перемешивали до образования творожистого осадка. Центрифугировали пробирку в течение 10 мин при 13000 об/мин. Переносили супернатант в микроколонку и центрифугировали ее 30 секунд при 13000 об/мин. Далее добавляли 200 мкл раствора для удаления эндотоксинов в колонку и центрифугировали 30 сек при 13000 об/мин, фильтрат удаляли. Добавляли 300 мкл промывочного раствора в колонку и центрифугировали 30 сек при 13000 об/мин, фильтрат удаляли. После этого снова добавляли 300 мкл промывочного раствора и центрифугировали 30 секунд при 13000 об/мин. Далее центрифугировали пустую колонку 60 секунд при 13000 об/мин для полного удаления промывочного раствора.

Колонку помещали в новую пробирку 1,5 мл, наносили в центр мембраны 50 мкл H<sub>2</sub>O MQ и центрифугировали 30 секунд для сбора очищенной ДНК.

### **3.6. Экспрессия и очистка белков.**

Для экспрессии белков, клетки *E. coli* штамма XJb(DE3) Autolysis (Zymo Research) были трансформированы экспрессионными векторами pQE (Evrogen), содержащими кодирующие последовательности соответствующих белков и последовательность, кодирующую 6 остатков гистидина, в той же рамке считывания, на 5'-конце.

Часть колонии, экспрессирующей мутантный белок, переносили в стеклянную пробирку с 10 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали в течение 12-18 часов при 37°C и интенсивном перемешивании. Затем 2 мл суспензии переносили в 200 мл среды LB, содержащей ампициллин (100 мкг/мл), и инкубировали в течение 2-3 часов при 37°C и интенсивном перемешивании до достижения колониями 0,5 единиц оптической плотности.



После этого, в случае использования экспрессионного вектора pBAD, в среду добавляли 350 мкл раствора L-арабинозы (0,2 мг/мл) для индукции синтеза белка и инкубировали суспензию при 37°C и интенсивном перемешивании в течение 20 – 24 часов. Бактериальную культуру осаждали 15 мин при скорости 4500 об/мин на холоду (4°C) в центрифуге Multifuge 3 S-R (Heraeus), осадок ресуспендировали в буфере PBS и лизировали трехкратным циклом замораживания-размораживания. Бактериальную ДНК разрушали ультразвуком с помощью прибора Sonic Dismembrator (Fisher Scientific) в течение 2,5 минут. Лизат центрифугировали в течение 30 минут при 13000 об/мин на холоду (4°C) в центрифуге Eppendorf 5415 R.

Супернатант переносили в колонку с металл-аффинной смолой TALON Metal Affinity Resin (Clontech), уравновешенной буфером PBS. Колонку промывали поочередно следующими растворами:

1. PBS (pH = 7,4)
2. PBS (pH = 7,4) с 0,25 M NaCl
3. PBS (pH = 7,4) с 0,5 M NaCl
4. PBS (pH = 7,4) с 0,01 M имидазола

Элюцию осуществляли 5 мл PBS с 0,125 M ЭДТА. Элюат собирали в пробирки по 1 мл и измеряли концентрацию белка на микроспектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000c (молярный коэффициент экстинкции = 1,8). Выделенный белок хранили при 4°C.

### **3.7. Спектроскопия.**

Флуорогены готовили, растворяя вещество в 96% этиловом спирте, или из концентрированных стоков в DMFA или DMSO, разводя их 96% этиловым спиртом. Концентрацию флуорогенов измеряли с помощью спектрофотометра Varian Cary 100 Bio (молярный коэффициент экстинкции = 50000). Для измерения спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции использовали флуоресцентный спектрофотометр Varian Cary Eclipse.

### **3.8. Определение эффективности переноса энергии *in vitro*.**

Перед определением эффективности переноса энергии концентрацию очищенного белка слияния липокалина с флуоресцентным белком донором измеряли на микроспектрофотометре Thermo Scientific NanoDrop 2000c (молекулярная масса белка около 47 кДа). Определение эффективности переноса энергии проводилось с использованием 14 флуорогенов (M739, 774, mka67, BNS641, ChrA, ChrB, ChrC, GFP, GC01, GC02, GC04, GC05, M1706, M1933). Величину эффективности оценивали по падению интенсивности флуоресценции донора при добавлении флуорогена до конечной концентрации 100 нМ. Спектры эмиссии флуоресценции доноров в пробах измеряли с помощью флуоресцентного спектрофотометра Varian Cary Eclipse.

Для проверки работоспособности сенсоров FRET пару подвергали протеолитическому расщеплению протеиназой К. К пробе, содержащей FRET пару (50-200 нМ) и флуороген (100 нМ), добавляли протеиназу К (2,5 единицы активности) и инкубировали в течение часа при 37°C. После чего измеряли спектр эмиссии донора с помощью флуоресцентного спектрофотометра Varian Cary Eclipse.

Состав буфера:

30 mM Tris-HCl, pH 8.0

### **3.9. Работа с культурами клеток млекопитающих.**

#### **3.9.1. Культуры клеток млекопитающих.**

В экспериментах с конфокальной микроскопией и исследованием фотостабильности липокалинов нового поколения использовали культуру клеток эмбриональной почки человека HEK293NT. В экспериментах по *in cellulo* определению эффективности FRET пар использовали линию HEK293T. В остальных экспериментах со съемкой клеток в условиях локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения, в экспериментах с изучением белок-белковых взаимодействий и биосенсоров использовали культуры клеток

рака шейки матки HeLa Kyoto.

### **3.9.2. Ведение эукариотических культур клеток.**

Все клеточные культуры, использованные в данной работе, выращивали на культуральных матрасах площадью 25 см<sup>2</sup> в 6 мл среды DMEM с 2 mM глутамином и 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (HyClone, Thermo Scientific) и 100 мкг/мл смеси антибиотиков пенициллина и стрептомицина (ПанЭко) в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Пересев производили по достижении клетками плотности 80% от монослоя. Для этого отбирали старую среду и добавляли 1,5 мл раствора трипсин/Версен. Культуральный матрас инкубировали в ламинаре при комнатной температуре до полного открепления клеток, что соответствует примерно 5-10 минутам в случае клеток HeLa Kyoto и 3-5 минутам в случае клеток НЕК. Далее открепившиеся клетки суспендировали пипетированием до гомогенного состояния, некоторую часть отбирали в новый культуральный матрас с 6 мл свежей среды DMEM-full, остальной объем клеток использовали для посадки на чашки со стеклянным дном со свежей средой DMEM-full.

### **3.9.3. Трансфекция эукариотических клеток.**

Культуру клеток растили в среде DMEM-full на 35мм чашках со стеклянным дном Fluorodish (World Precision Instruments) или SPL Confocal Dish (SPL Life Sciences), применяемых для работы на микроскопах с высокоапертурными объективами. По достижении 60-80% плотности от монослоя, среду DMEM-full заменяли на 1 мл среды Opti-MEM без сыворотки.

Трансфекционную смесь замешивали в двух пробирках на 1,5 мл. В одной пробирке смешивали 100 мкл стерильной среды Opti-MEM с 1-2 мкг ДНК. Во второй пробирке 100 мкл стерильной среды Opti-MEM смешивали с трансфекционным агентом FuGene HD (Promega) из расчёта 3 мкл FuGene HD на каждый мкг ДНК. Пробирку с FuGene HD инкубировали при комнатной температуре 5 минут, после чего смешивали с содержимым первой пробирки.

Получившуюся смесь инкубировали 20 мин при комнатной температуре.

По истечении 20 минут содержимое пробирки добавляли к клеткам на чашки, перемешивали, и помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 37°C. Эксперименты с трансфицированными клетками проводили не менее, чем через 24 часа после трансфекции.

В случае с промывочными экспериментами, через 24 часа после трансфекции, клетки с чашек пересаживали в специальные слайды для промывки  $\mu$ -Slide I 0.4 Luer ibiTreat (Ibidi). При этом открепление клеток осуществляли с помощью 0,5 мл трипсин/Версена. К этому объему после открепления клеток добавляли 1,5 мл свежей среды DMEM-full, после чего суспендировали открепленные клетки прямо в чашке. Из получившегося гомогенного раствора с клетками около ~400-500 мкл переносили в  $\mu$ -Slide. После этого клетки в слайде помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор на 37°C. Эксперименты с промывкой проводили через 18-24 часа после пересадки трансфицированных клеток с чашки в слайд.

#### **3.9.4. Подготовка клеточных культур к съемке.**

Перед съемкой клеточных культур, вне зависимости от типа микроскопии, среда DMEM аккуратно удалялась, чтобы не нарушить монослой клеток. Затем к клеткам добавляли 1 мл среды Хенкс (ПанЭко) с 25 mM HEPES (Диаэм). В зависимости от системы мечения в среду добавляли нужное количество необходимого хромофора (M739 для локализационной микроскопии с липокалинами старого и нового поколения или mka67 для FRET экспериментов с липокалином DiB1).

#### **3.9.5. Фиксация клеточных культур.**

Фиксацию клеток проводили через 24 часа после трансфекции. Клетки отмывали с помощью чистого PBS и инкубировали при комнатной температуре в растворе PBS с 4% параформальдегида (ПФА) в течение 10 мин. Затем клетки несколько раз отмывали чистым PBS и пермеабелизовали с использованием

раствора PBS с 0,3% tween-40 (Theodor Shichardt, GMBH & Co) в течение 1 минуты, затем снова отмывали в чистом PBS. Съемку фиксированных клеток осуществляли в среде HHBS.

### **3.10. Методы микроскопии.**

#### **3.10.1. Широкопольная флуоресцентная микроскопия.**

Все эксперименты, связанные с измерением эффективности FRET по интенсивности в живых клетках, а также эксперименты с биосенсорами FRET на основе модулируемого акцептора липокалина были проведены с использованием инвертированного микроскопа Leica DMI6000B. В экспериментах использовались объективы HC PL Apo 100x NA 1,40 для масляной иммерсии и HC PL Apo 40x NA 0,85 (Leica Microsystems). Микроскоп оборудован камерой Zyla 5.5 sCMOS (Andor). В качестве источника света использовали CoolLED pE-300<sup>white</sup> (CoolLED Ltd), который обеспечивает почти полное покрытие видимого спектра. Для съемки разных каналов использовали фильтры GFP (фильтр на возбуждение 470 нм с шириной 40 нм и на эмиссию 525 нм с шириной 50 нм, Leica Microsystems) и фильтр mCherry-T/ET (фильтр на возбуждение 578 нм с шириной 21 нм и на эмиссию 641 нм с шириной 75 нм, Semrock).

#### **3.10.2. Конфокальная микроскопия.**

Для визуализации трансфицированных клеточных культур, а также для измерения фотостабильности использовали лазерный сканирующий конфокальный микроскоп TSC SP2 (Leica Microsystem) на базе инвертированного флуоресцентного микроскопа Leica DM IRE, оснащенного иммерсионным объективом HCX PL APO Lbd.BL 63x1.40 oil, аргоновым (488 нм) и гелий-неоновым (543 нм) лазерами. Флуоресценцию красного флуоресцентного белка mKate2 и красных комплексов липокалина с хромофором регистрировали при длине волны возбуждения 580 нм и эмиссии 620-660 нм. Флуоресценцию зеленого флуоресцентного белка EGFP и зеленых

комплексов липокалина с хромофорами регистрировали при длине волны возбуждения 488 нм и эмиссии 495-540 нм.

### **3.10.3. Локализационная микроскопия сверхвысокого разрешения.**

Локализационная микроскопия сверхвысокого разрешения проводилась с помощью микроскопа Nanoimager S (Oxford Nanoimaging) под управлением программного обеспечения NimOS (версии 1.6). Микроскоп оборудован одним апохроматическим объективом для масляной иммерсии Olympus UPlanSApo N 100x, 1,4 NA и системой аналогичной perfect focus system для поддержания заданного фокуса. В качестве детектора используется камера sCMOS Orca flash 4 V3.

Лазерный блок несет 4 лазера: 405 нм, 488 нм, 561 нм и 640 нм. Все лазеры имеют мощность  $\sim 1$  Вт, мощность облучения в плоскости объектива достигает  $\sim 6,5$  кВт\*см<sup>-2</sup>. Также возможно изменение угла облучения для достижения режима HILO. При таком облучении глубина резкости составляет всего около 10 мкм, а соотношение сигнал-шум почти такое же как в условиях TIRF микроскопии. Также имеется возможность структурировать облучение за счет микрозеркального устройства.

Съемка происходит одновременно в двух каналах за счет того, что в оптическом пути стоит делитель пучка на 561 нм. В результате два пучка отправляются на левую и правую половины матрицы. Площадь поля зрения составляет 50x80 мкм. Скорость съемки без уменьшения поля зрения может достигать 100 Гц.

Nanoimager S использовался для сравнения липокалинов в условиях локализационной микроскопии. Стандартные съемки проходили в следующих условиях: 10-20 тысяч кадров, 30-60 Гц. Длительную съемку липокалина DiB3/F53L с хромофором M739 проводили при 30 и 60 Гц, 30000 кадров, мощность 561 нм лазера 1,4 кВт\*см<sup>-2</sup>. Двухцветную съемку проводили при следующих условиях: 10000 кадров с частотой 30 Гц с циклом по 100 кадров 488 нм лазера мощностью 1,8 кВт\*см<sup>-2</sup> и 100 кадров с 561 нм лазера мощностью

1,8 кВт\*см<sup>-2</sup>.

Локализации по ходу съемки обрабатывались с помощью программы NimOS 1.6.1.9898 (ONI, UK). Сверхразрешенные реконструкции были получены с использованием стандартных значений фильтров, включающих в себя количество фотонов на локализацию, точность определения локализации и показателя сигма в NimOS. Анализ данных, полученных с помощью программа NimOS проводили с помощью скриптов, написанных на языке Python.

### **3.11. Попеременное добавление и отмывка хромофора.**

Для проведения экспериментов с поочередным добавлением и отмывкой хромофора была построена самодельная установка. Для этого использовали микрокомпьютер Raspberry Pi 3, драйверы для шаговых двигателей L6470 (SparkFun Electronics), Понижающий DC-DC преобразователь напряжения XL4015, шаговые двигатели D8-HD4005 (BaQuian Technology), блок питания LRC-12V400W (Light RESURS), а также винты, муфты для их крепления и напечатанные на 3D принтере держатели для шприцов. Управление скоростью подачи жидкости осуществлялось с помощью специальных скриптов на языке Python. Собранная установка позволяла добавлять три разных раствора одновременно или по очереди. Также был установлен перистальтический насос, который осуществлял откачку жидкости. Клетки для экспериментов с отмывкой сажали в специальные слайды  $\mu$ -Slide I 0.4 Luer ibiTreat (Ibidi). Скорость потока во всех экспериментах составляла около  $\sim 120$  мкл/мин, что означает полную смену объема жидкости в слайде за одну минуту.

### **3.12. Детекция эффективности FRET *in cellulo*.**

#### **3.12.1. По падению интенсивности флуоресценции донора.**

Для микроскопии и оценки эффективности передачи энергии в живых клетках использовался флуоресцентный микроскоп Leica DMI6000B. В экспериментах использовались объективы HC PL Apo 100x NA 1,40 для масляной иммерсии и HC PL Apo 40x NA 0,85 (Leica Microsystems). Микроскоп

оборудован камерой Zyla 5.5 sCMOS (Andor). В качестве источника света использовали CoolLED pE-300white (CoolLED Ltd). Производилась съемка трансфицированных клеток в канале донорного флуоресцентного белка до и после добавления флуорогена до конечной концентрации 3 мкМ. Эффективность резонансного переноса энергии получали путем деления кадра после добавления хромофора на кадр до добавления хромофора. Полученные значения каждого пикселя вычитали из единицы. В большинстве случаев, предварительно производили программную бинаризацию пикселей 2x2 или 4x4, чтобы свести к минимуму неточность измерения FRET за счет сдвига клеток за время съемки кадров до и после добавления хромофора.

### **3.12.2. По уменьшению времени жизни флуоресценции донора.**

Кинетику затухания флуоресценции в *in vitro* условиях с пикосекундным временным разрешением измеряли в лаборатории физико-химии биологических мембран биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (Максимов Е.Г.) с помощью коррелированной по времени и длине волны установки счета одиночных фотонов на основе детектора HMP-100-07C и модуля SPC-150 (Becker&Hickl, Германия). Фемтосекундный лазер (ТЕМА-150, Авеста, Россия) с частотой повторения 80 МГц, подающий на образец импульсы длительностью 150 фс на длине волны 525 нм (2-я гармоника). Затухание флуоресценции аппроксимировали суммой двух экспоненциальных функций затухания с SPCImage (Becker&Hickl, Германия) с учетом компонентов неполного распада с большим временем жизни.

Микроскопию времени жизни флуоресценции проводили в лаборатории физической биохимии ФИЦ Биотехнологии РАН (Савицкий А.П.). Оборудование для определения времени жизни флуоресценции DCS-120 с детектором HMP-100-40 (Becker&Hickl, Германия) было установлено на инвертированный микроскоп Nikon Te2000, снабженный объективом x100 с масляной иммерсией. Для возбуждения флуоресценции использовали импульсный лазер с перестраиваемой длиной волны Fianium WhiteLase SC4X0

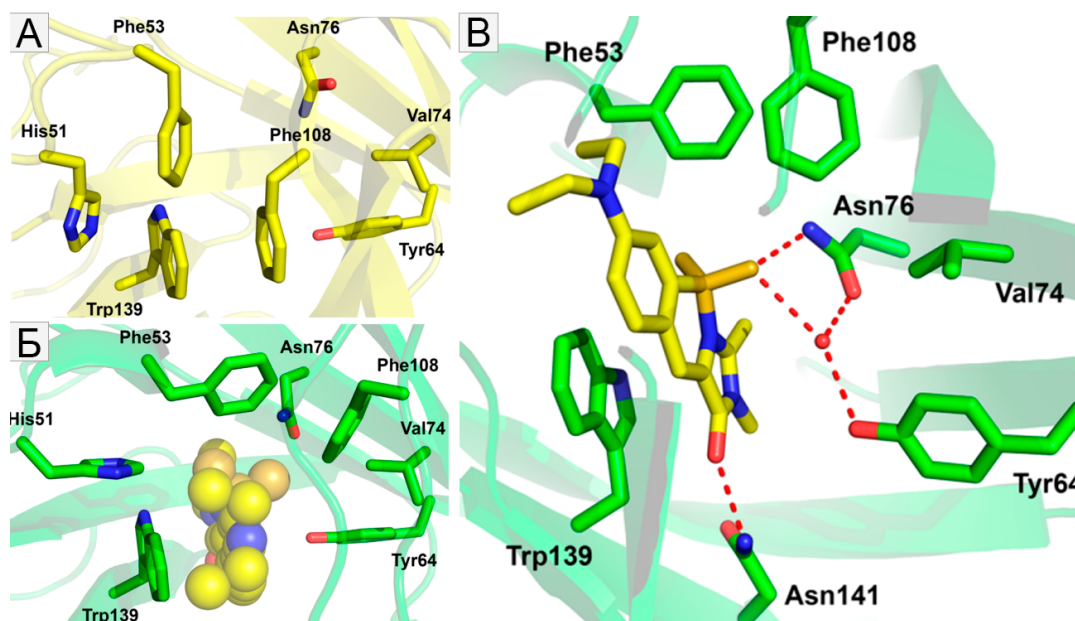


60 МГц, длина волны была выбрана 480 нм. Производили сканирование трансфицированных клеток до и после добавления флуорогена (конечная концентрация 3 мкМ).

## 4. Результаты и их обсуждение.

### 4.1. Рациональный дизайн улучшенных мутантов липокалина и их применение в микроскопии и 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 15) [182]. Благодаря полученным данным удалось понять какие аминокислоты нужно заменить, чтобы оптимизировать связывание хромофора и улучшить фотофизические свойства комплекса.



**Рисунок 15.** Детали связывания хромофора M739 с липокалином DiB1. Изменения конформации His51, Phe53, и Phe108 в отсутствии и присутствии хромофора: свободный липокалин B1c (1QWD, (A) и комплекс DiB1:M739 (Б). (B) Сайт связывания хромофора M739 с DiB1: стэкинговые 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 связывания с липокалинами DiB1-3. Адаптировано из [182].

В кристаллической структуре комплекса липокалин:хромофор лиганд-связывающий карман образован тремя петлями (остатки 49–55, 107–113 и 132–137) и представляет собой овальное углубление размером  $8 \text{ \AA} \times 11 \text{ \AA}$ , продолжающееся в продолговатую полость глубиной  $\sim 19 \text{ \AA}$ . Ближайшее окружение хромофора на дистанции до  $4 \text{ \AA}$  включает 9 гидрофобных (Phe53, Val106, Phe108, Gly114, Tyr116, Val130, Pro133, Tyr137 и Trp139) и 4 гидрофильных (Glu45, Glu54, Asn76 и Asn141) аминокислотных остатка. Лиганд-связывающий карман DiB1 специфически связывает копланарный трициклический хромофор M739 образуя яркий флуоресцентный комплекс.

Связывание хромофора M739 сопровождается значительным конформационным изменением петли 107-113, вызывающим ее поворот почти на  $90^\circ$  и сдвиг остова полипептидной цепи до  $5,9 \text{ \AA}$ , если сравнивать с кристаллической структурой липокалина B1c дикого типа (PDB ID: 1QWD). Интересно, что сходные конформационные изменения сопровождают связывание билин-связывающего липокалина моли и его сконструированные мутантные формы, DigA16 и FluA, связывающие биливердин IX $\gamma$ , дигоксигенин и флуоресцеин соответственно [183]. Сравнение структур комплекса DiB1 с хромофором и апо-формы липокалина дикого типа показывает, что в свободном белке входная часть лиганд-связывающего кармана прикрыта боковыми остатками His51, Phe53 и Phe108, которые смещаются и поворачиваются при связывании с хромофором (Рисунок 15, АБ). Остальная структура липокалина (остатки 28–106 и 114–177) остается неизменной. Гидрофильное пятичленное кольцо хромофора M739 ориентировано к гидрофильному дну кармана, в то время как гидрофобный шестичленный цикл хромофора на его обратной стороне находится рядом с гидрофобным входом в карман. Позиция связанного хромофора M739 стабилизируется несколькими взаимодействиями (Рисунок 15, В):

- Водородной связью между карбонильным остатком хромофора и Asn141.
- Водородной связью между  $\text{BF}_2$  и Asn76.

- Водородной связью опосредованной водой между  $\text{VF}_2$  and Trp64.
- Стекинг-взаимодействием  $\pi$ -системы пятичленного и центрального шестичленного колец хромофора с аналогичными кольцами аминокислотного остатка Trp139.

Теперь для того, чтобы решить какие мутации нужно вводить в белок для направленного изменения фотофизических свойств, необходимо было произвести сравнение существующих мутантов липокалина DiB2 и DiB3 с DiB1 используя полученные знания о связывании хромофора в кристалле DiB1.

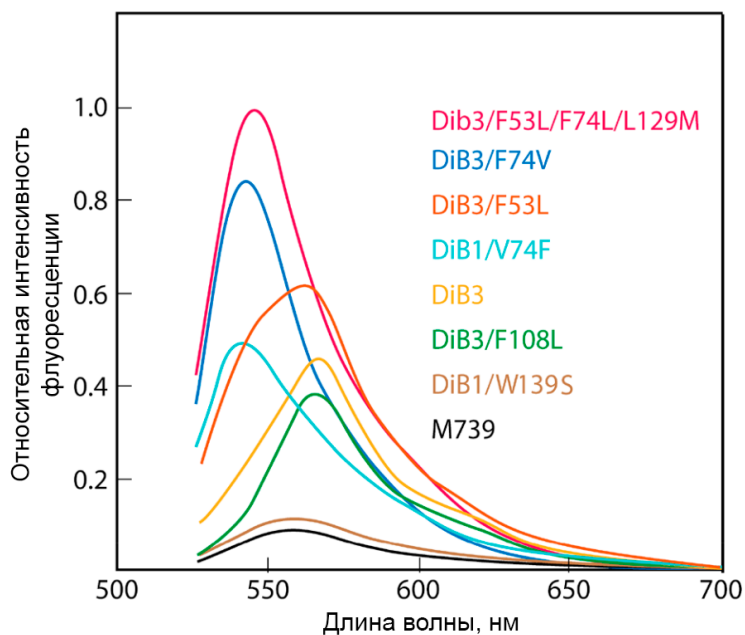
DiB1 и DiB2 имеют схожие спектральные характеристики, что говорит об одинаковой модели связывания хромофора в лиганд-связывающем кармане (Таблица 2). Однако, в липокалине DiB2 отсутствует одна из водородных связей, координирующих хромофор в составе комплекса – между Asn141 и карбонилем M739, поскольку в липокалине DiB2 в положении 141 находится лейцин. Вероятно, это и является главной причиной снижения аффинности (40-кратное увеличение константы диссоциации) и играет ключевую роль в увеличении фотостабильности комплекса DiB2:M739 [157]. Остальные специфические взаимодействия хромофора M739 в кармане остаются при этом неизменными и для DiB1, и для DiB2.

Главное отличие DiB3, обладающего батохромным, по сравнению с DiB1, сдвигом максимума эмиссии комплекса с хромофором M739 состоит в заменах на аминокислоты Phe в положении 74 и Gln в положении 141. Моделирование этих мутаций Val74Phe и Asn141Gln в структуре комплекса DiB1:M739 показывает, что обе замены влияют на стабилизацию хромофора в кармане. В отличие от Val74 в DiB1, Phe в этой позиции будет стерически конфликтовать с Phe108 (Рисунок 15, Б). Заметим, что в апо-B1c боковые цепи Phe108 и Phe53 занимают место хромофора в комплексе, и связывание M739 приводит к смещению обоих остатков и значительной конформационной перестройке всей петли 107–113. В случае липокалина DiB3, стерический конфликт Phe108 и Phe74 приводит к неоптимальной конформации петли 107–113, что ухудшает

связывание хромофора и отражается как в уменьшении квантового выхода флуоресценции, так и на смещении пика эмиссии к 565 нм. С другой стороны, Gln141 сохраняет водородную связь с карбонилем M739 аналогично Asn141 в DiB1, но более длинная боковая цепь может взаимодействовать с менее стабильно связанным флуорогеном M739.

Установление ключевых остатков, влияющих на связывание хромофора позволило приступить к следующей задаче – получению новых мутантов с улучшенными фотофизическими свойствами. Для этого из вышеперечисленных позиций, были выбраны: позиции 53, 74 на входе в карман и позиции 108, 129, 139, несущие гидрофобный лейцин и ароматические аминокислоты, ответственные на стекинговые взаимодействия с хромофором и изменение конформации белка.

Таким образом, на основе анализа кристаллических данных липокалина DiB1 в комплексе с хромофором M739 был предложен и 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 их спектральные свойства и измерена константа диссоциации комплексов с хромофором M739 (Таблица 2, Рисунок 16).



**Рисунок 16.** Спектры эмиссии комплексов вариантов липокалина с хромофором M739. Концентрация M739 везде одинаковая, спектры нормированы на спектр эмиссии комплекса хромофора с липокалином DiB3/F53L/F74L/L129M. Адаптировано из [182].

Тройной мутант DiB3/F53L/F74V/L129M показал самый большой квантовый выход флуоресценции (51%) с хромофором M739 среди всех липокалинов. 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 (507 нм, Таблица 2). Было сделано предположение, что эти два мутанта могут быть использованы для двухцветного мечения в условиях локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения при использовании лазеров 488 и 561 нм и детекции в двух каналах до 561 нм и после 561 нм.

**Таблица 2.** Фотофизические свойства комплексов липокалинов с хромофором M739.

Мутант липокалина	$\lambda_{\text{возб}}$ нм	$\lambda_{\text{эм}}$ нм	$K_d$ , $\mu\text{M}$	$\epsilon$ , $\text{M}^{-1}$ $\text{cm}^{-1}$	$\text{QY}^b$ , %	Ссылка
DiB1	513	542	0.1	45800	32	[176]
DiB2	510	539	4	51000	32	[176]
DiB3	546	565	9	45600	16	[176]
DiB1/V74F	514	542	0.4	51400	26	[182]
DiB1/W139S	520	560	н/д	н/д	н/д	[182]
DiB3/F53L	546	562	1.45	52000	26	[182]
DiB3/F74V	507	542	2.8	47600	26	[182]
DiB3/F108L	518	566	8	51000	9	[182]
DiB3/F53L/F74L/L129M	509	546	1.2	65700	51	[182]
Своб. M739	520	563	н/д	53500	3.5	[176]

<sup>b</sup> – квантовый выход флуоресценции измерен в условиях, при которых как минимум 90% хромофора **M739** связано с липокалином, согласно расчету на основании  $K_d$ .

Мутант по 139 положению, в котором триптофан, ответственный за стекинг-взаимодействие с хромофором, был заменен на серин, почти полностью потерял свойство активировать флуоресценцию хромофора M739. DiB1/W139S также не показал какого-либо прироста интенсивности флуоресценции при добавлении хромофора M739 относительно свободного хромофора (рисунок 16), что указывает на значимость триптофана в положении 139 в обеих моделях связывания - глубокой (как в DiB1 и DiB2) и менее стабильной, периферической (как в DiB3). Липокалин DiB1/V74F практически не отличался по свойствам от DiB1, а мутант DiB3/F108L в комплексе с M739 имеет квантовый выход флуоресценции ниже, чем у DiB3.

Поэтому, на основании константы диссоциации комплексов и их

спектральных свойств, для дальнейшей работы были отобраны три липокалина: DiB3/F53L, DiB3/F74V и DiB3/F53L/F74L/L129M.

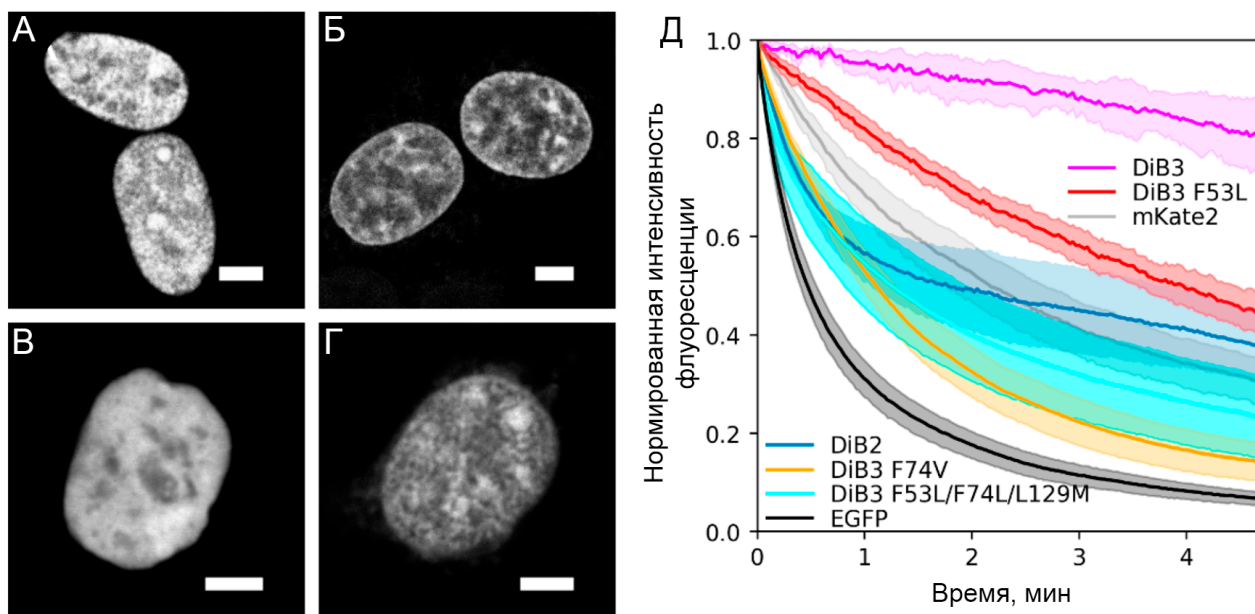
Далее для проверки применимости новых мутантов липокалина во флуоресцентной микроскопии было необходимо провести мечение целевых белков.

Для этого были созданы генно-инженерные конструкции кодирующие белки слияния гистона H2B со всеми интересующими липокалинами и спектрально близкими флуоресцентными белками для контроля, а именно: DiB2, DiB3, DiB3/F74V, DiB3/F53L, DiB3/F53L/F74V/L129M, EGFP и mKate2. Помимо флуоресцентной микроскопии гистона также было проведено сравнение фотостабильности в условиях конфокальной микроскопии. За счет изменения констант диссоциации у новых мутантов (в сторону увеличения аффинности, Таблица 2) мы ожидаем уменьшения фотостабильности комплексов. Из-за спектральных отличий между комплексами липокалинов, сравнение фотостабильности проводили в двух группах: (1) “зеленые” комплексы липокалинов DiB2, DiB3/F74V, DiB3/F53L/F74V/L129M и зеленый флуоресцентный белок EGFP, и (2) “красные” комплексы липокалинов DiB3, DiB3/F53L и красный флуоресцентный белок mKate2.

Были проведены временные трансфекции клеток HEK293NT, и проведена съемка клеток в условиях конфокальной микроскопии через 20 ч после трансфекции (Рисунок 17, А-Г). Мечение гистонов показало, что новые мутанты липокалина применимы для микроскопии внутриклеточных структур.

Далее, был проведен эксперимент по фотообесцвечиванию и сравнению фотостабильности в условиях конфокальной микроскопии (Рисунок 17, Д).





**Рисунок 17.** Конфокальная микроскопия и сравнение фотостабильности комплексов липокалина и флуоресцентных белков. Клетки HEK293NT временно трансфицированы конструкциями, кодирующими белки слияния гистона H2B с (А) mKate2, (Б) DiB3/F53L, (В) EGFP, and (Г) DiB3/F74V в присутствии 5 мкМ хромофора М739. Масштабные линейки 10 мкм. (Д) Сравнение кривых фотообесцвечивания комплексов липокалинов (в присутствии 5 мкМ хромофора М739) и спектрально близких флуоресцентных белков mKate2 и EGFP. Яркими линиями показано среднее значение, полупрозрачные области отражают стандартное отклонение (n=11 для каждой кривой). Адаптировано из [182].

В результате “зеленые” комплексы липокалинов DiB3/F74V и DiB3/F53L/F74V/L129M показали меньшую стабильность флуоресценции при непрерывном облучении, чем спектрально близкий комплекс с DiB2. Такая же картина наблюдалась и с новым “красным” комплексом DiB3/F53L относительно старого DiB3. Однако, все комплексы липокалинов нового поколения показали лучшую фотостабильность, чем спектрально близкие флуоресцентные белки.

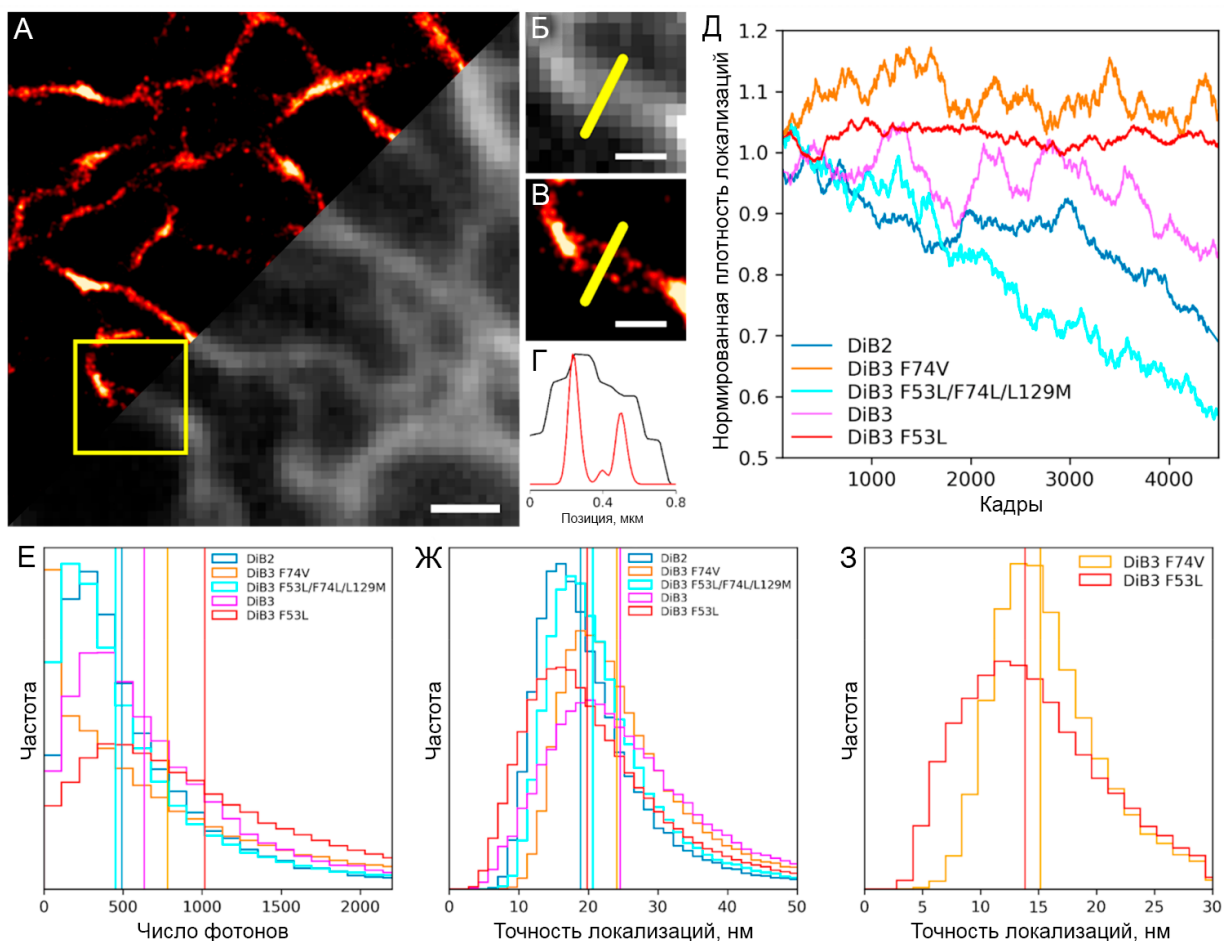
Как видно (Рисунок 17, Д), комплексы хромофора М739 с липокалинами нового поколения немного уступают в фотостабильности комплексам с

липокалинами первого поколения в условиях конфокальной микроскопии. Это можно связать с тем, что протестированные в настоящей работе мутанты имеют меньшие константы диссоциации относительно своих спектральных аналогов из старого поколения (Таблица 2).

На следующем этапе, для оценки эффективности метки в наноскопии необходимо определить возможность получения субдифракционных изображений в живых клетках, а также измерить параметры молекулярной яркости, точности локализаций и стабильности мечения.

Для сравнения липокалинов нового и старого поколений в условиях локализационной микроскопии были созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие белки слияния виментина с интересующими мутантами липокалина, а именно: DiB2, DiB3, DiB3/F74V, DiB3/F53L, DiB3/F53L/F74V/L129M. Съёмка виментина проводилась как в живых, так и в фиксированных клетках. Для съёмки виментина, меченого липокалинами DiB2, DiB3/F74V и DiB3/F53L/F74V/L129M использовали 488 нм лазер, а для съёмки липокалинов DiD3 и DiB3/F53L использовали 561 нм лазер. Новые мутанты “зеленого” спектра сравнивали с DiB2, а не с DiB1 по той причине, что ранее [157] в нашей лаборатории было показано преимущество DiB2 в условиях локализационной микроскопии, что вероятно связано с быстрым обменом флуорофора из-за большей (4 мкМ) константы диссоциации комплекса хромофора по сравнению с DiB1 (0.1 мкМ).

Были поставлены временные трансфекции в клетках HeLa Kyoto и проведена съёмка живых и фиксированных клеток (для измерения точности локализаций) в условиях локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения (Рисунок 18). Для всех тестируемых липокалинов снимали одинаковое количество кадров (5000) с одинаковой выдержкой, равной 33 мс.



**Рисунок 18.** Локализационная микроскопия сверхвысокого разрешения с липокалинами нового и старого поколения. (А-Д) Микроскопия живых клеток HeLa Kyoto 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 взяты 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  $1,1 \text{ кВт} \cdot \text{см}^{-2}$  при съемке виментина, меченого DiB2, DiB3/F74V, и DiB3/F53L/F74L/L129M и 561 нм лазером мощностью  $1,4 \text{ кВт} \cdot \text{см}^{-2}$  в случае виментина меченого DiB3 и DiB3/F53L). (Е)

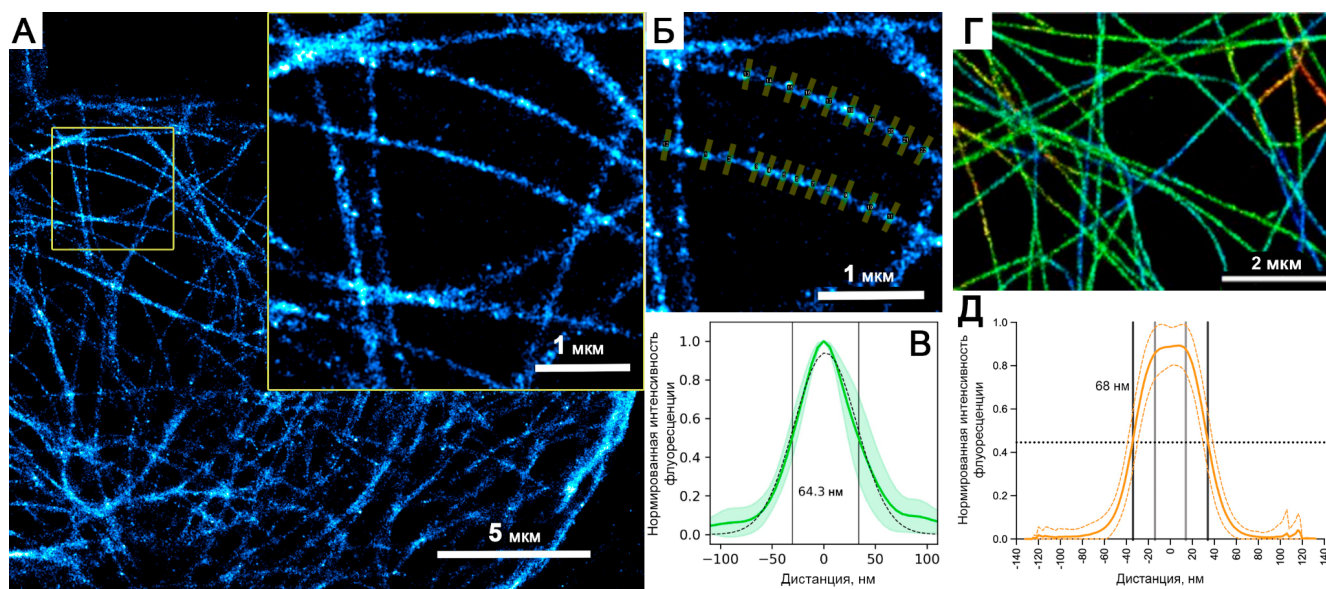
Гистограмма детектированных фотонов на каждую локализацию; вертикальные линии обозначают медианные значения фотонов. (Ж) Гистограмма точности определения локализаций в живых клетках; вертикальные линии обозначают медианные значения точности определения локализаций. (З) Гистограмма точности определения локализаций в фиксированных клетках; вертикальные линии обозначают медианные значения точности определения локализаций. Адаптировано из [182].

Были получены субдифракционные изображения виментина (Рисунок 18, А), демонстрирующие четкое разделение волокон виментина расположенных на расстоянии 300 нм и ближе, по сравнению с дифракционно-лимитированным изображением, в котором те же участки изображения выглядят как одно волокно (Рисунок 18, БВГ). Стабильность мечения в условиях локализационной микроскопии сравнивалась по стабильности плотности локализаций (изменение числа вспышек единичных флуорофоров на кадр) на протяжении съемки (Рисунок 18, Д). Видно, что новые мутанты DiB3/F74V и DiB3/F53L показывают лучшую стабильность мечения относительно тройного мутанта DiB3/F53L/F74L/L129M и липокалинов старого поколения DiB2 и DiB3. Вместе с тем, эти два мутанта обладают заметно большей яркостью на уровне одиночных молекул (Рисунок 18, Е). По точности определения локализаций в живых клетках липокалин DiB3/F53L находится на том же уровне что и спектрально близкий липокалин DiB3, “зеленые” также практически не отличаются друг от друга по этому показателю (Рисунок 18, Ж). Отдельно заслуживает внимание точность определения локализаций комплексов с липокалинами нового поколения в фиксированных клетках. Она составляет там менее 15 нм, что является очень хорошим показателем (Рисунок 18, З). Большая точность определения локализаций в фиксированных клетках объясняется тем, что при фиксации и отмывке мембран исключается движение внутриклеточных структур, а также отсутствует фоновая флуоресценция хромофора, связанного в мембранах. Благодаря этому соотношение сигнал-шум в фиксированных

клетках получается выше, что ведет к увеличению точности определения локализаций.

В условиях локализационной микроскопии живых клеток на микроскопе Nanoimager S в зеленом канале детекции (менее 561 нм), при возбуждении лазером 488 нм наблюдается фоновая флуоресценция от хромофора связанного в мембране. Поэтому оптимальной меткой с наилучшими параметрами стабильности плотности мечения и чистоты картинки является липокалин DiB3/F53L, в наибольшей степени отличающаяся по спектру флуоресценции от хромофора.

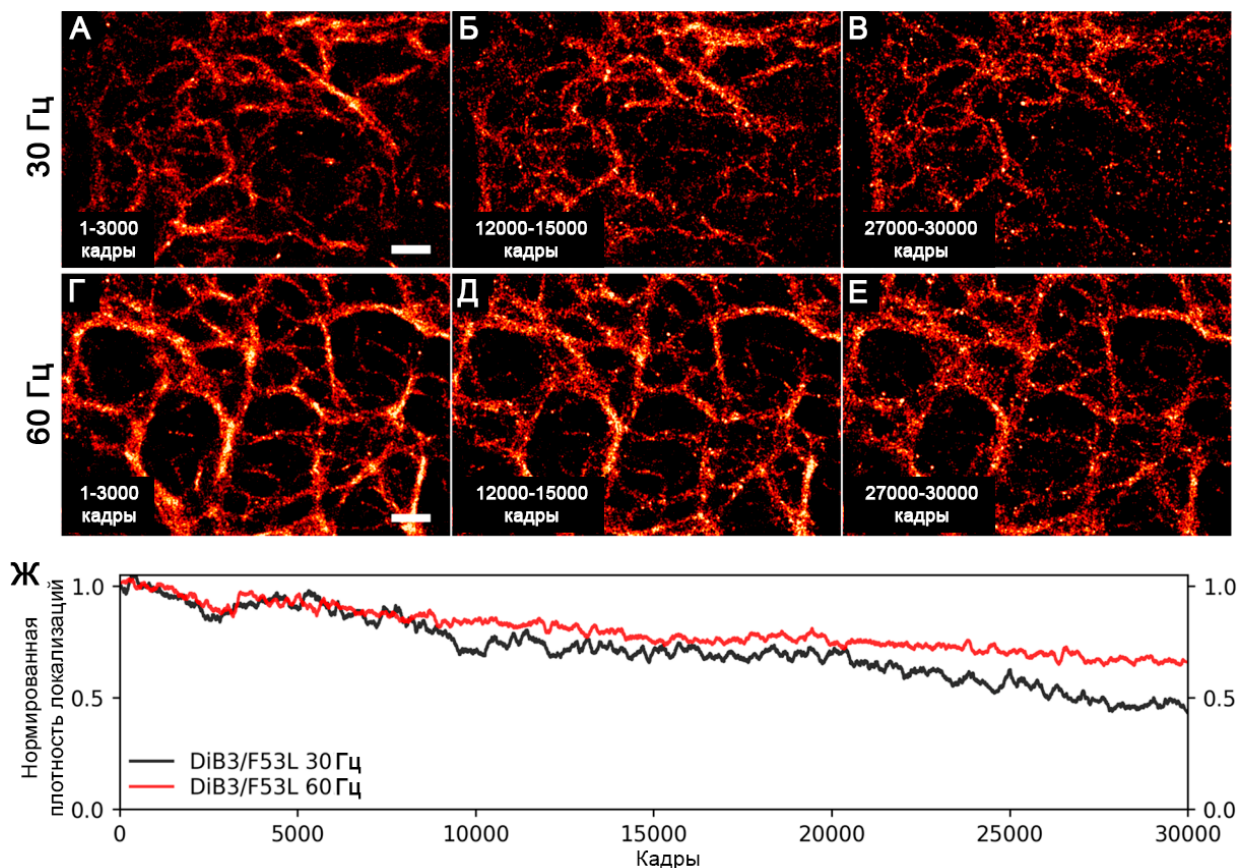
По сравнению с виментином (промежуточные филаменты), микротрубочки тоньше и представляют собой более сложную структуру для визуализации. С помощью системы мечения на основе липокалина DiB3/F53L и хромофора M739 в условиях локализационной микроскопии было проведено мечение и съемка микротрубочек с помощью мечения ассоциированного с тубулином белка энксонина (Рисунок 19, А-В). Полуширина наиболее тонких волокон составила ~64,3 нм. Для сравнения приведена реконструкция микротрубочек, меченных антителами в фиксированных клетках близкая к пределу качества [184], которое можно получить в условиях стандартной локализационной микроскопии на данный момент (Рисунок 19, ГД), 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.



**Рисунок 19.** Локализационная микроскопия живых клеток HeLa Kyoto с мечеными микротрубочками (А). Клетки были временно трансфицированы конструкцией, кодирующей белок слияния энсконсина 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 [184]. (Д) Профиль интенсивности, аналогичный профилю (В).

Стабильность плотности локализаций в комбинации с улучшенным соотношением сигнал/шум делает пару хромофора M739 с липокалином DiB3/F53L оптимальной меткой для длительных съемок для разрешения внутриклеточных структур не только в пространстве, но и во времени.

Для длительной съемки была выбрана генно-инженерная конструкция, кодирующая белок слияния виментина с липокалином DiB3/F53L. Была поставлена временная трансфекция клеток HeLa Kyoto. Для разрешения структур во времени было снято 30000 кадров при двух разных частотах съемки кадров 30 и 60 Гц (Рисунок 20).



**Рисунок 20.** Длительная съемка виментина в живых клетках HeLa Kyoto при разной выдержке в присутствии 15 нМ хромофора M739. Клетка временно трансфицированы 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  $1,4 \text{ кВт} \cdot \text{см}^{-2}$ . 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  $1,4 \text{ кВт} \cdot \text{см}^{-2}$ . (Ж) Стабильность количества локализаций на протяжении длительных съемок меченого виментина в живых клетках. Адаптировано из [182].

Для получения разрешения во времени снятые внутриклеточные структуры реконструировали по каждому 3000 кадров, что занимает 50 секунд при частоте 60 Гц и 100 секунд при частоте 30 Гц. Таким образом в обоих случаях было реконструировано в общей сложности 10 сверхразрешенных кадров. Соответственно, время съемки клеток составило  $\sim 16,7$  и  $\sim 8,35$  минут в случае с частотой съемки 30 и 60 Гц соответственно. При мощности облучения  $\sim 1,4$  кВт\*см<sup>-2</sup> плотность локализаций упала всего в 2 раза в случае со съемкой длительностью  $\sim 16$  минут (Рисунок 20, Ж). Это очень хороший показатель стабильности плотности локализаций при долгом непрерывном облучении лазером такой мощности. Например, аналогичная система мечения FAST в условиях локализационной микроскопии имеет очень низкую плотность мечения, количество локализаций после начала съемки моментально устремляется к нулю [155]. Из-за этого накопление локализаций с системой FAST является очень долгим. В случае с липокалином DiB3/F53L видно, что даже в конце серии накопленных локализаций хватает, чтобы реконструировать сверхразрешенное изображение (Рисунок 20, BE).

Проводя сравнения с лучшими имеющимися аналогичными подходами к динамической локализационной микроскопии, можно сказать, что DiB3/F53L обеспечивает самую длительную съемку в живых клетках при щадящих условиях облучения. Так, например, с помощью подхода описанного в статье Fang Huang et al. [42] удавалось получать до 32 реконструированных сверхразрешенных изображений в секунду. В этом подходе использован фотоактивируемый флуоресцентный белок mEOS3.2 в сочетании с очень высокой мощности облучения возбуждающим (съемка) синим и активирующим (фотоконверсия) ультрафиолетовым светом ( $7-18$  кВт\*см<sup>-2</sup> и  $0.3-1.8$  кВт\*см<sup>-2</sup> соответственно). В таких условиях mEOS3.2 быстро необратимо фотообесцвечивается, а также оказывается деструктивное влияние такой дозой света на живую клетку. В то же время для съемки DiB3/F53L достаточно  $1.4$  кВт\*см<sup>-2</sup> зеленого света, что оказывает намного меньшее воздействие на живые



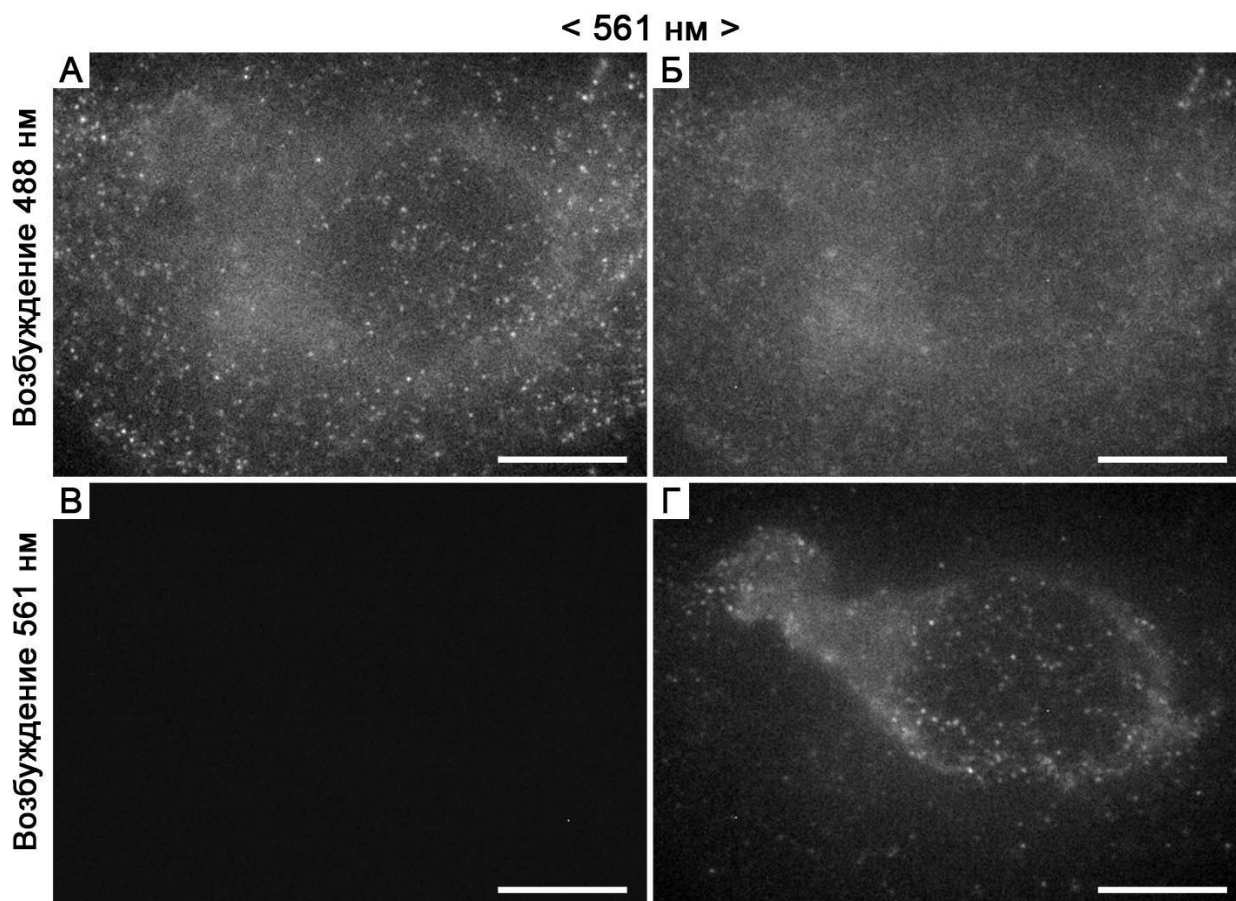
клетки и позволяет снимать их на протяжении многих минут.

Таким образом система мечения на основе липокалина DiB3/F53L и хромофора M739 хорошо подходит не только для получения высокого пространственного разрешения, но и добавляет к этому возможность временного разрешения на протяжении более чем 15 минут.

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

Липокалины нового поколения DiB3/F53L и DiB3/F74V в комплексе с хромофором M739 имеют между собой значительную разницу в пиках возбуждения и эмиссии (~40 нм между пиками возбуждения и ~20 нм между пиками эмиссии флуоресценции, Таблица 2). Было сделано предположение о том, что такая спектральная разница позволит детектировать эти липокалины в разных каналах и эффективно разделять локализации двух разных липокалинов. Действительно, оптическая схема микроскопа Nanoimager S содержит дихроическое зеркало 561 нм непосредственно перед матрицей, что обеспечивает одновременную детекцию сигналов меньше и больше 561 нм на двух частях матрицы без переключения фильтров. Таким образом, было решено проверить применимость мутантов DiB3/F53L и DiB3/F74V для получения двухцветных субдифракционных изображений в живых клетках.

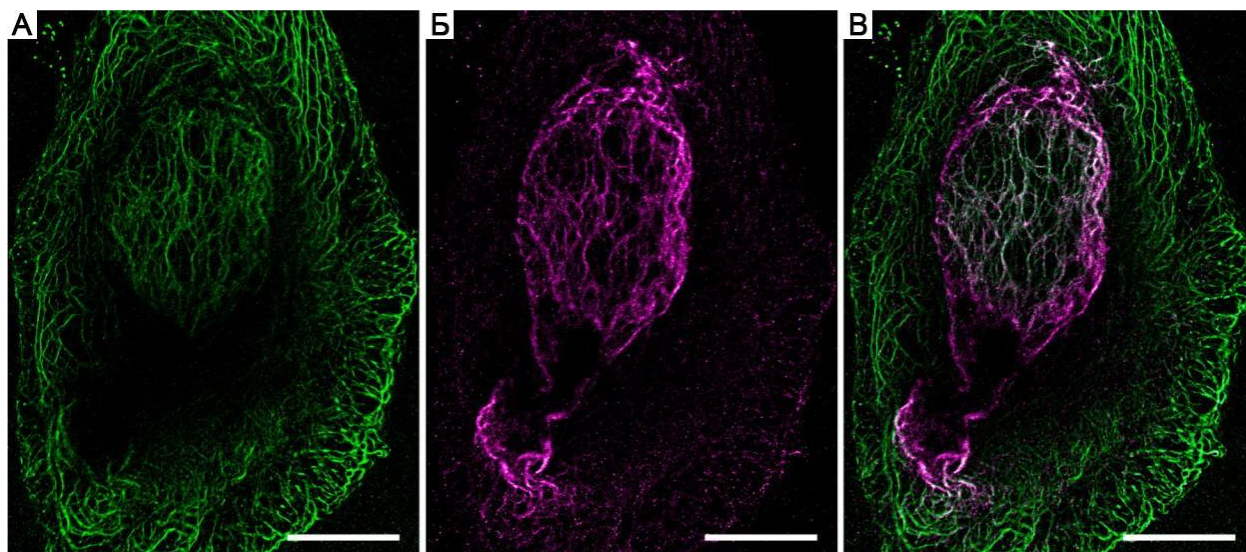
Для этого были созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие белки слияния виментина с липокалином DiB3/F53L и кератина с липокалином DiB3/F74V. Клетки HeLa Kyoto были временно котрансфицированы двумя этими конструкциями. Съемка двух внутриклеточных структур велась в режиме попеременного переключения 488 нм и 561 нм лазеров, по 100 кадров, в сумме 10000 кадров. Для реконструкции кератина, меченого DiB3/F74V использовали зеленый канал при возбуждении 488 нм лазером (детекция до 561 нм, Рисунок 21, АБ). Для реконструкции виментина, меченого DiB3/F53L использовали красный канал при возбуждении 561 нм лазером (детекция после 561 нм, Рисунок 21, ВГ).



**Рисунок 21.** Индивидуальные кадры локализационной микроскопии. Съемка живых клеток HeLa Kyoto, временно трансфицированных конструкциями, кодирующими белки слияния виментина с липокалином DiB3/F53L и цитокератина с липокалином DiB3/F74V в присутствии 15 нМ хромофора M739. Индивидуальные кадры при возбуждении лазером 488 нм (А и Б) и лазером 561 нм (В и Г). Эмиссия разделена делителем пучка (дихроическим зеркалом) на 561 нм и детектирована одновременно в двух областях матрицы. Панели А и С показывают детекцию эмиссии с длинами волн  $< 561$  нм, а панели В и Д с длинами волн  $> 561$  нм. Масштабные линейки 10 мкм [182].

Видно, что флуоресценция липокалина DiB3/F74V частично детектируется и в канале детекции  $> 561$  нм, однако, данный канал в реконструкции не использовался так как DiB3/F53L детектируется при возбуждении лазером 561 нм. Липокалин DiB3/F53L не давал сигнал в зеленом канале и наблюдался только в красном канале детекции. В результате удалось получить

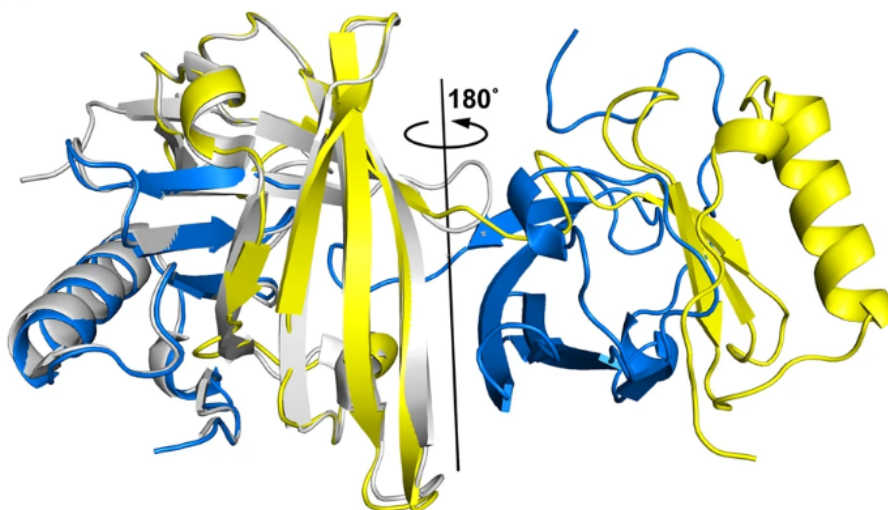
субдифракционное изображение живой клетки с меченым виментином и кератином (Рисунок 22, АБВ). Таким образом, спектральные отличия флуоресценции комплексов хромофора M739 с липокалинами DiB3/F74V и DiB3/F53L оказались достаточными для того, чтобы на микроскопе Nanoimager S произвести одновременную съемку двух меченых структур в живых клетках с использованием одного и того же хромофора.



**Рисунок 22.** 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. Изображения реконструированы по 10 000 кадров (частота съемки 30 Гц, цикл съемки: 100 кадров при облучении 488 нм лазером мощностью  $1,8 \text{ кВт} \cdot \text{см}^{-2}$ , 100 кадров при облучении 561 нм лазером мощностью  $1,3 \text{ кВт} \cdot \text{см}^{-2}$ ). (А) Сверхразрешенная реконструкция цитокератина меченого DiB3/F74V в живой клетке HeLa Kyoto. (Б) Сверхразрешенная реконструкция виментина меченого DiB3/F53L в живой клетке HeLa Kyoto. (В) Совмещенное изображение снятого цитокератина и виментина; масштабные линейки 10 мкм. Адаптировано из [182].

### 4.3. Сплит-система на основе липокалина DiB2.

Кристаллизация мутанта DiB1 в комплексе с хромофором M739 позволила лучше понять структурные характеристики липокалинов [182]. Параллельно с этим в центре структурной биологии университета Вандербильта (США) была закристаллизована апо-форма мутанта DiB3 [185]. Интересно, что липокалина развернулись в двухдоменную структуру и образовали димер (Рисунок 23). Однако, структуры, получившиеся из N- и C-концов разных полипептидных цепей представляют собой практически неизменный липокалиновый фолд (кроме шарнирной области 109-113, которая соединяет обменявшиеся части белков). Было сделано предположение, что наблюдаемая структура с обменом доменами двух полипептидных цепей была вызвана очень низким pH кристаллизационного буфера. Для подтверждения этого предположения в программе для моделирования Rosetta были рассчитаны энергии взаимодействия между N- и C-концевыми фрагментами белков Vlc дикого типа и DiB3. Липокалин Vlc дикого типа оказался немного более стабильным, чем DiB3. Вместе с этими расчетами наличие кристалла липокалина Vlc без обмена доменами говорит нам о том, что DiB3 в физиологических условиях не должен формировать подобную структуру с обменом доменами.



**Рисунок 23.** 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 сплит-системы из трех мутантов DiB1, DiB2 и DiB3. Все три сплит-системы оказались способны связывать хромофор M739 и усиливать его флуоресценцию (Таблица 3). Физико-химические свойства полученных сплит-систем были сравнены с полноразмерными версиями мутантов липокалина и свободных хромофором M739 (Таблица 3). Во всех случаях константы диссоциации сплит-систем в 1,5-3 раза больше, чем у родительских полноразмерных белков. Это может объясняться тем, что белок, собранный из двух половинок обладает чуть большей подвижностью полипептидных цепей и не так структурно стабилен, как цельный белок. Положения пиков возбуждения и эмиссии отличаются между сплит-системами и родительскими белками во всех случаях незначительно. Также среди всех сплит-систем, DiB2-сплит единственный показывает значительный прирост в квантовом выходе флуоресценции (50% у сплита DiB2 против 37% у полноразмерного белка DiB2), в то время как остальные сплит системы по этому параметру совпадают с родительскими полноразмерными белками.

**Таблица 3.** 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	$\lambda_{\text{возб}}$ , нм	$\lambda_{\text{эм}}$ , нм	$K_d$ , $\mu\text{M}$	QY, %	$\epsilon$ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$
DiB1	513	541	$0.04 \pm 0.03$	32 <sup>a</sup>	49 000
DiB1-сплит	516	543	$0.08 \pm 0.03$	32	50 150
DiB2	507	540	$5.9 \pm 0.7$	37	53 000
DiB2-сплит	509	535	$9 \pm 0.9$	50	49 200
DiB3	545	562	$4.9 \pm 0.4$	15 <sup>a</sup>	51 700
DiB3-сплит	533	558	$14.1 \pm 2.8$	16	57 300
M739	517	564	—	3.5 <sup>a</sup>	53 500 <sup>a</sup>

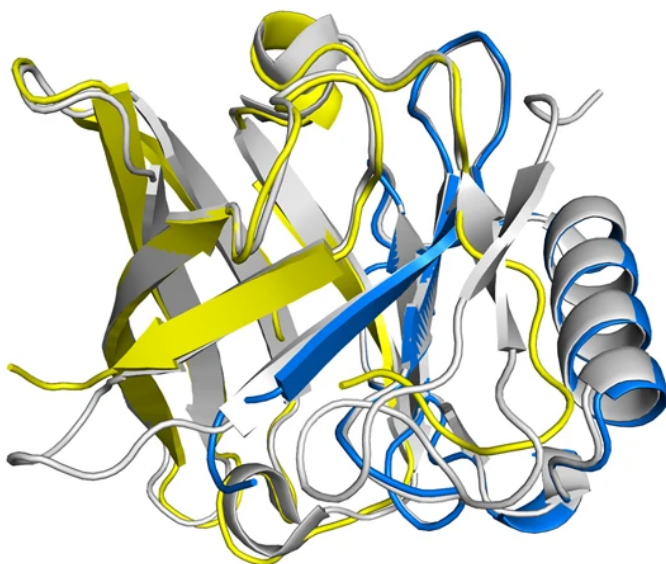
$\lambda_{\text{возб}}$  – длина волны в пике спектра возбуждения.

$\lambda_{\text{эм}}$  – длина волны в пике спектра эмиссии.

Значения константы диссоциации представлены средним  $\pm$  стандартное отклонение трех повторностей.

<sup>a</sup> - данные из [176].

Далее необходимо было подтвердить образование липокалинового фолда из половинок сплита. Для этого была проведена кристаллизация сплита на основе липокалина DiB2. Полученная структура хорошо соответствовала структуре липокалина Vlc дикого типа (Рисунок 24).



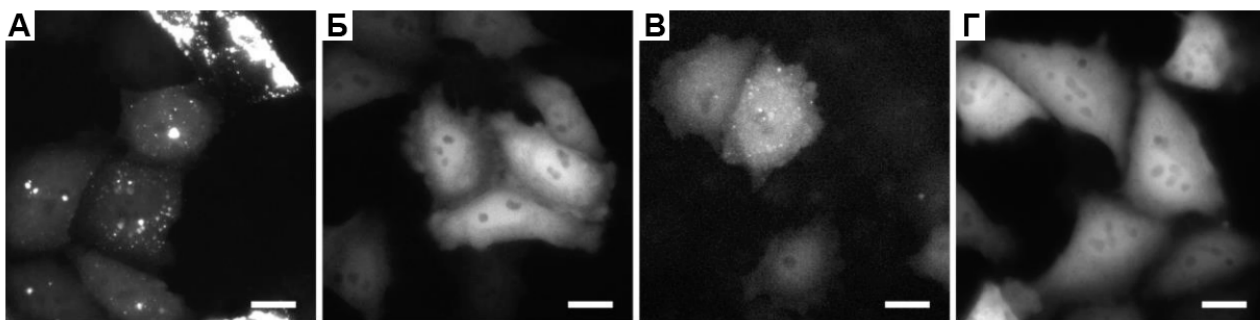
**Рисунок 24.** Анализ кристаллической структуры сплита DiB2. Структура сплита DiB2 (С-фрагмент желтого цвета, N-фрагмент синего цвета) наложенная на структуру липокалина дикого типа (Серого цвета, PDB-ID: 1QWD).

Общий липокалиновый фолд, а также специфические внутримолекулярные взаимодействия, стабилизирующие  $\beta$ -бочонок, которые после расщепления стали межмолекулярными взаимодействиями, хорошо сохраняются в структуре DiB2-сплита. Это подтверждает, что сплит-система способна к спонтанной правильной самосборке с образованием функционального белка. Этот вывод согласуется с наблюдаемыми спектральными свойствами (Таблица 3).

Для использования сплит-системы *in cellulo* важно убедиться в том, что половинки белка отдельно друг от друга хорошо растворимы в клетках.

Для этого были созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие белки слияния TagBFP-сплитN<sub>1-109</sub> и TagBFP-сплитC<sub>110-177</sub>. Эти конструкции использовались для временной трансфекции клеток НЕК293. Оказалось, что N-фрагмент в свободном состоянии склонен к агрегации (Рисунок 25, А), в то время как С-фрагмент оставался полностью растворим и давал равномерную флуоресценцию в синем канале (Рисунок 25, Б). После изучения кристаллической структуры DiB2-сплита, мы предположили, что агрегация фрагмента сплитN<sub>1-109</sub> (Рисунок 25, А) может быть вызвана нарушением

множественных ключевых взаимодействий, вызванным удалением следующей N-концевой  $\beta$ -цепи. Мы предположили, что смещение точки расщепления DiB2 на одну  $\beta$ -цепь (аминокислоты 110–125) дальше к C-концу белка может решить эту проблему. Мы создали две новые конструкции, TagBFP-сплитN<sub>1–125</sub> и дополняющую ее TagBFP-сплитC<sub>126–177</sub>, и протестировали их поведение в живых клетках. Мы обнаружили значительное улучшение поведения отдельно экспрессируемого белка слияния TagBFP-сплитN<sub>1–125</sub> (Рисунок 25, В). Только клетки с очень высоким уровнем экспрессии демонстрировали некоторые остаточные признаки агрегации. Экспрессия C-концевого фрагмента (TagBFP-сплитC<sub>126–177</sub>), как и ранее, давала равномерно распределенный флуоресцентный сигнал в синем канале (Рисунок 25, БГ).



**Рисунок 25.** Широкопольная флуоресцентная микроскопия в синем канале клеток HEK293 временно трансфицированных (А) TagBFP-сплитN<sub>1–109</sub>, (Б) TagBFP-сплитC<sub>110–177</sub>, (В) TagBFP-сплитN<sub>1–125</sub>, или (Г) TagBFP-сплитC<sub>126–177</sub> конструкциями. Масштабные линейки составляют 10 мкм.

Таким образом, за счет меньшей степени агрегации для дальнейшей работы была выбрана сплит-система с альтернативной точкой разрыва по аминокислотам 125–126.

Для проверки работоспособности сплит-системы на основе липокалина DiB2 с альтернативной точкой разрыва *in cellulo* необходимо было провести котрансфекцию конструкциями, кодирующими оба фрагмента сплит-системы.

Мы исследовали две возможные комбинации фрагментов, которые



потенциально могут образовывать полноразмерную белковую структуру DiB2:

- TagBFP-сплитN<sub>1-125</sub> + TagBFP-сплитC<sub>126-177</sub>  
(Без перекрытия последовательностей сплит-системы).
- TagBFP-сплитN<sub>1-125</sub> + TagBFP-сплитC<sub>110-177</sub>  
(С частичным перекрытием последовательной сплит-системы).

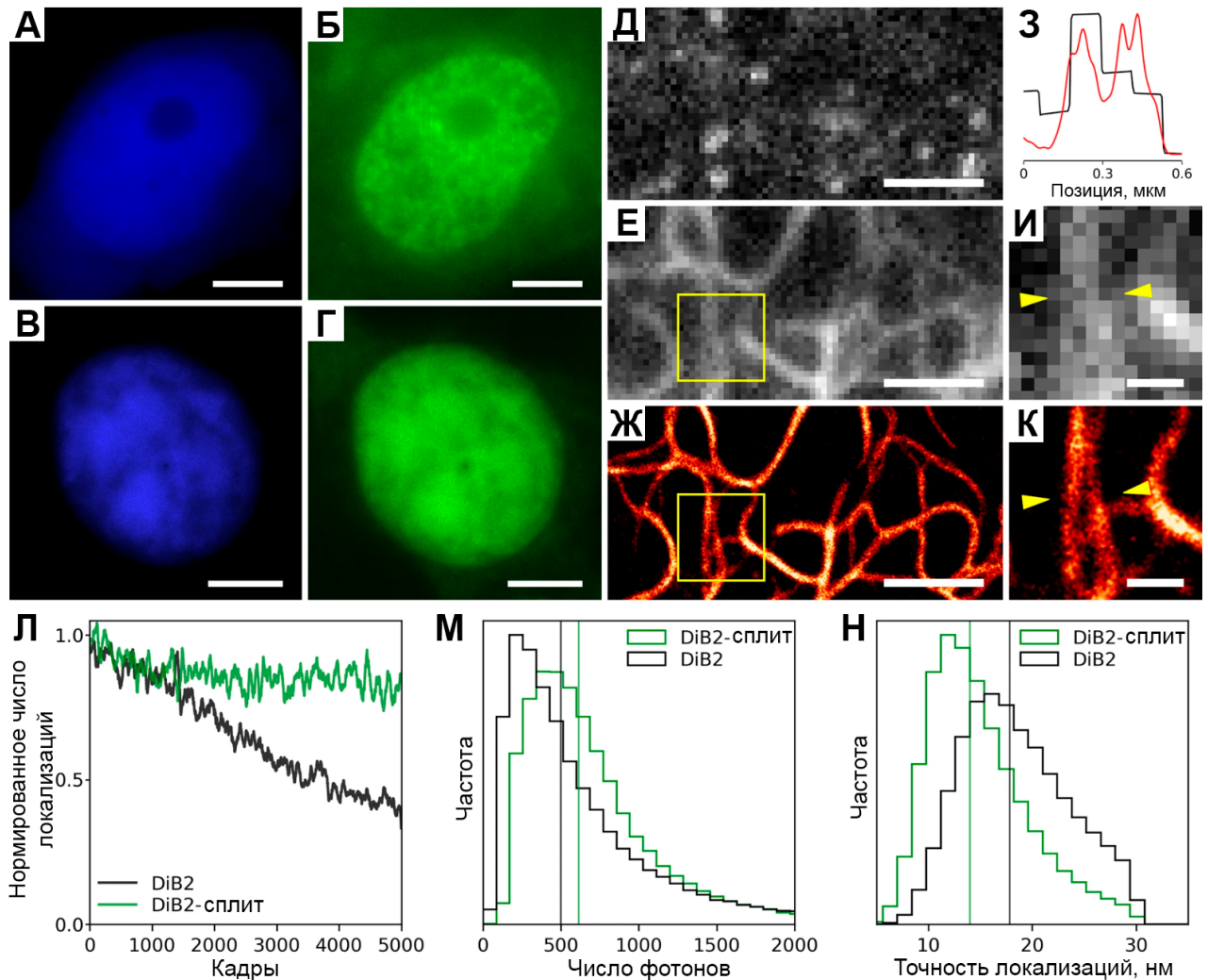
После добавления хромофора M739 восстановление специфического для DiB2 флуоресцентного сигнала в зеленом канале наблюдалось только во второй паре с частичным перекрытием последовательностей.

Комбинация двух белковых фрагментов с частичным перекрытием, по-видимому, обеспечивает более эффективную сборку и/или более длительное время полураспада функционального комплекса, поэтому в дальнейшем использовали именно сплит-систему с перекрытием фрагментов.

Для того, чтобы оценить эффективность сплит-системы необходимо было протестировать применимость этой системы в условиях широкопольной и локализационной микроскопии, а также измерить параметры молекулярной яркости, точности локализаций и стабильности мечения.

Мечение с помощью DiB2-сплита в живых клетках было оценено путем временной котрансфекции фрагментов N<sub>1-125</sub> и C<sub>110-177</sub> в составе белков слияния либо с гистоном H2B, либо с виментином, и с флуоресцентным белком TagBFP. Были протестированы две пары фрагментов в составе белков слияния с H2B и TagBFP: (1) фрагмент сплитN<sub>1-125</sub> в составе белка слияния с H2B, и фрагмент сплитC<sub>110-177</sub> в составе белка слияния с TagBFP (H2B-сплитN<sub>1-125</sub> + TagBFP-сплитC<sub>110-177</sub>), и (2) фрагмент сплитN<sub>1-125</sub> в составе белка слияния с TagBFP, а сплитC<sub>110-177</sub> в составе белка слияния с H2B (H2B-сплитC<sub>110-177</sub> + TagBFP-сплитN<sub>1-125</sub>). При временной трансфекции первой парой конструкций (H2B-сплитN<sub>1-125</sub> + TagBFP-сплитC<sub>110-177</sub>) синий флуоресцентный сигнал TagBFP подтверждал отсутствие агрегации как в ядре, так и в цитоплазме (Рисунок 26, А). В зеленом канале детекции сигнал комплекса DiB2-сплит:M739 был виден преимущественно в ядре, что свидетельствует об

эффективной самосборке полноразмерного белка DiB2 из N и C фрагментов (Рисунок 26, Б). Аналогичные результаты были получены со вторым набором конструкций (H2B-сплитC<sub>110-177</sub> + TagBFP-сплитN<sub>1-125</sub>, Рисунок 26, ВГ). В случае с виментином сигнал флуоресценции от полноразмерного DiB2-сплита локализуется на виментине в соответствии с ожиданиями. Таким образом, значительная часть DiB2-сплита спонтанно самособирается в живых клетках.



**Рисунок 26.** Применение сплит-системы на основе липокалина DiB2 в широкопольной микроскопии и микроскопии сверхвысокого разрешения. Широкопольное флуоресцентное изображение живых клеток HEK293 временно котрансфицированных парами конструкций H2B-сплитN<sub>1-125</sub> + TagBFP-splitC<sub>110-177</sub> (А, Б), и H2B-сплитC<sub>110-177</sub> + TagBFP-сплитN<sub>1-125</sub> (В, Г) в присутствии хромофора M739 в концентрации 200 нМ; масштабная линейка составляет 5 мкм.

Индивидуальный кадр в условиях сверхразрешающей микроскопии (Д), проекция по средней яркости 2 000 кадров (Е) и реконструкция (Ж) 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. (З) Нормализованный профиль интенсивности между желтыми стрелками на широкопольной (И) и сверхразрешенной (К) области панелей (Е) и (Ж); 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>) (Л–Н) на примере белка слияния с виментином. (Л) Сравнение фотостабильности; график показывает нормализованное число локализаций на кадр. (М) Гистограмма детектированных фотонов на каждую единичную вспышку флуоресценции; вертикальные линии соответствуют медианным значениям. (Н) Гистограмма точности локализаций; вертикальные линии соответствуют медианным значениям.

Далее сплит-система на основе липокалина DiB2 была протестирована в условиях локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения. Так же как и полноразмерный DiB2, DiB2-сплит может быть использован как метка для сверхразрешения: вспышки флуоресценции от индивидуальных событий связывания собранного белка и хромофора четко детектируются (Рисунок 26, Д). Реконструкция волокон виментина в сверхвысоком разрешении (Рисунок 26, Ж) подтверждает применимость DiB2-сплита в локализационной микроскопии и явное улучшение разрешение по сравнению с широкопольной микроскопией (Рисунок 26, Е–Ж). DiB2-сплит показывает более высокую яркость на уровне одиночных молекул чем у полноразмерного DiB2 (медианное число фотонов за вспышку 614 и 501 соответственно, Рисунок 26 М), что обеспечивает стабильное число локализаций за кадр (Рисунок 26, Л) и большую точность локализаций

(14 нм против 17.8 нм у полноразмерного DiB2, Рисунок 26, Н).

Сплит-система на основе липокалина DiB2 демонстрирует потенциал липокалинового фолда для создания флуоресцентных сплит-систем. Эту систему можно применять в качестве метки для наноскопии, которая по размеру меньше, чем типичные флуоресцентные или флуороген-активирующие белки. Уменьшение размера метки обеспечиваемое разделением белка на два фрагмента (минимальный фрагмент сплит-системы DiB2 – 67 аминокислот) может уменьшить влияние метки на исследуемый белок. Более того, флуоресценция сплит-системы DiB2 не требует созревания хромофора после сборки полноразмерного белка в отличие от самособирающихся флуоресцентных белков [186,187], поэтому ее можно использовать для изучения различных быстрых биологических процессов, таких как экспрессия белка и ранние события белкового транспорта.

Однако, для изучения белок-белковых взаимодействия данная сплит-система неприменима из-за спонтанной самосборки. Возможно, данную сплит-систему в дальнейшем можно будет оптимизировать точечными заменами в N и C фрагментах для того, чтобы нарушить интерфейсы для спонтанной самосборки, но при этом не помешать фрагментам формировать полноразмерный функциональный белок при пространственном сближении.

#### **4.4. Сплит-система на основе Rosetta Mutant липокалина.**

Подходы к компьютерному моделированию белков развиваются невероятно быстро и демонстрируют отличные результаты во многих приложениях, включая дизайн белков *de novo*. Это предполагает, что более легкая задача тонкой настройки свойств связывания флуорогена уже функционального белка *in silico* должна быть легко достижима. Чтобы проверить эту гипотезу, коллеги из лаборатории биофотоники ИБХ РАН, использовали Rosetta для вычислительной стыковки хромофора M739 с последующим изменением дизайна лиганд-связывающего кармана липокалина DiB1.

Таким образом, коллегами из лаборатории биофотоники ИБХ РАН был

смоделирован и охарактеризован липокалин DiB-RM (Rosetta Mutant) [188]. Относительно родительского белка DiB1 он содержал следующие мутации: F44A, N67F, S79Y, E80V, S98A. Также новый мутант значительно превосходил родительский белок DiB1 по квантовому выходу флуоресценции (59% у DiB-RM против 32% у DiB1, Таблица 4).

Мы решили попробовать получить из нового липокалина DiB-RM сплит-систему. Для разрыва цепи было выбрано положение между аминокислотами 109 и 110, аналогично сплит-системе на основе липокалина DiB2.

Полученная сплит-система DiB-RM-сплит была охарактеризована *in vitro*. Сплит-система на основе DiB-RM показала такой же квантовый выход флуоресценции как у полноразмерного DiB-RM (59%), при этом обладая большим коэффициентом экстинкции (59400 у DiB-RM-сплит против 56000 у DiB-RM).

**Таблица 4.** Физико-химические свойства DiB-RM и сплит-системы на его основе в сравнении с DiB1 и свободным хромофором M739.

Мутант	$\lambda_{\text{возб}}$ , нм	$\lambda_{\text{эм}}$ , нм	$K_d$ , мкМ	QY, %	$\epsilon$ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$
DiB1	512	543	$0.04 \pm 0.03$	32 <sup>a</sup>	49 000
DiB-RM	511	543	$0.17 \pm 0.04$	59	56 000
DiB-RM-сплит	517	548	$2.8 \pm 0.4$	59	59 400
M739	517	564	—	3.5 <sup>a</sup>	53 500 <sup>a</sup>

$\lambda_{\text{возб}}$  – длина волны в пике спектра возбуждения.

$\lambda_{\text{эм}}$  – длина волны в пике спектра эмиссии.

Значения константы диссоциации представлены средним  $\pm$  стандартное отклонение трех повторностей.

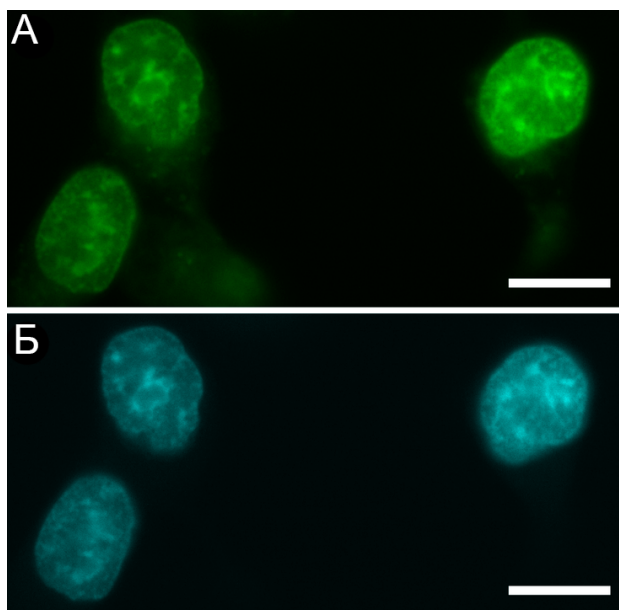
<sup>a</sup> - данные взяты из [176].

Таким образом, полученная сплит-система на основе нового смоделированного мутанта DiB-RM по физико-химическим свойствам, как и полноразмерный DiB1-RM, значительно превосходит родительский белок DiB1.

Далее для проверки возможности применения DiB-RM-сплит в условиях широкопольной флуоресцентной микроскопии необходимо было провести мечение структур в живых клетках. Также была проведена проверка на агрегацию отдельных свободных фрагментов сплит-системы в клетках.

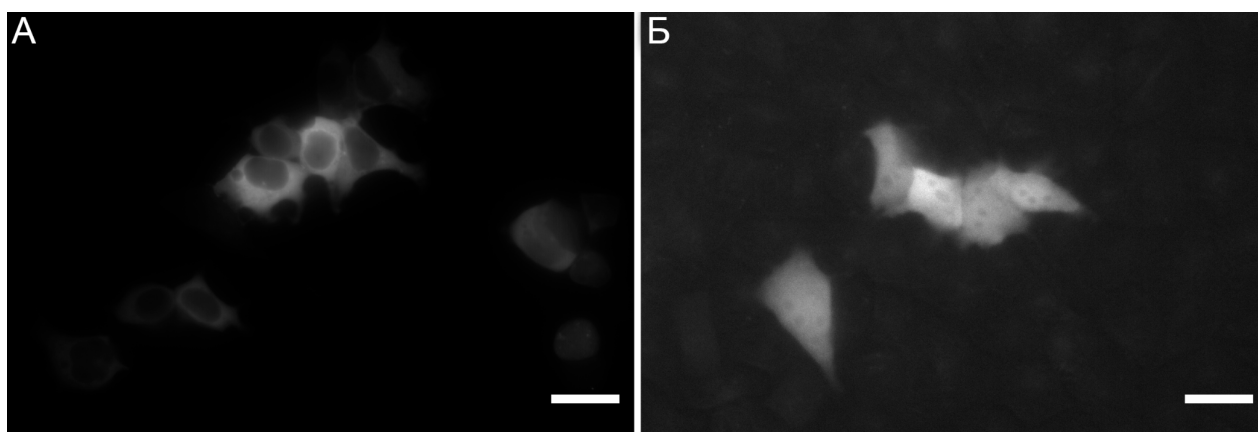
Для этого были созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие белки слияния H2B-DiB-RM-splitN<sub>1-109</sub> и DiB-RM-splitC<sub>110-177</sub>-TagBFP для демонстрации способности визуализировать разные внутриклеточные структуры с помощью DiB-RM-сплит. Для проверки агрегации фрагментов сплита были созданы конструкции, кодирующие DiB-RM-сплитC<sub>1-109</sub>-mNeonGreen и DiB-RM-сплитC<sub>110-177</sub>-TagBFP.

Данный эксперимент показал применимость сплит-системы на основе DiB-RM для визуализации внутриклеточных структур (Рисунок 27). Этот эксперимент также показал, что сплит-система на основе DiB-RM спонтанно самособирается. Несмотря на отсутствие сигнала ядерной локализации, свободный фрагмент устремлялся в клеточное ядро и собирался со вторым фрагментом в полноразмерный функциональный белок, что подтверждается флуоресценцией ядер в зеленом канале детекции флуоресценции при добавлении к клеткам хромофора M739 (Рисунок 27, А).



**Рисунок 27.** Характеристика DiB-RM-сплит *in cellulo* в условиях широкопольной флуоресцентной микроскопии. (А, Б) Широкопольная флуоресцентная микроскопия живых клеток HEK293 временно котрансфицированных конструкциями H2B-DiB-RM-сплит<sub>N<sub>1-109</sub></sub> + DiB-RM-сплит<sub>C<sub>110-177</sub></sub>-TagBFP в присутствии 0.1 мкМ хромофора M739 в зеленом (А) и синем (Б) канале детекции флуоресценции; масштабные линейки составляют 15 мкм.

Интересно, что в этом случае не происходила агрегация (Рисунок 28, А), которая наблюдалась в случае N-фрагмента белка DiB2 в аналогичном эксперименте (Рисунок 25, А). Далее в живых клетках был протестирован свободный С-фрагмент липокалина DiB-RM. Между белками DiB2 и DiB-RM после точки расщепления существует только одно различие в аминокислотной последовательности (L141N), и оно не повлияло на поведение свободного С-фрагмента DiB-RM: в клетках HEK293Т, временно трансфицированных конструкцией DiB-RM-сплит<sub>C<sub>110-177</sub></sub>-TagBFP наблюдалась равномерная флуоресценция в синем канале (Рисунок 28, Б).



**Рисунок 28.** Широкопольная флуоресцентная микроскопия живых клеток HEK293 временно трансфицированных конструкциями (А) NeonGreen-DiB-RM-splitN<sub>1-109</sub> or (Б) DiB-RM-split<sub>110-177</sub>-TagBFP (Сигнал из зеленого и синего канала соответственно); Масштабные линейки составляют 25 мкм.

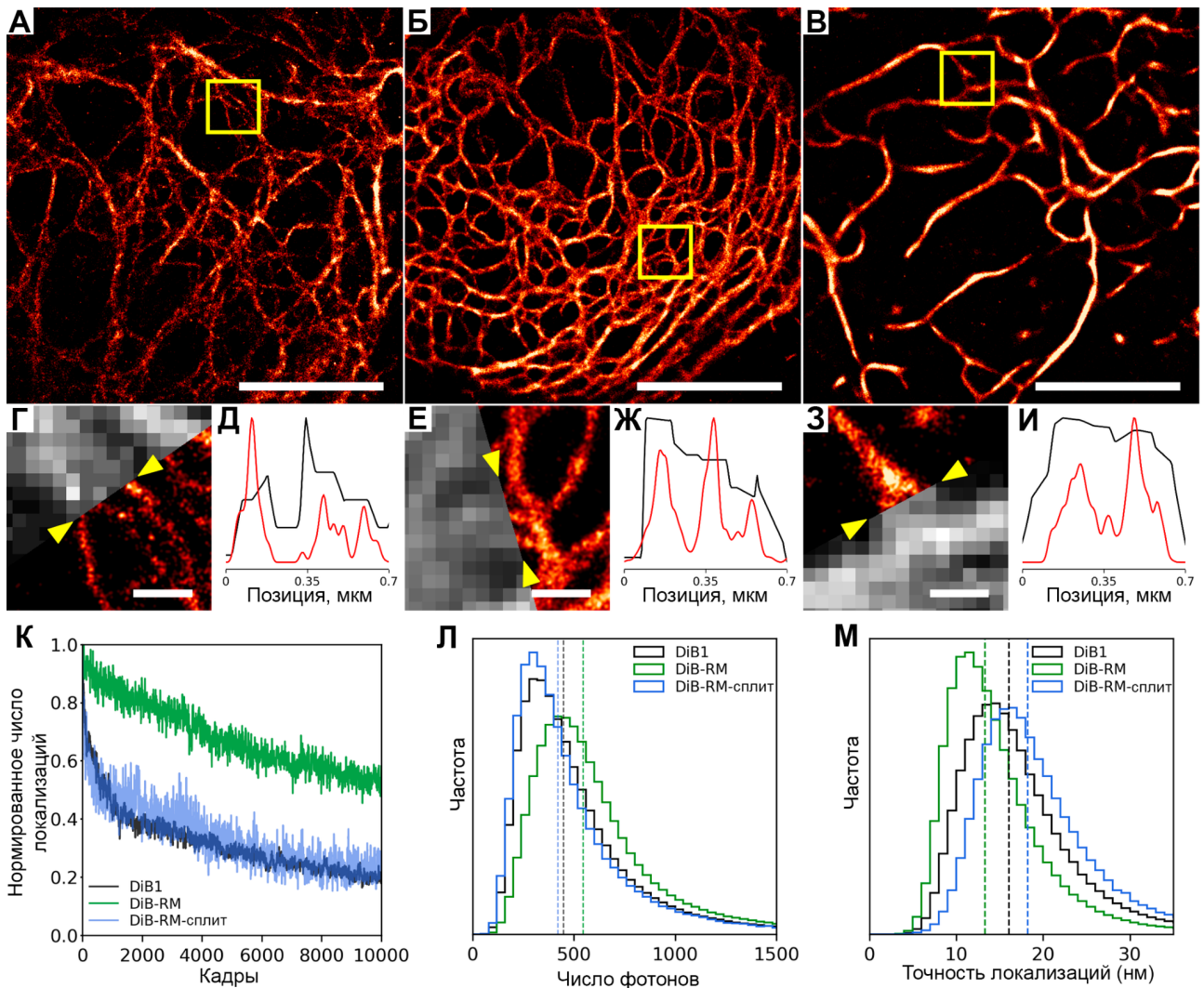
Далее было решено протестировать новые метки в условиях локализационной микроскопии. Для оценки эффективности метки в наноскопии необходимо определить возможность получения субдифракционных изображений в живых клетках, а также измерить параметры молекулярной яркости, точности локализаций и стабильности мечения.

Для этого были созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие белки слияния виментин-DiB1 (как контроль для сравнения), виментин-DiB-RM, виментин-DiB-RM-сплитN<sub>1-109</sub> и DiB-RM-сплитC<sub>110-177</sub>-TagBFP. Съёмку проводили в живых клетках при одинаковых условиях наноскопии.

С помощью всех трех систем мечения были получены субдифракционные изображения виментина (Рисунок 29, А-И). Плотность мечения DiB1 падает экспоненциально в начале съёмки. Сигнал DiB-RM уменьшался только линейно на протяжении всего эксперимента. Это позволяет накапливать гораздо большее количество локализаций за тот же период времени с использованием DiB-RM. Сплит система на основе DiB-RM ведет себя аналогично DiB1 (Рисунок 29, К). Полноразмерный DiB-RM также продемонстрировал более высокую яркость на уровне одиночных молекулы (медианное количество фотонов на событие равно



540), чем DiB-RM-сплит и DiB1 (медианное количество фотонов равно 446 и 419 соответственно, Рисунок 29, Л). DiB1 и DiB-RM-сплит обеспечивали более низкую точность локализации (медианное значение точности локализации равно 16 и 18,2 нм соответственно) по сравнению с DiB-RM (медианное значение точности локализации равно 13,3 нм, Рисунок 29, М).



**Рисунок 29.** 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-сплит $N_{1-109}$  + DiB-RM-сплит $C_{110-177}$ -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 кадрам и реконструкция по 10 000 кадрам; масштабные линейки составляют 0.5 мкм. (Д, Ж, И) Нормализованные профили интенсивности между желтыми стрелками, показанными на панелях (Г, Е, З); кривая черного цвета–широкопольный 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 медианным значениям.

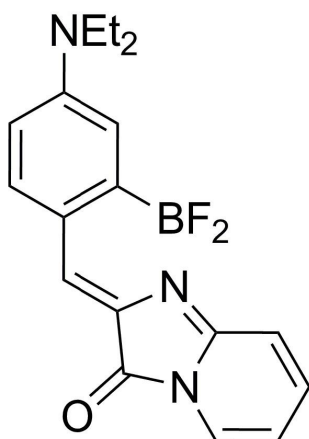
Полученный вариант липокалина DiB-RM применим в условиях локализационной микроскопии и превосходит родительский белок DiB1 по ключевым показателям, включая молекулярную яркость, точность определения локализаций и стабильность мечения. При этом сплит-система на основе DiB-RM по этим показателям оказалась не хуже липокалина DiB1. Аналогично сплит-системе на основе липокалина DiB2 минимальный размер фрагмента DiB-RM-сплит – 67 аминокислот.

Однако, для исследования белок-белковых взаимодействий полученная сплит-система так же как и система на основе липокалина DiB2 не подходит за счет спонтанной самосборки фрагментов в полноразмерный функциональный белок. Данное свойство делает эти сплит-системы неприменимыми к изучению белок-белковых взаимодействий, так как самосборка N и C фрагментов будет оказывать влияние на пространственную локализацию исследуемых белков.

#### **4.5. Дальнекрасный комплекс липокалина и хромофора mka67.**

До этого момента эмиссия всех рассмотренных комплексов липокалин:хромофор лежали от зеленой (539 нм пик эмиссии комплекса DiB2:M739) до ближнекрасной области (566 нм пик эмиссии комплекса

DiB3:M739). Наши коллеги из лаборатории биофотоники ИБХ РАН совместно с группой химии гетероциклических соединений ИБХ РАН в результате скрининга мутантов липокалина с новыми синтетическими красными хромофорами нашли дальнекрасный комплекс липокалин DiB1 с хромофором mka67 (Рисунок 30, Таблица 5), который был успешно применен для флуоресцентного мечения структур в живых клетках в условиях широкопольной микроскопии [166].



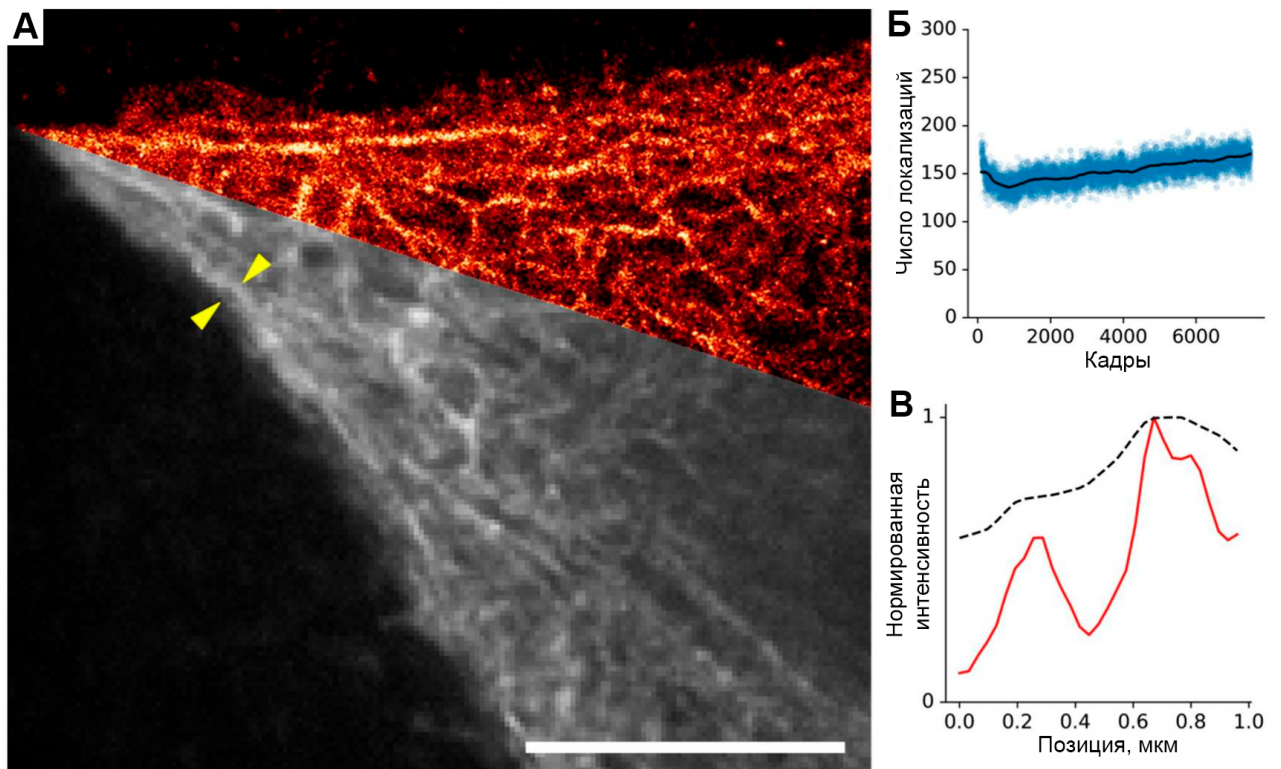
**Рисунок 30.** Структура хромофора mka67.

**Таблица 5.** Физико-химические свойства хромофора mka67 в свободном виде и с комплексе с липокалином DiB1.

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

Подобно ранее описанным парам липокалин-флуороген, обратимый комплекс DiB1 и mka67 можно использовать в качестве двухсоставной метки в условиях локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения в живых клетках. Мы протестировали комплекс DiB1:mka67 в составе белка слияния с цитокератином в условиях локализационной микроскопии. При добавлении mka67 до конечной концентрации 15 нМ в среду для визуализации мы наблюдали стабильное число локализаций (Рисунок 31).

Таким образом, комплекс DiB1:mka67 показал высокую эффективность в наноскопии.

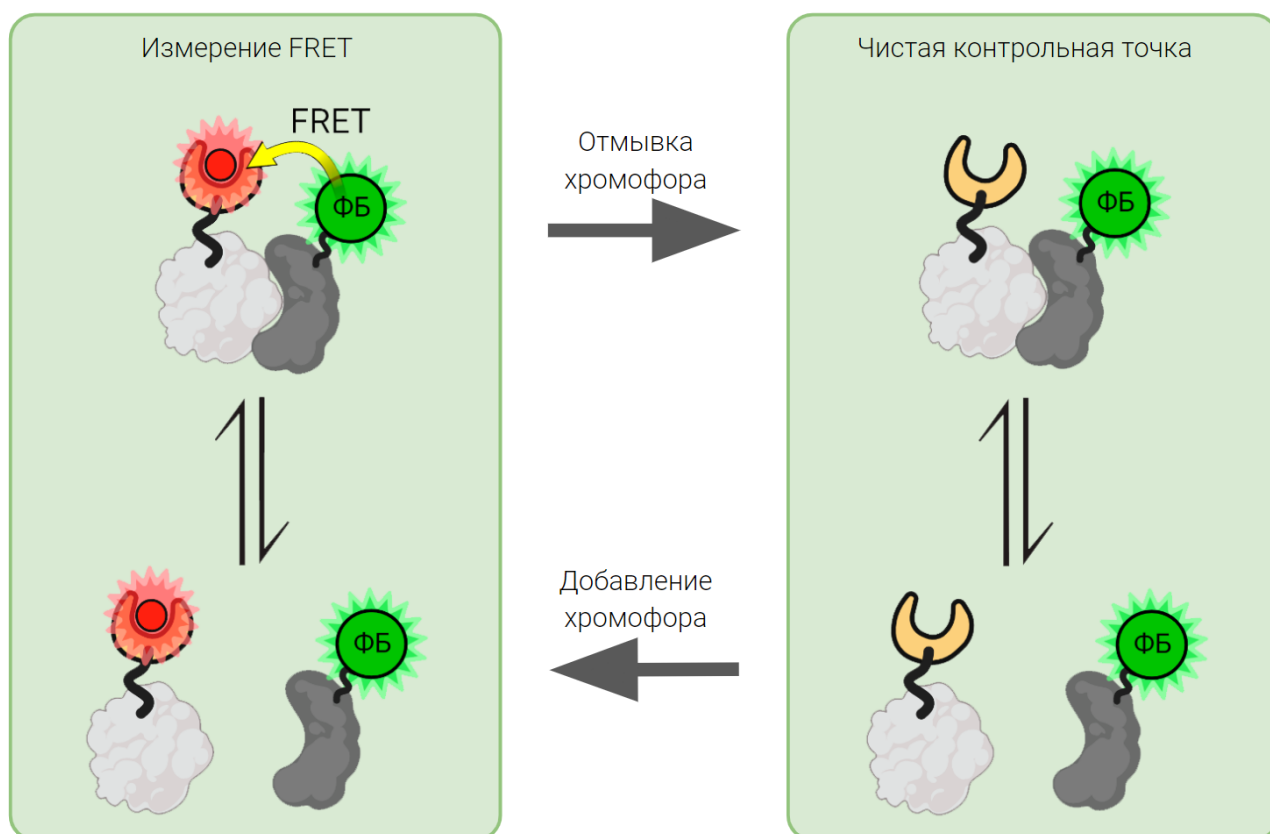


**Рисунок 31.** Локализационная микроскопия клеток HeLa Kyoto временно трансфицированных конструкцией цитокератин-18-DiB1. Съемка проходила в присутствии 15 нМ хромофора mka67. (А) Широкопольная картинка, полученная усреднением интенсивности 3000 кадров (снизу) и сверхразрешенная реконструкция по 3000 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.

#### **4.6. Модулируемые акцепторы FRET на основе комплекса липокалин:хромофор.**

Для изучения белок-белковых взаимодействий было решено создать FRET пару на основе липокалина. Комплекс липокалин:хромофор в такой паре мог бы выступать в качестве модулируемого акцептора: попеременное добавление и отмывка хромофора позволят многократно получать контрольное измерение (без FRET) в тех же клетках, не обесцвечивая акцептор интенсивным светом (Рисунок 32).

Действительно, низкая аффинность и быстрый обмен хромофора в комплексе с липокалином позволяет получить модулируемость при использовании в качестве акцептора FRET, в то время как донором может выступать флуоресцентный белок. Модулируемый акцептор позволит точно определить эффективность FRET в том числе и в динамике, в то время как поочередные фотоактивации и деактивации акцепторов на основе фотопереключаемых флуоресцентных белков происходят не полностью, а многократное проведение фотообесцвечивания акцептора попросту невозможно [81,82].



**Рисунок 32.** Схема взаимодействия белков, меченых флуоресцентным белком в качестве донора FRET и липокалином в качестве модулируемого акцептора. За счет отмывки хромофора можно получать контрольное измерение без FRET.

#### 4.6.1. Скрининг и отбор FRET пар.

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. Данные конструкции были использованы для экспрессии белков в *E. coli* 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 могут обеспечить высокую эффективность FRET (Таблица 6).

**Таблица 6.** Квантовый выход флуоресценции и время жизни флуоресценции флуоресцентных белков, выбранных в качестве доноров FRET.

Белок	Квантовый выход фл., %	Время жизни фл., нс
TagBFP	63	2.6
Cerulean	62	3.3
mCerulean3	87	4.1
mTurquoise2	93	4.0
mNeonGreen	80	3.1

Данные взяты из статей [41,189–192].

В качестве акцепторов были взяты липокалины DiB1, DiB2 и DiB3 с хромофорами M739, 774 и mka67, структуры которых были показаны ранее на рисунках 9 и 30.

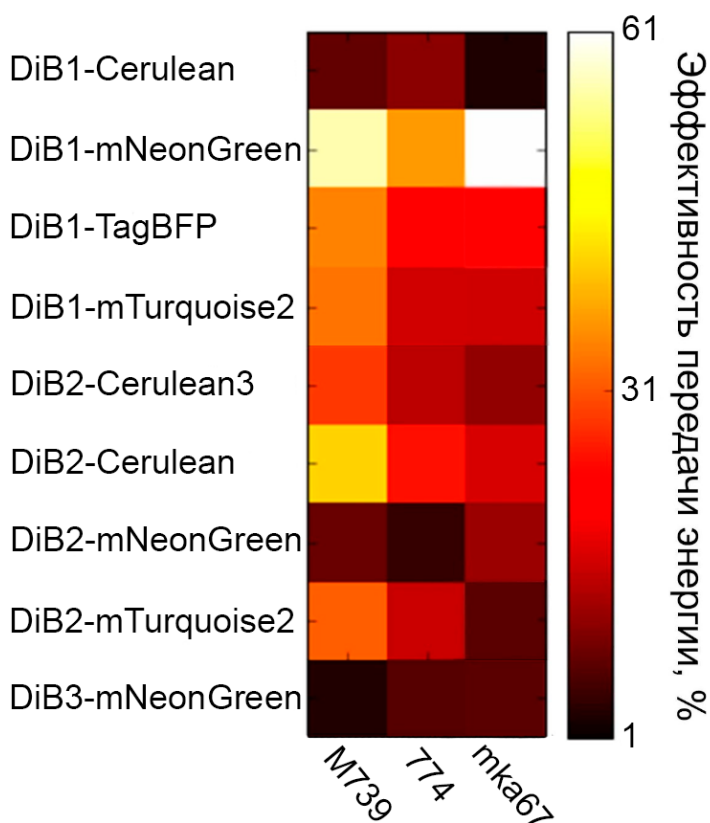
Выделенные белки слияния флуоресцентных белков с липокалинами были протестированы *in vitro*, эффективность переноса энергии была определена путем сравнения спектра эмиссии донора FRET до и после добавления хромофора (активации акцептора). Линкер между донором и акцептором был выбран длиной 15 аминокислот, 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. Для тестирования были созданы следующие генно-инженерные конструкции для выделения белков слияния из бактерий:

- DiB1-TagBFP
- DiB1-mTurquoise2
- DiB1-Cerulean
- DiB1-mNeonGreen

- DiB2-mTurquoise2
- DiB2-Cerulean
- DiB2-mCerulean3
- DiB2-mNeonGreen
- DiB3-mNeonGreen

Эффективности FRET пар *in vitro* определенные в результате скрининга приведены на рисунке 33. Как видно, многие FRET пары имеют эффективность переноса энергии более 35%. В основном это пары липокалинов с синим (TagBFP) и голубыми (Cerulean, mTurquoise2) флуоресцентными белками в присутствии зеленого хромофора M739. На этом фоне сильно выделяется пара липокалина DiB1 с зеленым флуоресцентным белком mNeonGreen, имеющая высокую эффективность с хромофорами M739 и 774 на уровне ~50% и ~35% соответственно, а также самую высокую эффективность из всех тестируемых пар с красным хромофором mka67 (эффективность переноса ~60%).





**Рисунок 33.** 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.

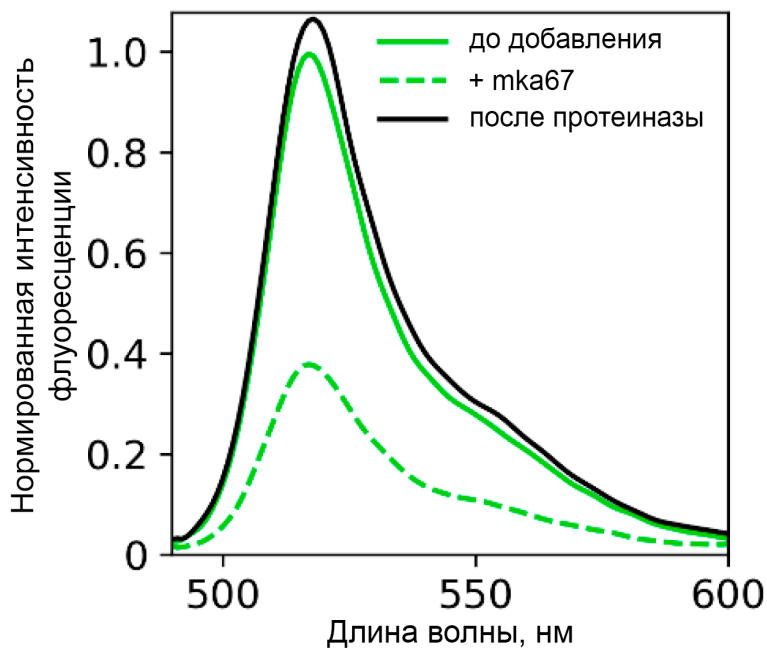
Пара DiB1-mNeonGreen с красным хромофором mka67 была выбрана для дальнейшей характеристики в качестве наиболее перспективной FRET пары из всех протестированных пар *in vitro* за счет самой высокой эффективности.

Прежде всего необходимо было проверить, не является ли наблюдаемый эффект FRET артефактом. Например, если хромофор mka67 связывается непосредственно с флуоресцентным белком mNeonGreen, обеспечивает его экранирование и независимый от акцептора вклад в наблюдаемое падение интенсивности флуоресценции. Для проверки этой гипотезы был проведен эксперимент по расщеплению линкера между акцептором DiB1 и донором mNeonGreen с помощью протеиназы К (Рисунок 34).

Выделенный белок слияния DiB1-mNeonGreen был снят на

спектрофотометре в трех состояниях:

- 1) До добавления хромофора mka67.
- 2) После добавления mka67 и активации акцептора.
- 3) После добавления протеиназы К и 30 минут инкубации.



**Рисунок 34.** Спектр эмиссии флуоресценции флуоресцентного белка mNeonGreen в составе белка слияния DiB1-mNeonGreen до добавления флуорогена mka67 (зеленая сплошная линия), после добавления (конечная концентрация 100 нМ, зеленая прерывистая линия) и после получаса инкубации с протеиназой К при 37 С° (черная линия).

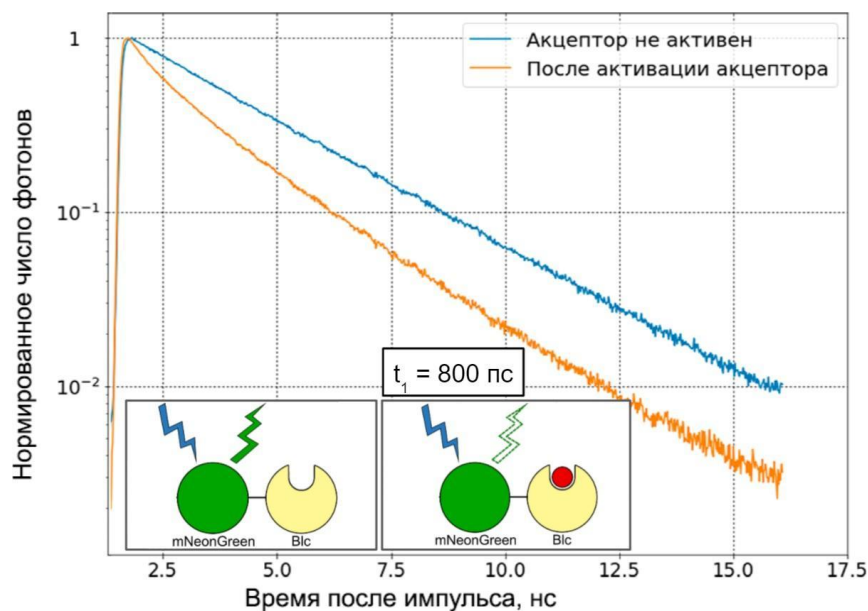
Протеиназа К разрезает пространственно доступный линкер между флуоресцентным белком и липокалином. В свою очередь флуоресцентные белки известны своей устойчивостью к протеазам. Соответственно, после добавления протеиназы К и инкубации с ней, донор и акцептор оказываются на достаточном отдалении друг от друга в растворе, чтобы эффективность FRET упала до нуля.

В соответствии с ожиданиями, интенсивность флуоресценции донора mNeonGreen вернулась к прежнему уровню, на котором она была до добавления

хромофора mka67 (активации акцептора). Это указывает на то, что перенос энергии происходит только между mNeonGreen и акцептором DiB1:mka67.

Для более полной характеристики FRET пары DiB1-mNeonGreen *in vitro* была определена эффективность переноса энергии по времени жизни флуоресценции белка донора mNeonGreen.

Для этого использовали тот же очищенный белок слияния DiB1-mNeonGreen. Время жизни флуоресценции белка mNeonGreen в FRET паре mNeonGreen-DiB1 измеряли в присутствии хромофора mka67 с использованием счетчика фотонов в лаборатории Максимова Е.Г. (МГУ имени М.В. Ломоносова) до и после добавления хромофора mka67 (Рисунок 35).



**Рисунок 35.** График количества фотонов в зависимости от времени после вспышки возбуждающего лазера до и после добавления хромофора mka67 и активации акцептора.

При добавлении хромофора mka67 и активации акцептора, время жизни флуоресценции белка mNeonGreen упало до 0.8 пс (время жизни свободного mNeonGreen - 3.1 нс), что соответствует эффективности переноса энергии ~75%.

Таким образом пара mNeonGreen-DiB1:mka67 показала высокую

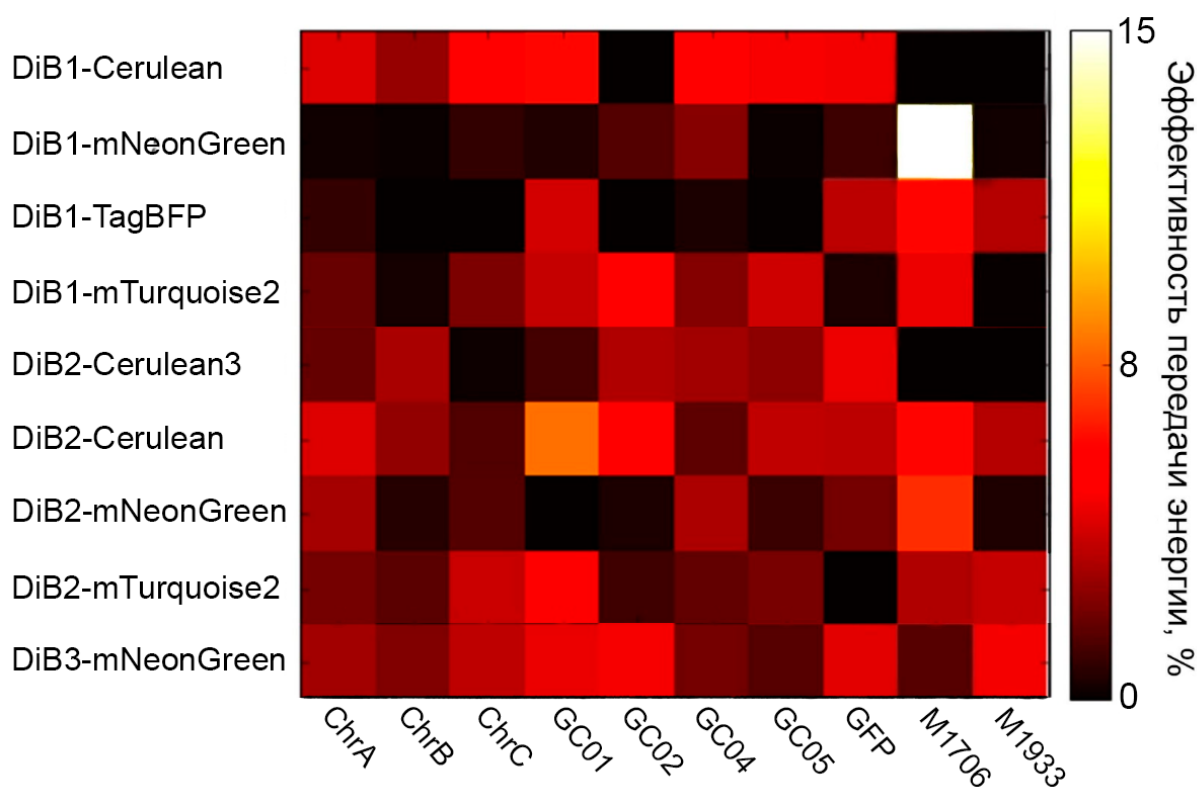
эффективность как в режиме измерения эффективности по интенсивности флуоресценции донора, так и в режиме измерения времени жизни флуоресценции донора (~60% и ~75% соответственно). Другой практически значимой характеристикой FRET-пары считается ферстеровский радиус – расстояние между диполями донора и акцептора, при котором эффективность переноса энергии составляет 50%. Расчетный ферстеровский радиус данной FRET-пары составляет 5.45 нм. Данное значение находится примерно в середине диапазона известных ферстеровских радиусов для FRET пар на основе флуоресцентных белков. Одни из самых маленьких ферстеровских радиусов имеют FRET пары EGFP-PAGFP (4.4 нм), EGFP-ShadowG (4.7 нм). Самые большие ферстеровские радиусы у пар mNeonGreen-Ruby3 (6.6 нм), CyOFP1-mCardinal (6.9 нм) и LSSmOrange-mKate2 (7 нм) [193].

Комплекс DiB1:mka67 флуоресцентный, а свободный хромофор mka67 также обладает небольшой фоновой флуоресценцией в клеточных мембранах. Лучшим акцептором FRET мог бы быть такой, который при высокой эффективности переноса имеет очень маленький квантовый выход и практически не флуоресцирует как, например, флуоресцентный белок ShadowG (квантовый выход составляет всего 0.5%) [194]. Поэтому было решено дополнительно провести тестирование коллекции аналогов хромофора GFP с низким квантовым выходом, полученных в группе химии гетероциклических соединений ИБХ РАН [166].

Для этого был проверен аналогичный *in vitro* скрининг тех же FRET пар против библиотеки “темных” хромофоров (Рисунок 36). Квантовый выход этих хромофоров в водных растворах близок к нулю, и даже при большой концентрации в среде с клеточными культурами они не дают фонового сигнала в растворе или мембранах. Преимущества использования “темных” хромофоров основано на отсутствии фоновой флуоресценции и свободном канале для съемки [195]. Также “темный” акцептор имеет дополнительное преимущество в случае измерения FRET по времени жизни флуоресценции донора. Из-за крайне низкого квантового выхода флуоресценции акцептора практически отсутствует

возможность ошибочного определения эффективности передачи за счет влияния популяции короткоживущих возбужденных молекул акцептора, которая может быть ошибочно принята за сигнал от молекул донора.

В ходе скрининга оказалось, что ни одна FRET пара не преодолевает показатель эффективности переноса энергии в 15% (Рисунок 36).



**Рисунок 36.** Скрининг эффективности резонансного переноса энергии от флуоресцентных белков к комплексам липокалинов с “темными” хромофорами *in vitro*. Значения эффективности переноса энергии в процентах в каждой паре белок (строки) - хромофор (столбцы) приведены с использованием цветовой шкалы, указанной справа.

Максимальную эффективность переноса 15% показал хромофор M1706 с парой зеленого флуоресцентного белка mNeonGreen в качестве донора и липокалина DiB1 в качестве активируемого акцептора. Это та же FRET пара, которая с хромофором mka67 в предыдущем скрининге показала эффективность переноса равную ~60% по падению интенсивности флуоресценции (Рисунок

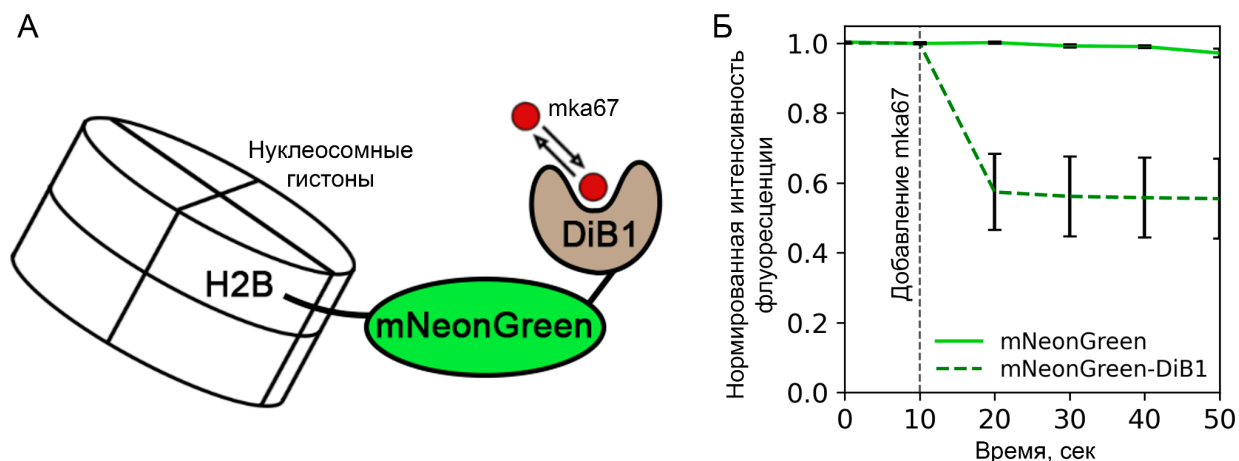
33).

Таким образом, ни один “темный” хромофор не дает достаточной эффективности переноса энергии для обеспечения большого динамического диапазона измерений FRET. По результатам этого скрининга “темные” хромофоры были отброшены и работа продолжалась с парой mNeonGreen-DiB1:mka67, показавшей эффективность ~60% и ~75% по интенсивности флуоресценции и времени жизни флуоресценции соответственно.

Для дальнейшей работы с FRET парой нужно было проверить ее работоспособность в живых клетках. Для этого были созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие белок слияния гистона H2B, флуоресцентного белка mNeonGreen и липокалина DiB1 (Рисунок 37, 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 и активации акцептора.

Как было сказано ранее, модулируемый акцептор позволяет легко измерять эффективность FRET путем добавления хромофора и как следствие, активации акцептора. Соответственно, эффективность FRET измеряли путем деления интенсивности флуоресценции донора mNeonGreen после добавления хромофора mka67 и активации акцептора на интенсивность флуоресценции донора mNeonGreen до добавления хромофора.

В результате эффективность переноса в живых клетках составила ~45% (Рисунок 37, Б). 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.



**Рисунок 37.** Измерение эффективности переноса энергии в паре mNeonGreen-DiB1:mka67 в живых клетках. (А) Схема белка слияния гистона H2B и FRET пары mNeonGreen-DiB1 использованного в эксперименте. (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).

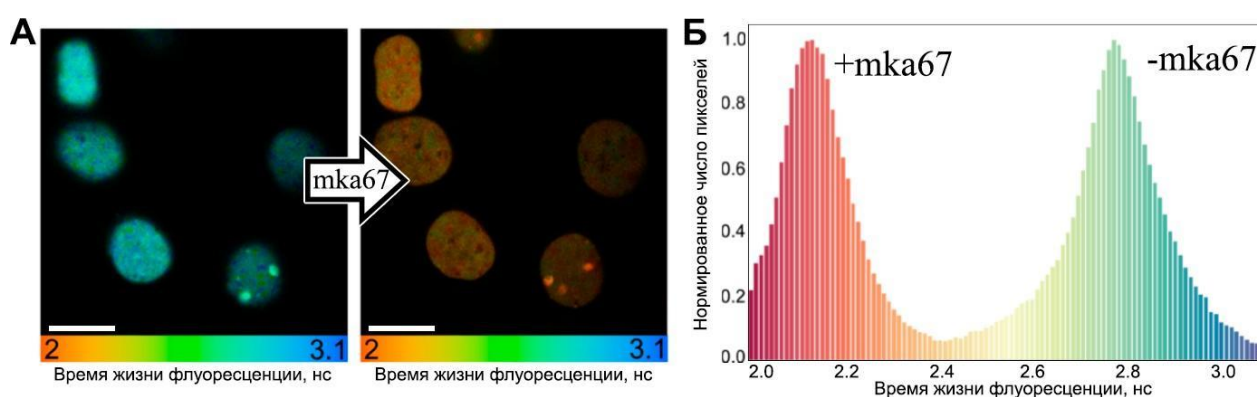
Таким образом, FRET пара mNeonGreen-DiB1:mka67 показала высокую эффективность переноса энергии в живых клетках, которая всего на 15% ниже, чем эффективность измеренная *in vitro*. Эта разница может быть объяснена различным окружением FRET пары в растворе и в клетке, которое в свою очередь влияет на показатель преломления среды и взаимную ориентацию донора и акцептора, от которых зависит эффективность FRET.

Несмотря на то, что FRET пара mNeonGreen-DiB1:mka67 предназначена для измерения FRET в первую очередь по интенсивности донора, а не по времени жизни флуоресценции, мы решили проверить ее работоспособность в живых клетках в условиях микроскопии времени жизни флуоресценции, чтобы сравнить с данными, полученными *in vitro*.

Для этого была взята конструкция H2B-mNeonGreen-DiB1 использованная

в прошлом эксперименте, была проведена временная трансфекция и съемка на FLIM микроскопе с детектором фотонов у Савицкого А.П. (Институт биохимии им. А.Н. Баха).

В результате съемки наблюдалось падение средней времени жизни флуоресценции в ядрах меченых mNeonGreen после добавления к клеткам хромофора mka67 и активации акцептора (Рисунок 38). Падение среднего времени жизни флуоресценции при активации акцептора составило 0.7 нс, с 2.8 нс до 2.1.



**Рисунок 38.** Микроскопия времени жизни флуоресценции (FLIM) клеток HeLa Kyoto, временно трансфицированных конструкцией H2B-mNeonGreen-DiB1. (А) Клетки HeLa Kyoto снятые в канале донора mNeonGreen до (слева) и после (справа) добавления хромофора mka67 и активации акцептора. Масштабные линейки 20 мкм. (Б) Гистограмма распределения среднего времени жизни флуоресценции донора mNeonGreen на изображении (А) до и после добавления хромофора mka67 и активации акцептора.

Таким образом эффективность FRET измеренная по среднему времени жизни флуоресценции донора в этой модели взаимодействия составила около 25%, что существенно ниже ожидаемого. Однако, время жизни флуоресценции донора mNeonGreen в данном эксперименте также немного отличалось от литературных 3.1 нс [196]. Такой результат можно объяснить тем, что съемка проводилась в живых клетках, а на время жизни флуоресценции влияет



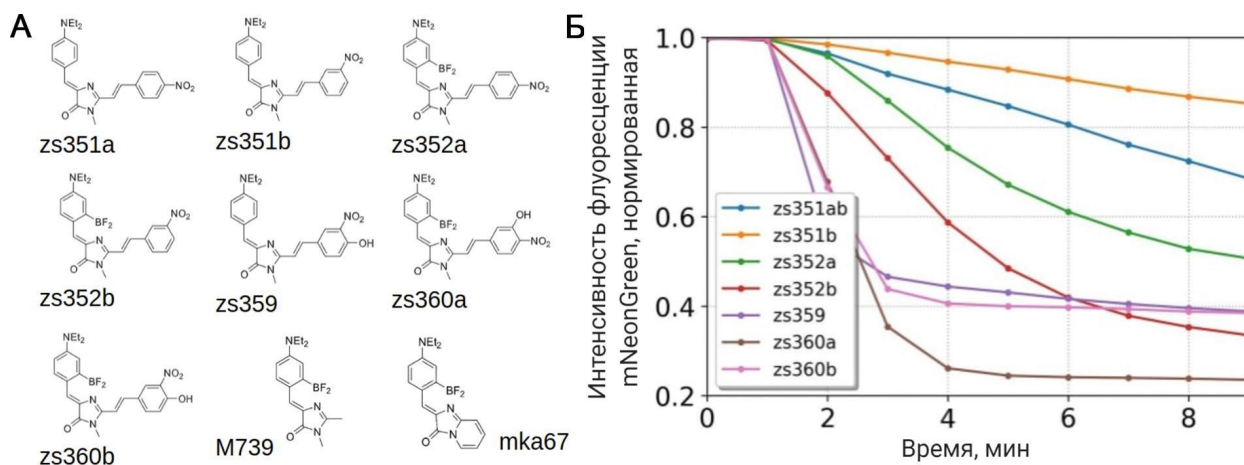
множество факторов окружения флуоресцентного белка. То же самое можно сказать и о поведении акцептора, другими словами, микроокружение FRET пары в клетке сильно отличается от *in vitro* условий, что влияет на фотофизические свойства донора и акцептора и влечет за собой разницу в эффективности переноса между экспериментами *in cellulo* и *in vitro*.

Тем не менее, изначально система мечения на основе липокалина и хромофора была нацелена на использование в качестве FRET акцептора в условиях обычной флуоресцентной микроскопии для измерения FRET в одном канале донора и в этих условиях она показывает высокую эффективность.

Также в группе химии гетероциклических соединений ИБХ РАН на основе хромофора M739 была синтезирована группа хромофоров, содержащих нитрогруппу (Рисунок 39, А). Как было показано ранее, нитрогруппы в составе хромофоров способствуют увеличению эффективности FRET [197]. Синтезированные хромофоры было решено сразу проверить в живых клетках на модели белка слияния гистона H2B с парой mNeonGreen-DiB1 (Рисунок 37, А).

Для этого в условиях широкопольной микроскопии регистрировали сигнал флуоресценции донора mNeonGreen до и после добавления хромофоров с нитрогруппой в клеточную среду.

В результате скрининга было зафиксировано падение флуоресценции донора при активации акцептора вплоть до 20% от изначальной интенсивности флуоресценции, что соответствует эффективности переноса энергии 80% (Рисунок 39, Б).



**Рисунок 39.** Новые лиганды для модулируемого акцептора FRET и их эффективность. **(А)** Соединения, тестированные на способность связываться с липокалином DiB1, флуорогены M739 и mka67 показаны для сравнения. **(Б)** Изменение флуоресценции донорного флуоресцентного белка mNeonGreen в составе белка слияния гистона H2B с парой mNeonGreen-DiB1 в живых клетках HeLa Kyoto при добавлении различных хромофоров. Конечная концентрация - 3 мкМ, добавление через 1 минуту после начала съемки. Точки отражают среднее значение интенсивности флуоресценции (n=15).

Однако, проверка на обратимость связывания показала, что ни один из этих хромофоров не отмывается от липокалина за приемлемое время. Титрование не проводилось, но можно предположить, что хромофоры не вымываются из-за очень высокой аффинности.

Таким образом, в результате скрининга хромофоров с нитрогруппой ни один хромофор не был отобран для дальнейших экспериментов из-за необратимости связывания.

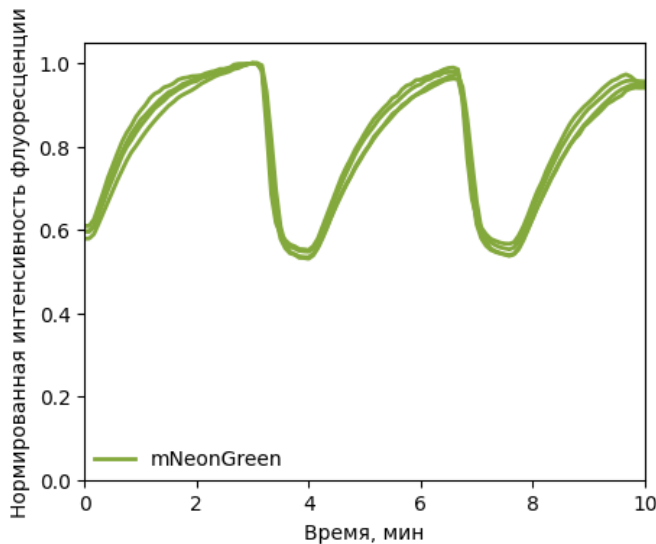
#### **4.6.2. Изучение белок-белковых взаимодействий с помощью FRET пары mNeonGreen-DiB1:mKa67.**

FRET пара mNeonGreen-DiB1 является модулируемой за счет нековалентного взаимодействия хромофора mKa67 с липокалином DiB1. Для того, чтобы продемонстрировать модулируемость FRET пары и обратимость активации акцептора мы провели эксперимент с попеременным добавлением хромофора и его отмывкой из клеточной среды. Ранее при однократном добавлении хромофора была получена эффективность FRET на уровне 45%.

Для этого была выбрана модель белка слияния гистона H2B с FRET парой, на которой до этого тестировали эффективность FRET в живых клетках. Была проведена временная трансфекция клеток HeLa Kyoto конструкцией H2B-mNeonGreen-DiB1 в специальном слайде для одновременной перфузии и микроскопии.

При использовании простой перфузионной системы со скоростью потока 120 мкл/мин наблюдалось практически полное вымывание хромофора mKa67 и восстановления флуоресценции донора mNeonGreen примерно за 4 минуты (Рисунок 40). Активация акцептора при добавлении mKa67 происходила с большей скоростью при той же скорости потока среды через клетки, интенсивность донора падала до минимума примерно за 1 минуту. Средняя эффективность FRET в повторяющихся циклах активации-деактивации акцептора составила около 45%, что соответствует ранее полученной эффективности FRET в живых клетках при однократном добавлении хромофора (Рисунок 37). По видимому, чтобы обеспечить быстрое и полное связывание хромофора с акцептором без ущерба для временного разрешения следует использовать хромофор mKa67 в избытке ( $3 \times K_d$  или более).

Таким образом, нами была подтверждена модулируемость акцептора на основе липокалина DiB1 и хромофора mKa67 и возможность многократно активировать и деактивировать акцептор в живых клетках.



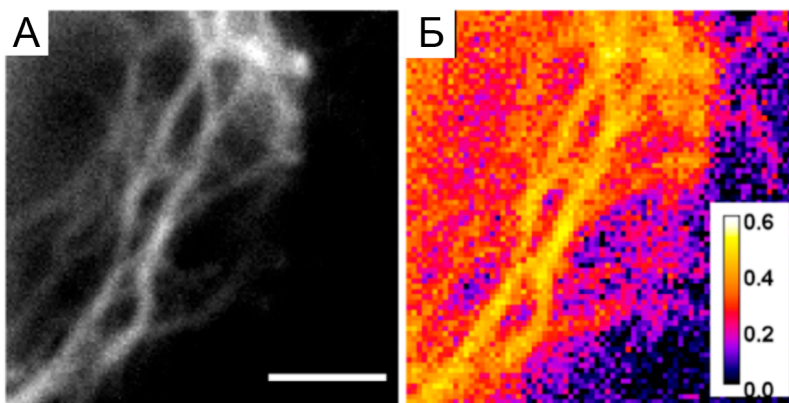
**Рисунок 40.** Обратимая активация FRET. Повторяющаяся активация и деактивация FRET в живых клетках HeLa Kyoto трансфицированных конструкцией, кодирующей белок слияния гистона H2B и пары mNeonGreen-DiB1. Зеленые кривые показывают средние интенсивности флуоресценции донора mNeonGreen в меченых ядрах HeLa Kyoto.

После тестирования свойств FRET пары mNeonGreen-DiB1 с хромофором mKa67 в *in vitro* и *in cellulo* условиях в составе фьюза, где перенос энергии изначально является ожидаемым, мы перешли к тестированию FRET пары в случае, когда донор и акцептор не связаны напрямую с помощью линкера.

В связи с этим необходимо было выбрать такую модель взаимодействия, в которой донор и акцептор не были бы связаны линкером, но при этом были на достаточном для переноса энергии расстоянии. Были выбраны две простые модели, удовлетворяющие этим условиям.

В качестве первой модели был выбран промежуточный филамент виментин. В одной конструкции виментин был помечен донором mNeonGreen, а в другой липокалином DiB1. С этими конструкциями была поставлена котрансфекция. Благодаря случайному включению меченого донором или акцептором виментина в филаменты, часто донор и акцептор будут оказываться рядом на достаточном для резонансного переноса энергии расстоянии. Для того, чтобы исключить движение и перестройку филаментов, этот эксперимент был

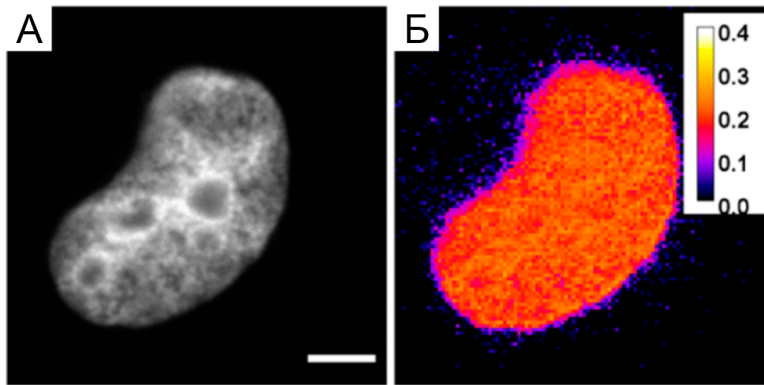
проведен на фиксированных клетках. В результате измерения эффективности FRET, было получено среднее значение равное 45% (Рисунок 41). Это наблюдение высокой эффективности хорошо согласуется с тем, что молекулы виментина плотно упакованы в филаменты (coiled-coils), образуя параллельные димеры [198], а С-концы, несущие DiB1 или mNeonGreen оказываются очень близко друг к другу.



**Рисунок 41.** Проверка эффективности FRET на моделях белок-белковых взаимодействий. Фиксированные клетки HeLa Kyoto, котрансфицированные двумя конструкциями, кодирующими vimentin-mNeonGreen и vimentin-DiB1. (А) Широкопольное изображение меченых волокон виментина в канале донора mNeonGreen; (Б) Изображение эффективности FRET в тех же волокнах виментина; Псевдоцвета отражают эффективность FRET после добавления 3 мкМ хромофора тка67. Масштабная линейка 3 мкм.

Второй моделью для тестирования FRET при белок-белковых взаимодействиях был выбран гистон H2B, так как хроматин плотно упакован и нуклеосомы находятся очень близко друг к другу [199]. Аналогично эксперименту с виментином, клетки были трансфицированы двумя конструкциями, кодирующими гистон H2B меченый mNeonGreen (донор FRET) и гистон H2B меченый DiB1 (акцептор FRET) (Рисунок 42). В этом эксперименте эффективность FRET не превышала 35%, а среднее значение составило около 21.5%. Что ниже, чем при тестировании FRET пары в составе

белка слияния (Рисунок 37).



**Рисунок 42.** Проверка эффективности FRET на моделях белок-белковых взаимодействий. Фиксированные клетки HeLa Kyoto, котрансфицированные двумя конструкциями, кодирующими H2B-mNeonGreen и H2B-DiB1. (А) Широкопольное изображение меченого ядра в канале донора mNeonGreen; (Б) Изображение эффективности FRET того же ядра; Псевдоцвета отражают эффективность FRET после добавления 3 мкМ хромофора mka67. Масштабная линейка 5 мкм.

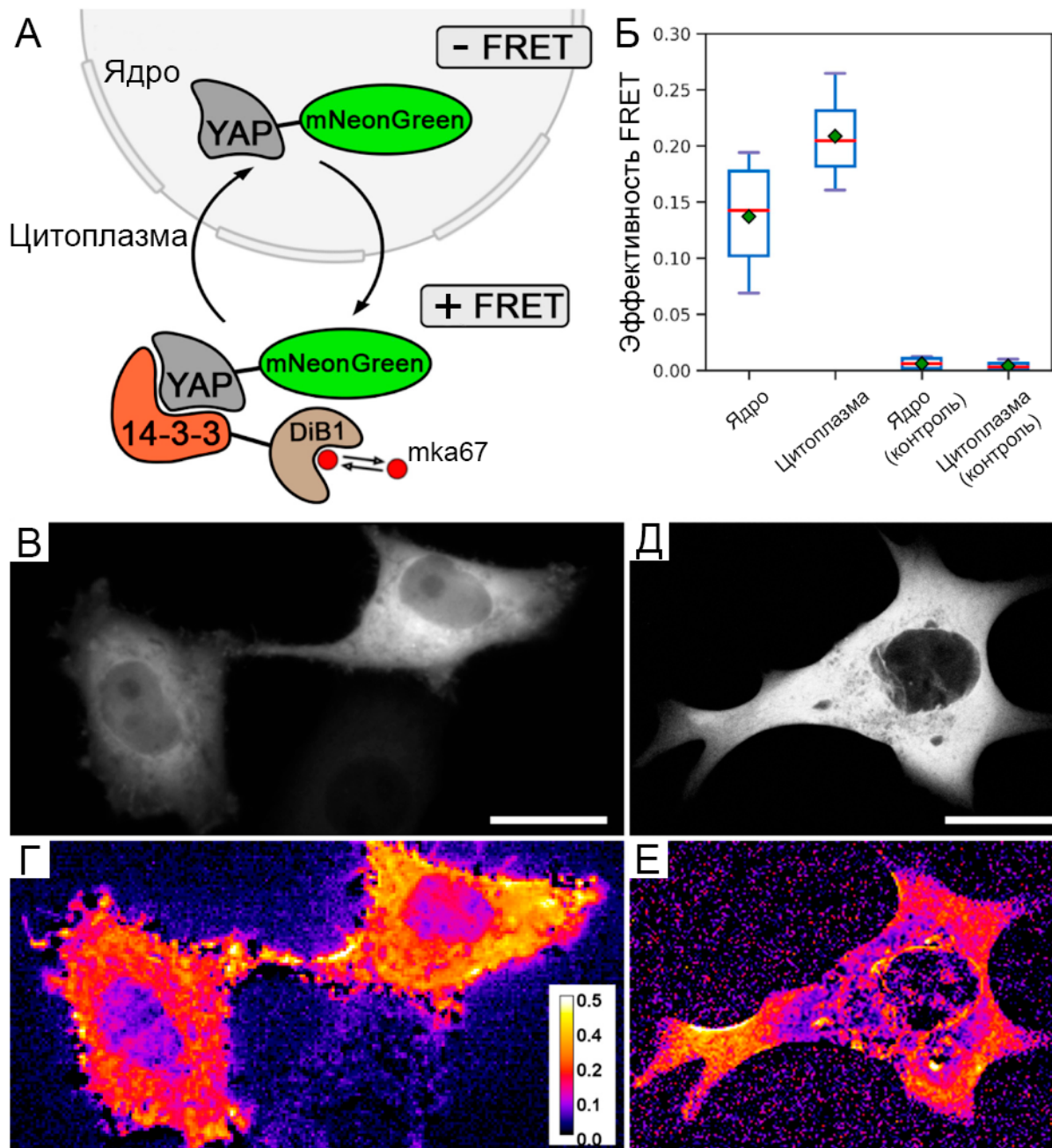
Таким образом, была показана возможность детектировать белок-белковые взаимодействия с помощью FRET пары mNeonGreen-DiB1 в условиях обычной флуоресцентной микроскопии по снижению интенсивности флуоресценции донора после активации акцептора.

После тестирования FRET пары на двух простых моделях было решено визуализировать взаимодействие белков 14-3-3 и YAP. Белок 14-3-3 интегрирован в фосфорегуляторные сигнальные пути [200], а белок YAP1 участвует в регуляции тканевого роста и является ключевым компонентом сигнального пути Hippo [201]. В литературе ранее было показано их взаимодействие и выявлены взаимодействующие домены [200]. Белок YAP1 интересен тем, что в ходе своего функционирования, в зависимости от уровня фосфорилирования, фазы клеточного цикла и некоторых других факторов он находится либо в цитоплазме, либо в ядре [202]. Другими словами в ходе

функционирования он транслоцируется в ядро и обратно. В свою очередь в ядре и цитоплазме у этого белка есть разные мишени для взаимодействия. Одной из таких мишеней является белок 14-3-3, который всегда находится в цитоплазме и связывается с YAP1 (Рисунок 43, А) [203]. Однако, с помощью FRET в условиях обычной флуоресцентной микроскопии взаимодействие 14-3-3 и YAP, по нашим данным, никто до сих пор не наблюдал.

Для визуализации взаимодействия белков 14-3-3 и YAP1 были созданы генно-инженерные конструкции, кодирующие белки слияния 14-3-3-DiB1 и YAP1-mNeonGreen. В живых клетках HeLa Kyoto наблюдалась преимущественно цитоплазматическая локализация YAP1, меченого флуоресцентным белком mNeonGreen. Ожидалось, что после добавления хромофора mka67 и активации акцептора эффективность FRET в цитоплазме будет выше, чем в ядре, за счет того, что целевое взаимодействие происходит именно в цитоплазме. Действительно, эффективность FRET оказалась выше в цитоплазме (Рисунок 43, Б). В контрольных экспериментах в отсутствие модулируемого акцептора DiB1 интенсивность mNeonGreen не изменялась при добавлении хромофора mka67, а ненулевая эффективность FRET в ядре на рисунке 43Г является сигналом от цитоплазмы ниже и выше ядра, поскольку этот кадр был получен при использовании широкопольной микроскопии.

Для подтверждения того, что FRET сигнал в ядре является следствием съемки в широкопольном режиме, мы провели тот же эксперимент в условиях конфокальной микроскопии, где фоновый сигнал из зон вне фокуса отсекается более эффективно (Рисунок 43, ДЕ). Мы не наблюдали какой-либо значимой эффективности FRET в ядре в случае конфокальной микроскопии, так как флуоресценция mNeonGreen в цитоплазме отсекалась.



**Рисунок 43.** 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 mka67. 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 mka67 (Панели Г и Е имеют один и тот же масштаб цветовой шкалы); масштабная линейка 20 мкм.

В результате данного эксперимента на модели HeLa Kyoto впервые в условиях флуоресцентной микроскопии было продемонстрировано взаимодействие YAP1 с 14-3-3 в цитоплазме живых клеток.

Таким образом, в результате скринингов *in vitro* и *in cellulo* всех собранных FRET пар с несколькими группами хромофоров, включая “яркие”, “темные” и хромофоры с нитрогруппой, была отобрана одна комбинация донора и акцептора, а именно mNeonGreen-DiB1:mka67. Также эта пара показала высокую эффективность FRET в живых клетках и была успешно протестирована на моделях белок-белковых взаимодействий.

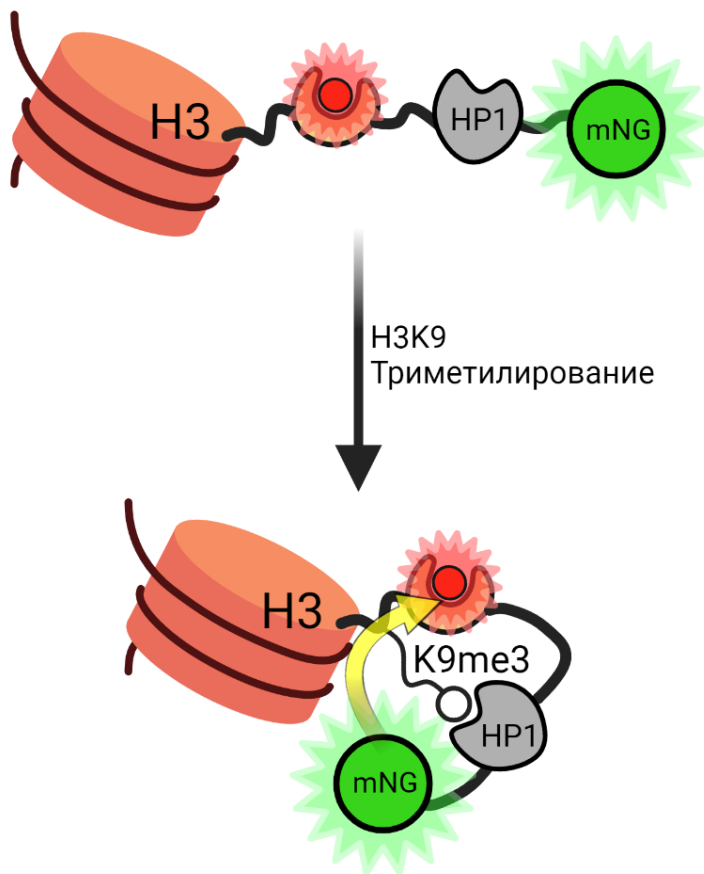
#### 4.6.3. Биосенсоры на основе FRET пары mNeonGreen-DiB1.

Далее было решено продемонстрировать возможность использования FRET пары mNeonGreen-DiB1:mka67 в составе биосенсоров. Для этого было создано два биосенсора: на триметилирование H3K9 и на натяжение в фокальных контактах клеток.

Эпигенетическая модификация H3K9me3, как правило, ассоциирована с гетерохроматином [204]. В 2018 году был создан FRET сенсор на эту модификацию [108]. Он представлял собой единый химерный белок, состоящий из гистона H3, флуоресцентного белка ECFP, сенсорного домена HP1, распознающего H3K9me3 модификацию и флуоресцентного белка YPet. В результате метилирования гистона H3 в составе данного сенсора, домен HP1

связывался с модифицированным участком, изменяя всю конфигурацию сенсора и сближая акцепторный флуоресцентный белок с донорным.

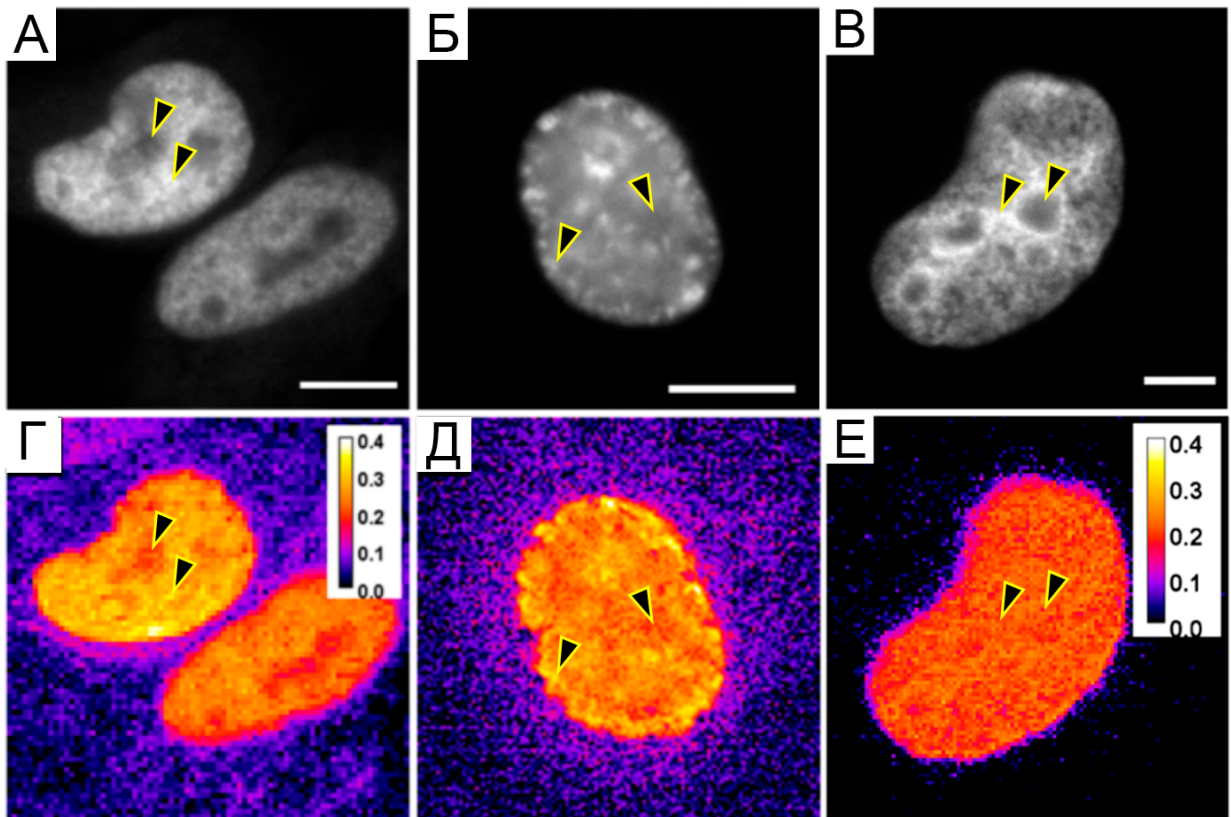
Схема данного сенсора была взята за основу для создания сенсора с FRET парой mNeonGreen-DiB1:mka67. Была создана аналогичная конструкция, в которой вместо ECFP и YPet были использованы липокалин DiB1 и флуоресцентный белок mNeonGreen (Рисунок 44).



**Рисунок 44.** Схема работы биосенсора на H3K9 триметилирование с FRET парой на основе донора mNeonGreen и акцептора липокалина DiB1 с хромофором mka67. Рисунок схематично показывает изменение пространственной конфигурации биосенсора при модификации гистона H3 и связывании модифицированного участка доменом HP1. Желтая стрелка демонстрирует перенос энергии с донора на акцептор.

Биосенсор на эпигенетическую модификацию H3K9me3 был протестирован в живых клетках HeLa Kyoto. В условиях широкопольной

микроскопии были сняты интерфазные ядра клеток трансфицированных конструкцией, кодирующей биосенсор (Рисунок 45, АБ).



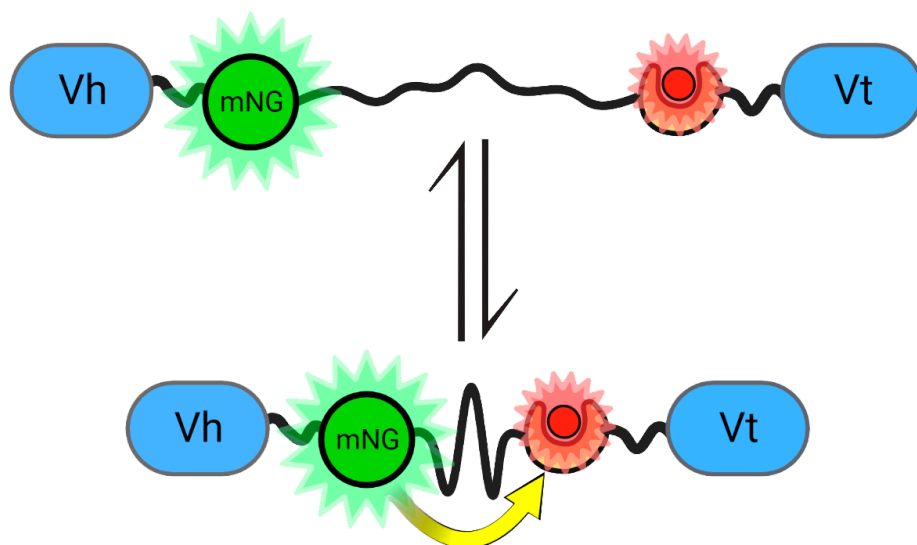
**Рисунок 45.** Тестирование биосенсора на H3K9 триметилирование в живых клетках HeLa Kyoto, временно трансфицированных конструкцией mNeonGreen-HP1-DiB1-H3. (А, Б) Широкопольные изображения живых клеток HeLa Kyoto, временно трансфицированных конструкцией, кодирующей H3K9me3 биосенсор. (В) Широкопольное изображение фиксированной клетки HeLa Kyoto с рисунка 42, котрансфицированной двумя конструкциями, кодирующими H2B-mNeonGreen и H2B-DiB1. (Г, Д, Е) Визуализация эффективности FRET в ядрах с панелей А, Б и В соответственно; Псевдоцвета отражают эффективность FRET после добавления 3 мкМ хромофора mKa67. Панели Г, Д и Е имеют один и тот же масштаб цветовой шкалы эффективности FRET. Стрелки демонстрируют участки ядер для сравнения соотношения интенсивности флуоресценции mNeonGreen и эффективности FRET.

В результате эффективность FRET была распределена по ядрам неравномерно, самая высокая эффективность наблюдалась в гетерохроматине (Рисунок 45, ГД). Такое распределение эффективности переноса энергии соответствует нашим ожиданиям, поскольку модификация H3K9me3 локализована в основном в гетерохроматине, который неоднородно распределен по всему ядру клетки и может образовывать разнообразные паттерны. В то же время, если сравнивать полученные изображения биосенсора с изображением меченых донором и акцептором нуклеосом, очевидно, что паттерн интенсивности флуоресценции mNeonGreen (Рисунок 45, В) не повторяется на изображении эффективности FRET (Рисунок 45, Г) в случае мечения нуклеосом.

Биосенсор на натяжение в фокальных контактах был создан на основе винкулина и гибкого длинного линкера по аналогии с ранее созданным механосенсором [205]. Особенность данного биосенсора состоит в том, что винкулин в его составе разделен на две части, Vh и Vt, которые находятся на концах сенсора. Часть винкулина Vh связывается с талином, а часть Vt связывается с F-актином и паксилином [206]. Между этими частями в оригинальном сенсоре находится флуоресцентный белок mTFP1 и флуоресцентный белок Venus. Между ними находится гибкий EV-линкер, который представляет собой повторы (GPGGA)<sub>8</sub> взятые из белка паучьего шелка [207]. Таким образом биосенсор с двумя частями винкулина встраивается в качестве промежуточного звена между волокнами актина и талином, который в свою очередь связан с интегрином. Соответственно, при клеточном движении и увеличении натяжения, молекулы биосенсора могут растягиваться за счет гибкого линкера, что приводит к отдалению донора от акцептора и уменьшению переноса энергии.

Клеточное движение и изменение натяжения в местах прикрепления клеток к поверхности представляет большой интерес. Именно поэтому данный биосенсор был выбран для демонстрации модулируемости акцептора DiB1 в динамическом FRET эксперименте. Флуоресцентные белки mTFP1 и Venus из

оригинального сенсора были заменены на донор mNeonGreen и акцептор DiB1 соответственно (Рисунок 46).

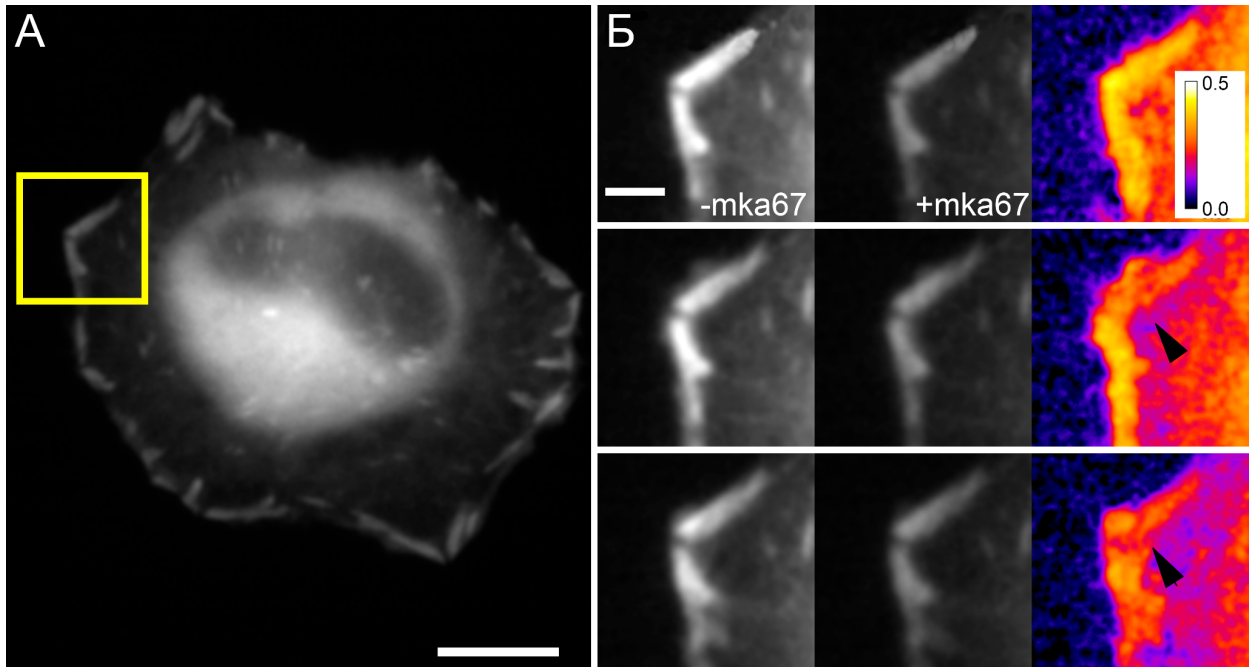


**Рисунок 46.** Схема работы биосенсора на натяжение с FRET парой на основе донора mNeonGreen и акцептора DiB1 с хромофором mka67. Vh и Vt - части винкулина. Рисунок схематично показывает изменение пространственной конфигурации биосенсора при увеличении и уменьшении натяжения. Желтая стрелка показывает перенос энергии с донора на акцептор.

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

Для съемки FRET в динамике трансфицированные нашим биосенсором HeLa Kyoto были пересажены в специальный слайд с каналом, имеющим вход и выход 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 делили друг на друга для визуализации 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 47). На панели Б рисунка 47 приведены кадры без и с хромофором mka67 и соответствующий им кадр эффективности FRET.



**Рисунок 47.** Генетически кодируемый механосенсор на основе модулируемого акцептора FRET. (А) 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 контактах, 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 них. Кадры получены с разницей во времени примерно 2 минуты. Таким образом, с помощью созданного биосенсора с модулируемым акцептором удалось

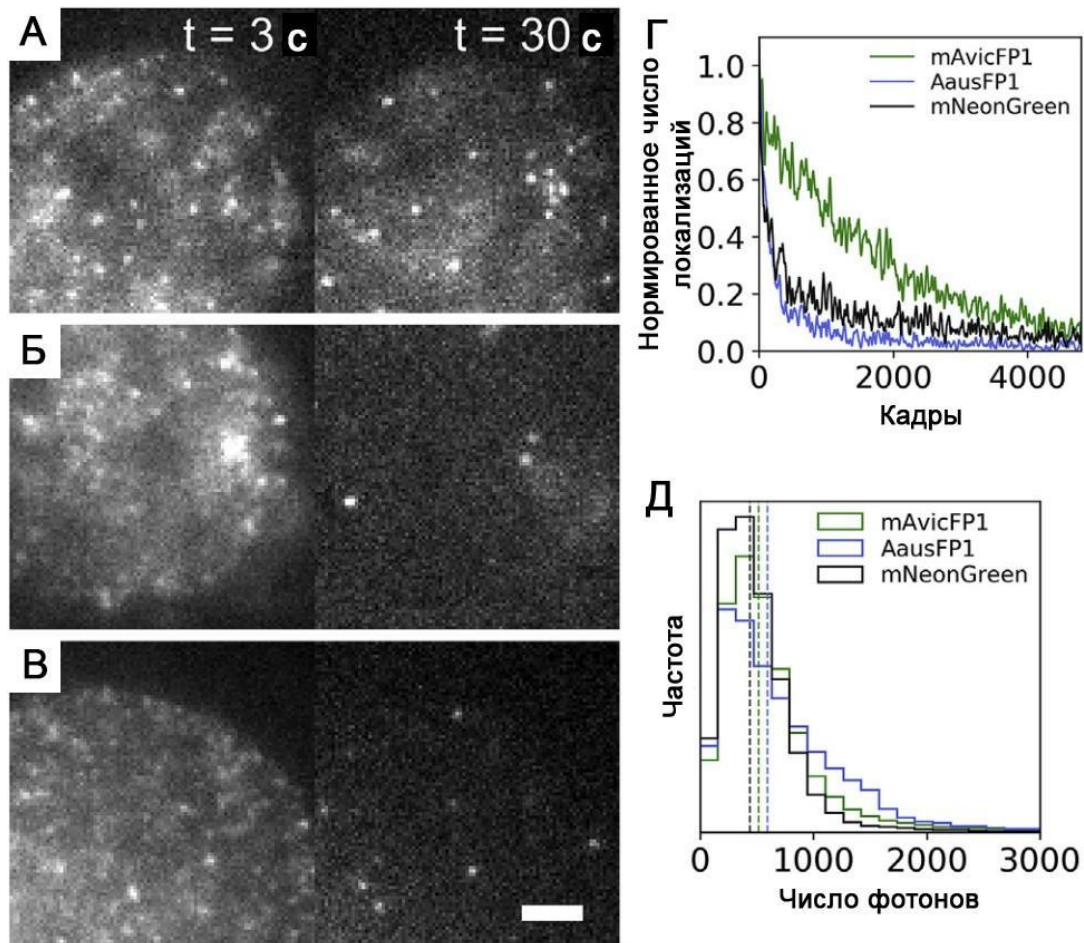
продемонстрировать изменение эффективности FRET и натяжения в фокальных контактах живой клетки в динамике с временным разрешением около 3 минут.

Эксперименты с биосенсорами и белок-белковыми взаимодействиями наглядно показывают, что FRET пара с модулируемым акцептором позволяет измерять эффективность переноса энергии, в то же время предоставляя возможность наблюдать динамику FRET.

#### **4.6.4. FRET с липокалином на уровне одиночных молекул. Поиск подходящих доноров.**

Белок mNeonGreen является одним из зеленых флуоресцентных белков, способных при мощном облучении возбуждающим светом переходить в долгоживущую нефлуоресцентную форму, которая спонтанно возвращается во флуоресцентное состояние [41,208]. В условиях локализационной микроскопии выглядеть это будет как вспышки флуоресценции, которые можно детектировать и локализовать с субдифракционным разрешением. Из этого следует, что непрерывные циклы связывания/диссоциации комплекса DiB1:mka67 вместе со спонтанным миганием mNeonGreen могут позволить детектировать FRET на уровне одиночных молекул. Перед проведением опытов мы решили попробовать расширить набор мигающих доноров, подходящих для такой детекции FRET.

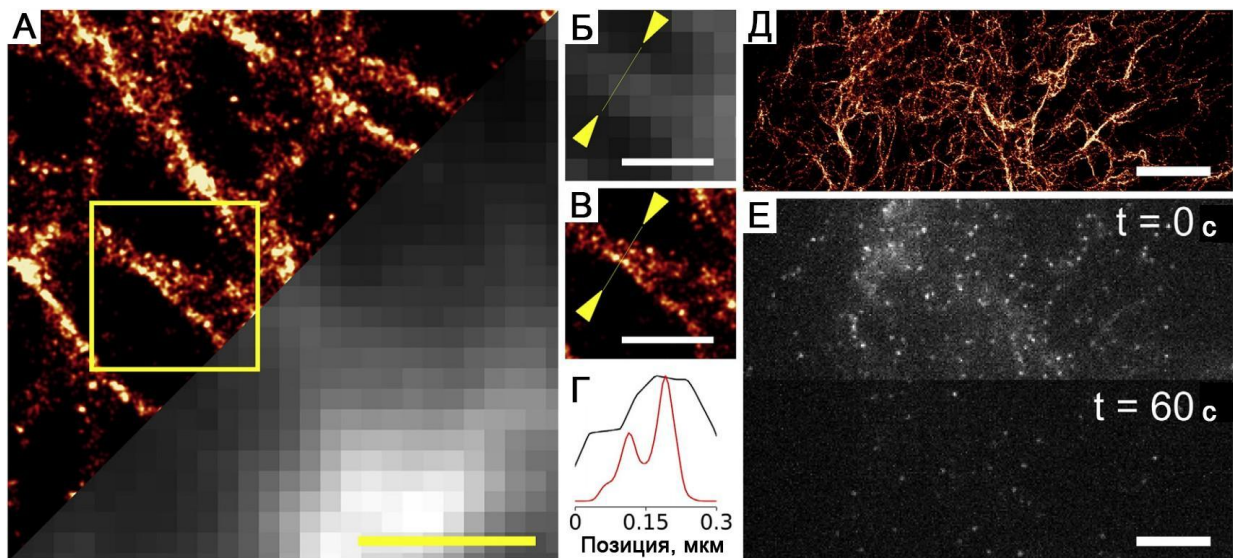
Было проведено тестирование недавно открытых зеленых флуоресцентных белков mAvicFP1 и AausFP1 [209]. Было показано, что новые флуоресцентные белки обладают большей яркостью на уровне одиночных молекул и большей стабильностью плотности локализаций на протяжении съемки по сравнению с белком mNeonGreen (Рисунок 48).



**Рисунок 48.** Сверхразрешающая микроскопия гистона H2B в живых клетках с использованием флуоресцентных белков mAvicFP1, AausFP1, и mNeonGreen. Индивидуальные кадры живых клеток HeLa Kyoto временно трансфицированных конструкциями H2B-mAvicFP1 (А), H2B-AausFP1 (Б), и H2B-mNeonGreen (В); масштабная линейка 2 мкм. (Г) Стабильность плотности локализация по ходу съемки в следующих условиях ( $1,5 \text{ кВт} \cdot \text{см}^{-2}$ , лазер 488 нм, выдержка 33 мс, 5000 кадров). На графике показано нормированное среднее число локализаций в кадре. (Д) Гистограмма числа фотонов за каждую вспышку флуоресценции; Вертикальные линии обозначают медианные значения количества фотонов. Адаптировано из [40].

Также удалось провести высокоскоростную съемку меченых волокон виментина. В результате съемки были реконструированы и разрешены волокна на расстоянии 100 нм друг от друга (Рисунок 49).





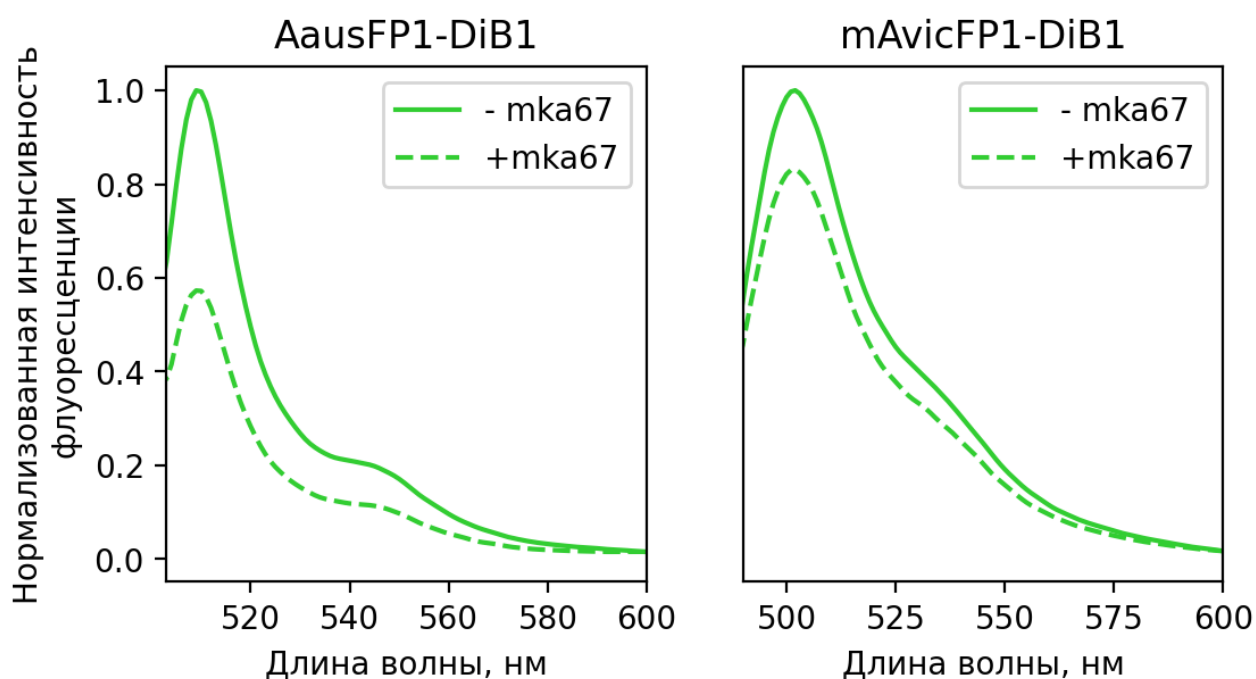
**Рисунок 49.** Локализационная микроскопия сверхвысокого разрешения живых клеток с использованием флуоресцентного белка mAvicFP1. Клетки HeLa Kyoto временно трансфицированы конструкцией виментин-mAvicFP1 и сняты при следующих условиях ( $0,8 \text{ кВт} \cdot \text{см}^{-2}$ , лазер 488 нм, выдержка 33 мс, 10,000 кадров) (А); масштабная линейка 1 мкм. Широкопольное изображение (Б) и сверхразрешенная реконструкция (В) по 10,000 кадров; масштабные линейки 0,3 мкм. (Г) Нормированные профили интенсивности флуоресценции взяты по желтым линиям на широкопольном и сверхразрешенном изображении (Б и В); черная кривая - широкопольное изображение; красная кривая - сверхразрешенное изображение. (Д) Высокоскоростная съемка при следующих условиях ( $6,1 \text{ кВт} \cdot \text{см}^{-2}$ , лазер 488 нм, выдержка 2 мс, 50,000 кадров). (Е) Индивидуальные кадры из высокоскоростной серии (Д); масштабные линейки 5 мкм. Адаптировано из [40].

Таким образом, два новых флуоресцентных белка mAvicFP1 и AausFP1 оказались потенциально применимы для FRET на уровне одиночных молекул. При этом их характеристики в условиях локализационной микроскопии превосходили характеристики флуоресцентного белка mNeonGreen.

На первом этапе применения новых белков как доноров FRET необходимо было понять, насколько высокую эффективность переноса энергии они показывают в паре с комплексом DiB1:mka67. Для этого были созданы

генно-инженерные конструкции для наработки и очистки белков слияния DiB1-mAvicFP1 и DiB1-AausFP1. Измерение эффективности проводилось аналогично описанному ранее, по падению флуоресценции донорного белка после активации акцептора при добавлении в раствор хромофора mka67.

Полученные значения эффективности резонансного переноса составили ~42.5% и ~16.9% для доноров AausFP1 и mAvicFP1 соответственно (Рисунок 50). Эти показатели значительно уступают показателю эффективности FRET *in vitro* в паре с флуоресцентным белком mNeonGreen (~60%).



**Рисунок 50.** Спектры эмиссии флуоресцентных белков AausFP1 и mAvicFP1 в составе FRET пары с DiB1 до (сплошная линия) и после (прерывистая линия) активации акцептора путем добавления в раствор хромофора mka67 до конечной концентрации 2 мкМ.

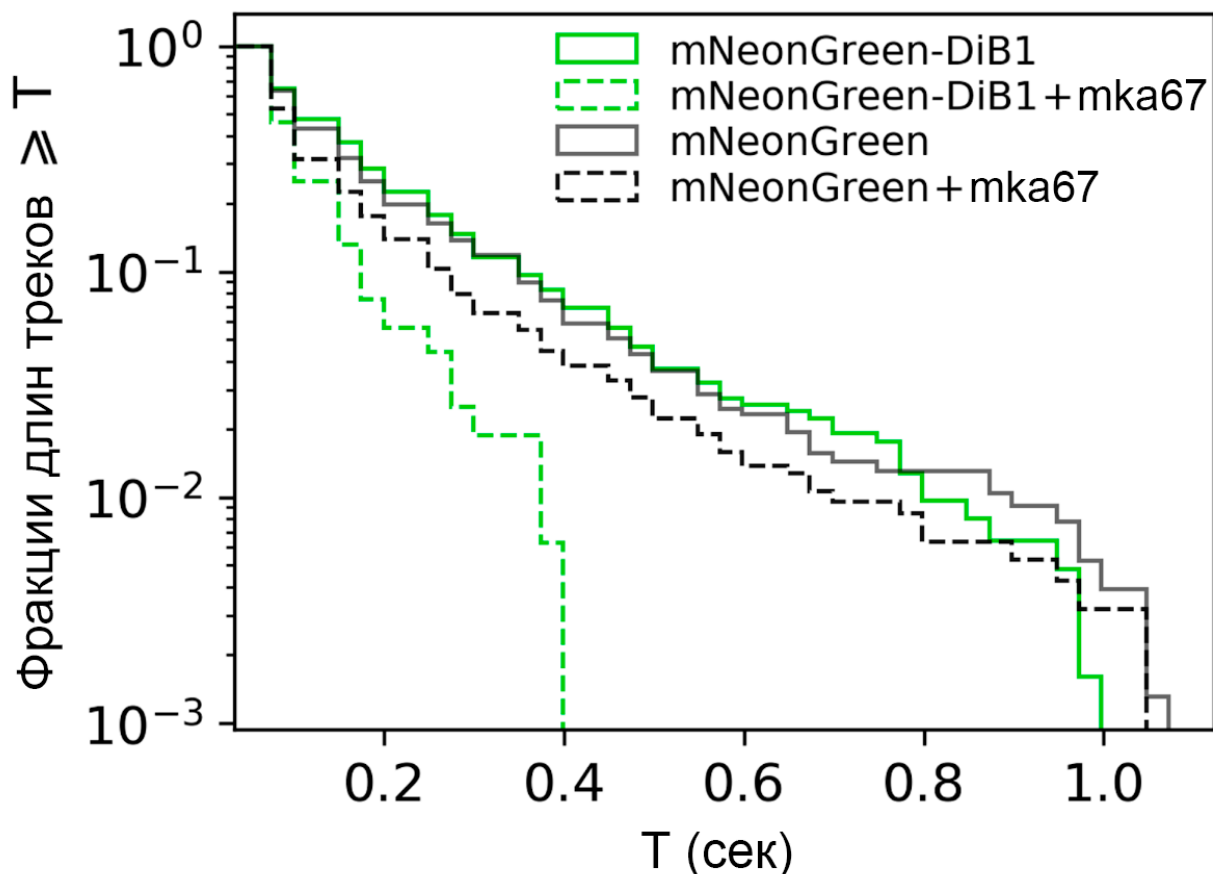
За счет того, что FRET пара с белком mNeonGreen в качестве донора обладает большей максимальной эффективностью FRET, для дальнейших экспериментов с измерением переноса на уровне одиночных молекул была выбрана именно эта пара. Может показаться, что лучшие характеристики в условиях локализационной микроскопии белков mAvicFP1 и AausFP1 дают большее преимущество, чем большая эффективность FRET. Однако, именно

большой динамический диапазон возможного изменения интенсивности вспышек донора может обеспечить больше шансов детектировать события переноса энергии в условиях локализационной микроскопии.

#### **4.6.5. FRET с липокалином на уровне одиночных молекул.**

В качестве модельной системы для проверки FRET пары mNeonGreen-DiB1 с хромофором mKa67 в условиях локализационной микроскопии и детекции FRET на уровне одиночных молекул мы взяли белок слияния этой FRET пары с гистоном H2B. Гистон H2B было решено взять из-за низкой скорости обмена в заданном масштабе времени [210]. Это позволяет гарантировать, что большинство локализаций, детектируемых в ходе эксперимента, соответствуют одному и тому же набору молекулярных эмиттеров даже при том, что эксперимент проводится на живых клетках.

Схема эксперимента выглядела следующим образом - снимали 5000 кадров в канале донора при облучении лазером 488 нм при мощности, достаточной для получения вспышек флуоресценции mNeonGreen. Первая 1000 кадров снималась без хромофора mKa67 в среде, затем, не прерывая съемку в среду добавляли mKa67 до конечной концентрации 3 мкМ. В данном эксперименте анализировали длительность наблюдения одних и тех же (смещение не более 10 нм за кадр) локализаций между кадрами. В соответствии с ожиданиями, аналогично классическим экспериментам по smFRET [211], после добавления в среду mKa67 и активации акцептора наблюдалось значительное сокращение фракции длинных треков (Рисунок 51, зеленые кривые). Треки длиной более 0.4 секунды полностью исчезли. В качестве дополнительного контроля такой же эксперимент был проведен с конструкцией H2B-mNeonGreen без акцептора. После добавления в среду с клетками, трансфицированными этой конструкцией, изменение длин треков не наблюдалось (Рисунок 51, черные кривые).



**Рисунок 51.** Кумулятивное распределение длин треков (времен жизни каждой вспышки) для конструкций H2B-mNeonGreen и H2B-mNeonGreen-DiB1 снятых в одинаковых условиях (0.5 кВт\*см<sup>-2</sup> 488 нм лазер, 33 мс выдержка, 5000 кадров). Зеленые линии показывают фракции длин треков, полученных из вспышек молекул mNeonGreen в качестве части конструкции с акцептором DiB1 до (непрерывная линия) и после (пунктирная линия) добавления на тысячном кадре mka67 до конечной концентрации 3 мкМ. Черные линии показывают фракции длин треков, полученных из вспышек молекул mNeonGreen как части конструкции без акцептора H2B-mNeonGreen до (непрерывная линия) и после (пунктирная линия) добавления на тысячном кадре mka67 до конечной концентрации 3 мкМ.

Данный эксперимент основан на анализе ансамбля молекул и все еще не дает пространственных данных о переносе энергии для каждой отдельной молекулы донора, что не позволяет делать выводы о реальном применении пары

mNeonGreen-DiB1 в smFRET микроскопии.

Однако, эти результаты являются важной отправной точкой для дальнейшего изучения применения модулируемых акцепторов на основе липокалинов и синтетических хромофоров в smFRET микроскопии.

## **Заключение.**

В настоящее время существует огромное количество разнообразных репортерных систем для визуализации внутриклеточных структур, белок-белковых взаимодействий и различных внутриклеточных активностей. Однако, многие молекулярные инструменты и методы являются довольно специфическими и не всегда удобны для широкого применения. Например, в локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения отсутствует эффективная система мечения, которая была бы генетически-кодируемой и могла бы применяться в живых клетках без специальных бескислородных буферов и большой мощности облучения. Система мечения на основе липокалинов и синтетических аналогов хромофора GFP вполне может считаться успешной в данной нише, а в своем классе обратимых флуороген-активирующих белков является одной из лучших. Высокая яркость на уровне одиночных молекул обеспечивает высокую точность определения локализаций. Последнее поколение липокалинов обладает высокой стабильностью плотности локализаций и позволяет проводить длительные съемки, давая реконструкции сверхразрешенных структур в динамике с высоким временным разрешением, а также проводить съемку двух меченых структур в живой клетке одновременно.

Обратимое связывание хромофора также делает эту систему мечения применимой в качестве модулируемого акцептора FRET. В свою очередь это позволяет проводить FRET эксперименты в условиях широкопольной микроскопии, имея при этом по сути преимущества микроскопии времени жизни флуоресценции. В условиях флуоресцентной микроскопии оценка FRET проводится по сигналу донора до и после добавления в среду хромофора и

активации акцептора. Такая схема эксперимента позволяет измерить эффективность переноса энергии без фотообесцвечивания или фотоконверсии акцептора FRET. Нами был создан биосенсор на НЗК9 триметилирование, а также впервые в условиях флуоресцентной микроскопии с использованием FRET было продемонстрировано взаимодействие белков YAP1 и 14-3-3. В свою очередь многократные циклы добавления и отмывки хромофора дают информацию о эффективности переноса во времени. Другими словами, с использованием системы липокалин-хромофор в качестве модулируемого акцептора, можно не только визуализировать белок-белковые взаимодействия, но и наблюдать их на протяжении времени. Подобным образом нам удалось визуализировать изменение натяжения в фокальных контактах живых клеток с помощью механосенсора на основе винкулина.

В конечном итоге, система мечения на основе липокалина и синтетических хромофоров занимает сразу две довольно интересные и перспективные ниши, а именно локализационную микроскопию сверхвысокого разрешения в живых клетках и доступные и простые FRET эксперименты с возможностью наблюдения динамики внутриклеточных процессов.

## **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 липоклинов в случаях, когда размер молекулярной метки влияет на функционирование меченного белка.
4. Создан модулируемый акцептор FRET на основе липокалина DiB1 и хромофора mka67, 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 литературы.

1. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962. Vol. 59. P. 223–239.
2. Morise H. et al. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea* // *Biochemistry.* 1974. Vol. 13, № 12. P. 2656–2662.
3. Chalfie M. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // *Science.* 1994. Vol. 263, № 5148. P. 802–805.
4. Chudakov D.M. et al. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues // *Physiological Reviews.* 2010. Vol. 90, № 3. P. 1103–1163.
5. Haddock S.H.D., Mastroianni N., Christianson L.M. A photoactivatable green-fluorescent protein from the phylum Ctenophora // *Proc. Biol. Sci.* 2015. Vol. 282, № 1812. P. 20151055.
6. Deheyn D.D. et al. Endogenous green fluorescent protein (GFP) in amphioxus // *Biol. Bull.* 2007. Vol. 213, № 2. P. 95–100.
7. Gross L.A. et al. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Vol. 97, № 22. P. 11990–11995.
8. Mizuno H. et al. Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein // *Mol. Cell.* 2003. Vol. 12, № 4. P. 1051–1058.
9. Evdokimov A.G. et al. Structural basis for the fast maturation of Arthropoda green fluorescent protein // *EMBO Rep.* 2006. Vol. 7, № 10. P. 1006–1012.
10. Ward W.W., Bokman S.H. Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein // *Biochemistry.* 1982. Vol. 21, № 19. P. 4535–4540.
11. Weissleder R. A clearer vision for in vivo imaging // *Nature biotechnology.* 2001. Vol. 19, № 4. P. 316–317.
12. Morozova K.S. et al. Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy // *Biophys. J.* 2010. Vol. 99, № 2. P. L13–L15.
13. Piatkevich K.D. et al. Extended Stokes shift in fluorescent proteins: chromophore-protein interactions in a near-infrared TagRFP675 variant // *Sci. Rep.* 2013. Vol. 3. P. 1847.
14. Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V. Chromophore chemistry of fluorescent proteins controlled by light // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2014. Vol. 20. P. 60–68.
15. Rockwell N.C., Lagarias J.C. A brief history of phytochromes // *Chemphyschem.* 2010. Vol. 11, № 6. P. 1172–1180.
16. Giraud E., Verméglio A. Bacteriophytochromes in anoxygenic photosynthetic bacteria // *Photosynth. Res.* 2008. Vol. 97, № 2. P. 141–153.
17. Auldrige M.E., Forest K.T. Bacterial phytochromes: more than meets the light // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2011. Vol. 46, № 1. P. 67–88.
18. Piatkevich K.D., Subach F.V., Verkhusha V.V. Engineering of bacterial



- phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42, № 8. P. 3441–3452.
19. Chapman S. et al. The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 50. P. 20038–20043.
  20. Drepper T. et al. Reporter proteins for in vivo fluorescence without oxygen // *Nature Biotechnology.* 2007. Vol. 25, № 4. P. 443–445.
  21. Los G.V. et al. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis // *ACS Chem. Biol.* 2008. Vol. 3, № 6. P. 373–382.
  22. Benink H.A., Urh M. HaloTag technology for specific and covalent labeling of fusion proteins // *Methods Mol. Biol.* 2015. Vol. 1266. P. 119–128.
  23. Hori Y. et al. Development of fluorogenic probes for quick no-wash live-cell imaging of intracellular proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. Vol. 135, № 33. P. 12360–12365.
  24. Kumar N. et al. Rapid no-wash labeling of PYP-tag proteins with reactive fluorogenic ligands affords stable fluorescent protein conjugates for long-term cell imaging studies // *Chem. Sci.* 2020. Vol. 11, № 14. P. 3694–3701.
  25. Liu T.-K. et al. A Rapid SNAP-Tag Fluorogenic Probe Based on an Environment-Sensitive Fluorophore for No-Wash Live Cell Imaging // *ACS Chemical Biology.* 2014. Vol. 9, № 10. P. 2359–2365.
  26. Cole N.B. Site-specific protein labeling with SNAP-tags // *Curr. Protoc. Protein Sci.* 2013. Vol. 73. P. 30.1.1–30.1.16.
  27. Gatzogiannis E. et al. Mapping protein-specific micro-environments in live cells by fluorescence lifetime imaging of a hybrid genetic-chemical molecular rotor tag // *Chem. Commun.* . 2012. Vol. 48, № 69. P. 8694–8696.
  28. Jing C., Cornish V.W. A fluorogenic TMP-tag for high signal-to-background intracellular live cell imaging // *ACS Chem. Biol.* 2013. Vol. 8, № 8. P. 1704–1712.
  29. Chen Z. et al. Second-generation covalent TMP-tag for live cell imaging // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, № 33. P. 13692–13699.
  30. Abbe E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung // *Archiv für Mikroskopische Anatomie.* 1873. Vol. 9, № 1. P. 413–468.
  31. The “Encyclopædia Britannica” // *Nature.* 1888. Vol. 39, № 999. P. 169–170.
  32. Dijkstra R.M. Design and realization of a CW-STEDsuper-resolution microscope setup / ed. Niels Zijlstra C.B. 2012.
  33. Kotel’nikov V.A. On the transmission capacity of “ether” and wire in electric communications // *Uspekhi Fizicheskikh Nauk.* 2006. Vol. 176, № 7. P. 762.
  34. Nyquist H. Certain topics in telegraph transmission theory // *Proceedings of the IEEE.* 2002. Vol. 90, № 2. P. 280–305.
  35. Website [Electronic resource]. URL: <https://doi.org/10.1126/science.1127344>.
  36. Bates M. et al. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes // *Science.* 2007. Vol. 317, № 5845. P. 1749–1753.
  37. Rust M.J., Bates M., Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) // *Nat. Methods.* 2006. Vol. 3, № 10. P. 793–795.

38. Jungmann R. et al. Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT // *Nat. Methods*. 2014. Vol. 11, № 3. P. 313–318.
39. Schnitzbauer J. et al. Super-resolution microscopy with DNA-PAINT // *Nature Protocols*. 2017. Vol. 12, № 6. P. 1198–1228.
40. 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.
41. Shaner N.C. et al. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum* // *Nat. Methods*. 2013. Vol. 10, № 5. P. 407–409.
42. Huang F. et al. Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms // *Nature Methods*. 2013. Vol. 10, № 7. P. 653–658.
43. Bücherl C. et al. Probing protein-protein Interactions with FRET-FLIM // *Methods Mol. Biol.* 2010. Vol. 655. P. 389–399.
44. Wallrabe H., Periasamy A. Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy // *Current Opinion in Biotechnology*. 2005. Vol. 16, № 1. P. 19–27.
45. Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. FRET imaging // *Nat. Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2003. Vol. 21, № 11. P. 1387–1395.
46. Holub O. et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy of *Chlamydomonas reinhardtii*: non-photochemical quenching mutants and the effect of photosynthetic inhibitors on the slow chlorophyll fluorescence transient // *J. Microsc.* 2007. Vol. 226, № Pt 2. P. 90–120.
47. Weihs F. et al. Resonance Energy Transfer-Based Biosensors for Point-of-Need Diagnosis-Progress and Perspectives // *Sensors* . 2021. Vol. 21, № 2.
48. Park J.C. et al. Subnanomolar FRET-Based DNA Assay Using Thermally Stable Phosphorothioated DNA-Functionalized Quantum Dots // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. Vol. 11, № 37. P. 33525–33534.
49. Ha T. Single-molecule fluorescence methods for the study of nucleic acids // *Current Opinion in Structural Biology*. 2001. Vol. 11, № 3. P. 287–292.
50. Buehler C., Stoeckli K., Auer M. The Integration of Single Molecule Detection Technologies into Miniaturized Drug Screening: Current Status and Future Perspectives // *New Trends in Fluorescence Spectroscopy*. 2001. P. 331–379.
51. Kay T.M. et al. Molecular Brightness Approach for FRET Analysis of Donor-Linker-Acceptor Constructs at the Single Molecule Level: A Concept // *Front. Mol. Biosci. Frontiers*, 2021. Vol. 0.
52. Miyawaki A., Tsien R.Y. Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein // *Methods Enzymol.* 2000. Vol. 327. P. 472–500.
53. Knowles R.B. et al. Demonstration by fluorescence resonance energy transfer of a close association between activated MAP kinase and neurofibrillary tangles: implications for MAP kinase activation in Alzheimer disease // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1999. Vol. 58, № 10. P. 1090–1098.
54. Majumdar Z.K. et al. Measurements of internal distance changes of the 30S ribosome using FRET with multiple donor-acceptor pairs: quantitative

- spectroscopic methods // *J. Mol. Biol.* 2005. Vol. 351, № 5. P. 1123–1145.
55. Lakowicz J.R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer Science & Business Media, 2013. 698 p.
  56. Carlo G. über Entstehung wahrer Lichtabsorption und scheinbare Koppelung von Quantensprüngen // *Zeitschrift für Physik*. 1922. Vol. 10, № 1. P. 185–199.
  57. Cario G., Franck J. über Zerlegung von Wasserstoffmolekülen durch angeregte Quecksilberatome // *Zeitschrift für Physik*. 1922. Vol. 11, № 1. P. 161–166.
  58. Perrin J. Fluorescence et induction moléculaire par résonance // *C. R. Acad. Sci.* . 1927.
  59. Perrin F. Théorie quantique des transferts d'activation entre molécules de même espèce. Cas des solutions fluorescentes // *Annales de Physique*. 1932. Vol. 10, № 17. P. 283–314.
  60. Perrin F. Interaction entre atomes normal et activ'e. Transferts d'activation. Formation d'une molécule active. 1933. P. 279–318.
  61. Kallmann H., London F. Quantenmechanische Theorie der anomal großen Wirkungsquerschnitte bei der Energieübertragung zwischen atomaren Systemen // *Die Naturwissenschaften*. 1929. Vol. 17, № 14. P. 226–227.
  62. Förster T. Energiewanderung und Fluoreszenz // *Die Naturwissenschaften*. 1946. Vol. 33, № 6. P. 166–175.
  63. Förster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz // *Annalen der Physik*. 1948. Vol. 437, № 1-2. P. 55–75.
  64. Latt S.A., Cheung H.T., Blout E.R. ENERGY TRANSFER. A SYSTEM WITH RELATIVELY FIXED DONOR-ACCEPTOR SEPARATION // *J. Am. Chem. Soc.* 1965. Vol. 87. P. 995–1003.
  65. Stryer L., Haugland R.P. Energy transfer: a spectroscopic ruler // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1967. Vol. 58, № 2. P. 719–726.
  66. Stryer L. Fluorescence Energy Transfer as a Spectroscopic Ruler // *Annual Review of Biochemistry*. 1978. Vol. 47, № 1. P. 819–846.
  67. Sahoo H. Förster resonance energy transfer – A spectroscopic nanoruler: Principle and applications // *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*. 2011. Vol. 12, № 1. P. 20–30.
  68. Dexter D.L. A Theory of Sensitized Luminescence in Solids // *The Journal of Chemical Physics*. 1953. Vol. 21, № 5. P. 836–850.
  69. Kobashi H., Morita T., Mataga N. Influence of triplet—triplet excitation transfer on the decay function of donor luminescence // *Chemical Physics Letters*. 1973. Vol. 20, № 4. P. 376–378.
  70. Speiser S., Hassoon S., Rubin M.B. The mechanism of short-range intramolecular electronic energy transfer in bichromophoric molecules. 2. Triplet-triplet transfer // *The Journal of Physical Chemistry*. 1986. Vol. 90, № 21. P. 5085–5089.
  71. Förster T. *Fluoreszenz Organischer Verbindungen*. 1951.
  72. Masters B.R. Paths to Förster's resonance energy transfer (FRET) theory // *The European Physical Journal H*. 2014. Vol. 39, № 1. P. 87–139.
  73. Dale R.E., Eisinger J., Blumberg W.E. The orientational freedom of molecular probes. The orientation factor in intramolecular energy transfer // *Biophys. J.* 1979. Vol. 26, № 2. P. 161–193.

74. Datta R. et al. Fluorescence lifetime imaging microscopy: fundamentals and advances in instrumentation, analysis, and applications // *Journal of Biomedical Optics*. 2020. Vol. 25, № 07. P. 1.
75. Becker W. Fluorescence lifetime imaging - techniques and applications // *Journal of Microscopy*. 2012. Vol. 247, № 2. P. 119–136.
76. Marcu L., French P.M.W., Elson D.S. *Fluorescence Lifetime Spectroscopy and Imaging: Principles and Applications in Biomedical Diagnostics*. CRC Press, 2014. 570 p.
77. Verveer P.J., Hanley Q.S. Chapter 2 Frequency domain FLIM theory, instrumentation, and data analysis // *FRET and Flim Techniques*. 2009. P. 59–94.
78. Woehler A., Wlodarczyk J., Neher E. Signal/noise analysis of FRET-based sensors // *Biophys. J.* 2010. Vol. 99, № 7. P. 2344–2354.
79. Roszik J., Szöllosi J., Vereb G. AccPbFRET: an ImageJ plugin for semi-automatic, fully corrected analysis of acceptor photobleaching FRET images // *BMC Bioinformatics*. 2008. Vol. 9. P. 346.
80. Zeug A. et al. Quantitative Intensity-Based FRET Approaches—A Comparative Snapshot // *Biophysical Journal*. 2012. Vol. 103, № 9. P. 1821–1827.
81. Malkani N., Schmid J.A. Some secrets of fluorescent proteins: distinct bleaching in various mounting fluids and photoactivation of cyan fluorescent proteins at YFP-excitation // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 4. P. e18586.
82. Kirber M.T., Chen K., Keaney J.F. Jr. YFP photoconversion revisited: confirmation of the CFP-like species // *Nat. Methods*. 2007. Vol. 4, № 10. P. 767–768.
83. Kaminski C.F., Rees E.J., Schierle G.S.K. A quantitative protocol for intensity-based live cell FRET imaging // *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol. 1076. P. 445–454.
84. Szalóki N. et al. High throughput FRET analysis of protein-protein interactions by slide-based imaging laser scanning cytometry // *Cytometry Part A*. 2013. Vol. 83, № 9. P. 818–829.
85. Ujlaky-Nagy L. et al. Flow Cytometric FRET Analysis of Protein Interactions // *Methods Mol. Biol.* 2018. Vol. 1678. P. 393–419.
86. Szöllösi J., Vereb G., Nagy P. The flow of events: How the sequence of molecular interactions is seen by the latest, user-friendly high throughput flow cytometric FRET // *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2016. Vol. 89, № 10. P. 881–885.
87. Hochreiter B. et al. Advanced FRET normalization allows quantitative analysis of protein interactions including stoichiometries and relative affinities in living cells // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 8233.
88. Hoc A P.G. Calibration of fluorescence resonance energy transfer in microscopy using genetically engineered GFP derivatives on nickel chelating beads // *Biotechnol. Alia*. P. 1997.
89. Xia Z., Liu Y. Reliable and Global Measurement of Fluorescence Resonance Energy Transfer Using Fluorescence Microscopes // *Biophysical Journal*. 2001. Vol. 81, № 4. P. 2395–2402.
90. Gordon G.W. et al. Quantitative Fluorescence Resonance Energy Transfer Measurements Using Fluorescence Microscopy // *Biophysical Journal*. 1998. Vol.

- 74, № 5. P. 2702–2713.
91. Subach F.V. et al. Red fluorescent protein with reversibly photoswitchable absorbance for photochromic FRET // *Chem. Biol.* 2010. Vol. 17, № 7. P. 745–755.
  92. Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2 // *Nat. Protoc.* 2007. Vol. 2, № 8. P. 2024–2032.
  93. Subach O.M. et al. A FRET-facilitated photoswitching using an orange fluorescent protein with the fast photoconversion kinetics // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, № 36. P. 14789–14799.
  94. Hochreiter B., Garcia A.P., Schmid J.A. Fluorescent proteins as genetically encoded FRET biosensors in life sciences // *Sensors* . 2015. Vol. 15, № 10. P. 26281–26314.
  95. Plochowitz A., Crawford R., Kapanidis A.N. Characterization of organic fluorophores for in vivo FRET studies based on electroporated molecules // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014. Vol. 16, № 25. P. 12688–12694.
  96. Boeneman K. et al. Quantum dots and fluorescent protein FRET-based biosensors // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2012. Vol. 733. P. 63–74.
  97. McGrath N., Barroso M. Quantum dots as fluorescence resonance energy transfer donors in cells // *Journal of Biomedical Optics.* 2008. Vol. 13, № 3. P. 031210.
  98. Bajar B.T. et al. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs // *Sensors* . 2016. Vol. 16, № 9.
  99. Shimozone S., Miyawaki A. Engineering FRET constructs using CFP and YFP // *Methods Cell Biol.* 2008. Vol. 85. P. 381–393.
  100. Ouyang M. et al. Determination of hierarchical relationship of Src and Rac at subcellular locations with FRET biosensors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2008. Vol. 105, № 38. P. 14353–14358.
  101. Seong J. et al. Visualization of Src activity at different compartments of the plasma membrane by FRET imaging // *Chem. Biol.* 2009. Vol. 16, № 1. P. 48–57.
  102. McCulloch T.W., MacLean D.M., Kammermeier P.J. Comparing the performance of mScarlet-I, mRuby3, and mCherry as FRET acceptors for mNeonGreen // *PLoS One.* 2020. Vol. 15, № 2. P. e0219886.
  103. Zlobovskaya O.A., Sarkisyan K.S., Lukyanov K.A. [Infrared Fluorescent Protein iRFP as an Acceptor for Förster Resonance Energy Transfer] // *Bioorg. Khim.* 2015. Vol. 41, № 3. P. 299–304.
  104. Liu L. et al. Application of FRET Biosensors in Mechanobiology and Mechanopharmacological Screening // *Front Bioeng Biotechnol.* 2020. Vol. 8. P. 595497.
  105. Aoki K. et al. Stable expression of FRET biosensors: a new light in cancer research // *Cancer Sci.* 2012. Vol. 103, № 4. P. 614–619.
  106. Wang Y., Wang N. FRET and mechanobiology // *Integrative Biology.* 2009. Vol. 1, № 10. P. 565–573.
  107. Grashoff C. et al. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics // *Nature.* 2010. Vol. 466, № 7303. P. 263–266.
  108. Peng Q. et al. Coordinated histone modifications and chromatin reorganization in a single cell revealed by FRET biosensors // *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences. 2018. Vol. 115, № 50.
109. Margineanu A. et al. Corrigendum: Screening for protein-protein interactions using Förster resonance energy transfer (FRET) and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 33621.
  110. Kenworthy A.K. Imaging Protein-Protein Interactions Using Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscopy // *Methods.* 2001. Vol. 24, № 3. P. 289–296.
  111. Rainey K.H., Patterson G.H. Photoswitching FRET to monitor protein–protein interactions // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2019. Vol. 116, № 3. P. 864–873.
  112. Breuzard G. et al. Molecular mechanisms of Tau binding to microtubules and its role in microtubule dynamics in live cells // *J. Cell Sci.* 2013. Vol. 126, № Pt 13. P. 2810–2819.
  113. Yoo J. et al. Three-Color Single-Molecule FRET and Fluorescence Lifetime Analysis of Fast Protein Folding // *The Journal of Physical Chemistry B.* 2018. Vol. 122, № 49. P. 11702–11720.
  114. Ratzke C., Hellenkamp B., Hugel T. Four-colour FRET reveals directionality in the Hsp90 multicomponent machinery // *Nature Communications.* 2014. Vol. 5, № 1.
  115. Voith von Voithenberg L., Lamb D.C. Single Pair Förster Resonance Energy Transfer: A Versatile Tool To Investigate Protein Conformational Dynamics // *Bioessays.* 2018. Vol. 40, № 3.
  116. Holmstrom E.D. et al. Accurate Transfer Efficiencies, Distance Distributions, and Ensembles of Unfolded and Intrinsically Disordered Proteins From Single-Molecule FRET // *Methods in Enzymology.* 2018. P. 287–325.
  117. Asher W.B. et al. Single-molecule FRET imaging of GPCR dimers in living cells // *Nat. Methods.* 2021. Vol. 18, № 4. P. 397–405.
  118. Sun X. et al. Development of SNAP-Tag Fluorogenic Probes for Wash-Free Fluorescence Imaging // *ChemBioChem.* 2011. Vol. 12, № 14. P. 2217–2226.
  119. Hu C.-D., Chinenov Y., Kerppola T.K. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation // *Mol. Cell.* 2002. Vol. 9, № 4. P. 789–798.
  120. Kerppola T.K. Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells // *Annu. Rev. Biophys.* 2008. Vol. 37. P. 465–487.
  121. Waadt R. et al. Protein fragment bimolecular fluorescence complementation analyses for the in vivo study of protein-protein interactions and cellular protein complex localizations // *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol. 1062. P. 629–658.
  122. Hu C.-D., Kerppola T.K. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis // *Nat. Biotechnol.* 2003. Vol. 21, № 5. P. 539–545.
  123. Ohashi K. et al. Visualization of cofilin-actin and Ras-Raf interactions by bimolecular fluorescence complementation assays using a new pair of split Venus fragments // *Biotechniques.* 2012. Vol. 52, № 1. P. 45–50.
  124. Waadt R. et al. Multicolor bimolecular fluorescence complementation reveals simultaneous formation of alternative CBL/CIPK complexes in planta // *Plant J.*

2008. Vol. 56, № 3. P. 505–516.
125. Gookin T.E., Assmann S.M. Significant reduction of BiFC non-specific assembly facilitates in planta assessment of heterotrimeric G-protein interactors // *Plant J.* 2014. Vol. 80, № 3. P. 553–567.
  126. Robida A.M., Kerppola T.K. Bimolecular fluorescence complementation analysis of inducible protein interactions: effects of factors affecting protein folding on fluorescent protein fragment association // *J. Mol. Biol.* 2009. Vol. 394, № 3. P. 391–409.
  127. Pusch S., Dissmeyer N., Schnittger A. Bimolecular-fluorescence complementation assay to monitor kinase-substrate interactions in vivo // *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 779. P. 245–257.
  128. Tchekanda E., Sivanesan D., Michnick S.W. An infrared reporter to detect spatiotemporal dynamics of protein-protein interactions // *Nat. Methods.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 11, № 6. P. 641–644.
  129. Walter M. et al. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation // *Plant J.* 2004. Vol. 40, № 3. P. 428–438.
  130. Kung C.E., Reed J.K. Fluorescent molecular rotors: a new class of probes for tubulin structure and assembly // *Biochemistry.* 1989. Vol. 28, № 16. P. 6678–6686.
  131. Iwaki T. et al. Antibodies for fluorescent molecular rotors // *Biochemistry.* 1993. Vol. 32, № 29. P. 7589–7592.
  132. Szent-Gyorgyi C. et al. Fluorogen-activating single-chain antibodies for imaging cell surface proteins // *Nat. Biotechnol.* 2008. Vol. 26, № 2. P. 235–240.
  133. Ozhalici-Unal H. et al. A rainbow of fluoromodules: a promiscuous scFv protein binds to and activates a diverse set of fluorogenic cyanine dyes // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130, № 38. P. 12620–12621.
  134. Zanotti K.J. et al. Blue fluorescent dye-protein complexes based on fluorogenic cyanine dyes and single chain antibody fragments // *Org. Biomol. Chem.* 2011. Vol. 9, № 4. P. 1012–1020.
  135. Perkins L.A. et al. Genetically Targeted Ratiometric and Activated pH Indicator Complexes (TRApHIC) for Receptor Trafficking // *Biochemistry.* 2018. Vol. 57, № 5. P. 861–871.
  136. He J. et al. A genetically targetable near-infrared photosensitizer // *Nat. Methods.* 2016. Vol. 13, № 3. P. 263–268.
  137. Wang Y. et al. Affibody-targeted fluorogen activating protein for in vivo tumor imaging // *Chem. Commun.* . 2017. Vol. 53, № 12. P. 2001–2004.
  138. Wang Y. et al. Fluorogen activating protein-affibody probes: modular, no-wash measurement of epidermal growth factor receptors // *Bioconjug. Chem.* 2015. Vol. 26, № 1. P. 137–144.
  139. Lyakhov I. et al. HER2- and EGFR-specific affiprobe: novel recombinant optical probes for cell imaging // *ChemBiochem.* 2010. Vol. 11, № 3. P. 345–350.
  140. Yan Q. et al. Localization microscopy using noncovalent fluorogen activation by genetically encoded fluorogen-activating proteins // *Chemphyschem.* 2014. Vol. 15, № 4. P. 687–695.
  141. Kumagai A. et al. A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle // *Cell.*

2013. Vol. 153, № 7. P. 1602–1611.
142. Hayashi S., Toda Y. A novel fluorescent protein purified from eel muscle // *Fisheries Science*. 2009. Vol. 75, № 6. P. 1461–1469.
  143. Kwon J. et al. Bright ligand-activatable fluorescent protein for high-quality multicolor live-cell super-resolution microscopy // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11, № 1. P. 273.
  144. Plamont M.-A. et al. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2016. Vol. 113, № 3. P. 497–502.
  145. Tebo A.G. et al. Improved Chemical-Genetic Fluorescent Markers for Live Cell Microscopy // *Biochemistry*. 2018. Vol. 57, № 39. P. 5648–5653.
  146. Li C. et al. Dynamic multicolor protein labeling in living cells // *Chem. Sci.* 2017. Vol. 8, № 8. P. 5598–5605.
  147. Li C. et al. A Far-Red Emitting Fluorescent Chemogenetic Reporter for In Vivo Molecular Imaging // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2020. Vol. 59, № 41. P. 17917–17923.
  148. Povarova N.V. et al. Red-Shifted Substrates for FAST Fluorogen-Activating Protein Based on the GFP-Like Chromophores // *Chemistry*. 2019. Vol. 25, № 41. P. 9592–9596.
  149. Myasnyanko I.N. et al. Color Tuning of Fluorogens for FAST Fluorogen-Activating Protein // *Chemistry*. 2021. Vol. 27, № 12. P. 3986–3990.
  150. Tebo A.G., Gautier A. A split fluorescent reporter with rapid and reversible complementation // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 2822.
  151. Tebo A.G., Gautier A. A split fluorescent reporter with rapid and reversible complementation // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 2822.
  152. Tebo A.G. et al. Orthogonal fluorescent chemogenetic reporters for multicolor imaging // *Nat. Chem. Biol.* 2021. Vol. 17, № 1. P. 30–38.
  153. Benaissa H. et al. Engineering of a fluorescent chemogenetic reporter with tunable color for advanced live-cell imaging // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 6989.
  154. Mineev K.S. et al. NanoFAST: structure-based design of a small fluorogen-activating protein with only 98 amino acids // *Chem. Sci.* 2021. Vol. 12, № 19. P. 6719–6725.
  155. Smith E.M., Gautier A., Puchner E.M. Single-Molecule Localization Microscopy with the Fluorescence-Activating and Absorption-Shifting Tag (FAST) System // *ACS Chem. Biol.* 2019. Vol. 14, № 6. P. 1115–1120.
  156. Venkatachalapathy M. et al. Live cell super resolution imaging by radial fluctuations using fluorogen binding tags // *Nanoscale*. 2019. Vol. 11, № 8. P. 3626–3632.
  157. Bozhanova N.G. et al. Protein labeling for live cell fluorescence microscopy with a highly photostable renewable signal // *Chem. Sci.* 2017. Vol. 8, № 10. P. 7138–7142.
  158. Dou J. et al. De novo design of a fluorescence-activating  $\beta$ -barrel // *Nature*. 2018. Vol. 561, № 7724. P. 485–491.
  159. Klima J.C. et al. Incorporation of sensing modalities into de novo designed fluorescence-activating proteins // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 856.



160. Iyer A. et al. Chemogenetic Tags with Probe Exchange for Live-Cell Fluorescence Microscopy // *ACS Chem. Biol.* 2021. Vol. 16, № 5. P. 891–904.
161. Kompa J. et al. Exchangeable HaloTag Ligands for Super-Resolution Fluorescence Microscopy // *Journal of the American Chemical Society.* 2023. Vol. 145, № 5. P. 3075–3083.
162. Cody C.W. et al. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein // *Biochemistry.* 1993. Vol. 32, № 5. P. 1212–1218.
163. Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1994. Vol. 91, № 26. P. 12501–12504.
164. Baranov M.S. et al. Conformationally locked chromophores as models of excited-state proton transfer in fluorescent proteins // *J. Am. Chem. Soc.* 2012. Vol. 134, № 13. P. 6025–6032.
165. Baranov M.S. et al. Red-shifted fluorescent aminated derivatives of a conformationally locked GFP chromophore // *Chemistry.* 2014. Vol. 20, № 41. P. 13234–13241.
166. Bozhanova N.G. et al. Red-Shifted Aminated Derivatives of GFP Chromophore for Live-Cell Protein Labeling with Lipocalins // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 12.
167. Bishop R.E. The bacterial lipocalins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* 2000. Vol. 1482, № 1-2. P. 73–83.
168. Campanacci V. et al. The crystal structure of the *Escherichia coli* lipocalin Blc suggests a possible role in phospholipid binding // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 562, № 1-3. P. 183–188.
169. Flower D.R., North A.C., Sansom C.E. The lipocalin protein family: structural and sequence overview // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. Vol. 1482, № 1-2. P. 9–24.
170. Gutiérrez G., Ganfornina M.D., Sánchez D. Evolution of the lipocalin family as inferred from a protein sequence phylogeny // *Biochim. Biophys. Acta.* 2000. Vol. 1482, № 1-2. P. 35–45.
171. Bishop R.E. The bacterial lipocalins // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology.* 2000. Vol. 1482, № 1-2. P. 73–83.
172. Huber R. et al. Molecular structure of the bilin binding protein (BBP) from *Pieris brassicae* after refinement at 2.0 Å resolution // *Journal of Molecular Biology.* 1987. Vol. 198, № 3. P. 499–513.
173. Campanacci V. et al. The crystal structure of the *Escherichia coli* lipocalin Blc suggests a possible role in phospholipid binding // *FEBS Lett.* 2004. Vol. 562, № 1-3. P. 183–188.
174. Bozhanova N.G. et al. Lipocalin Blc is a potential heme-binding protein // *FEBS Lett.* 2021. Vol. 595, № 2. P. 206–219.
175. Bozhanova N.G. et al. Protein labeling for live cell fluorescence microscopy with a highly photostable renewable signal // *Chem. Sci.* 2017. Vol. 8, № 10. P. 7138–7142.
176. Bozhanova N.G. et al. Protein labeling for live cell fluorescence microscopy with a highly photostable renewable signal // *Chem. Sci.* 2017. Vol. 8, № 10. P. 7138–7142.

177. Bozhanova N.G. et al. Protein labeling for live cell fluorescence microscopy with a highly photostable renewable signal // *Chem. Sci.* 2017. Vol. 8, № 10. P. 7138–7142.
178. Bozhanova N.G. et al. Protein labeling for live cell fluorescence microscopy with a highly photostable renewable signal // *Chem. Sci.* 2017. Vol. 8, № 10. P. 7138–7142.
179. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability // *PLoS One*. 2008. Vol. 3, № 11. P. e3647.
180. Engler C., Marillonnet S. Generation of families of construct variants using golden gate shuffling // *Methods Mol. Biol.* 2011. Vol. 729. P. 167–181.
181. Engler C. et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes // *PLoS One*. 2009. Vol. 4, № 5. P. e5553.
182. 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. Vol. 15, № 9. P. 2456–2465.
183. Korndörfer I.P., Beste G., Skerra A. Crystallographic analysis of an “anticalin” with tailored specificity for fluorescein reveals high structural plasticity of the lipocalin loop region // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. 2003. Vol. 53, № 1. P. 121–129.
184. Jimenez A., Friedl K., Leterrier C. About samples, giving examples: Optimized Single Molecule Localization Microscopy // *Methods*. 2020. Vol. 174. P. 100–114.
185. Bozhanova N.G. et al. DiB-splits: nature-guided design of a novel fluorescent labeling split system // *Sci. Rep.* 2020. Vol. 10, № 1. P. 11049.
186. Cabantous S., Terwilliger T.C., Waldo G.S. Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein // *Nat. Biotechnol.* 2005. Vol. 23, № 1. P. 102–107.
187. Kamiyama D. et al. Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein // *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7. P. 11046.
188. Bozhanova N.G. et al. Computational redesign of a fluorogen activating protein with Rosetta // *PLOS Computational Biology*. 2021. Vol. 17, № 11. P. e1009555.
189. Subach O.M. et al. Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe // *Chem. Biol.* 2008. Vol. 15, № 10. P. 1116–1124.
190. Rizzo M.A. et al. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET // *Nat. Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 4. P. 445–449.
191. Markwardt M.L. et al. An improved cerulean fluorescent protein with enhanced brightness and reduced reversible photoswitching // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, № 3. P. e17896.
192. Goedhart J. et al. Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93% // *Nat. Commun.* 2012. Vol. 3. P. 751.
193. Bajar B.T. et al. A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs // *Sensors*. 2016. Vol. 16, № 9.
194. Murakoshi H. et al. A dark green fluorescent protein as an acceptor for measurement of Förster resonance energy transfer // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 15334.
195. Murakoshi H. et al. A dark green fluorescent protein as an acceptor for

- measurement of Förster resonance energy transfer // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5. P. 15334.
196. Shaner N.C. et al. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum* // *Nat. Methods.* 2013. Vol. 10, № 5. P. 407–409.
  197. Marras S.A.E., Kramer F.R., Tyagi S. Efficiencies of fluorescence resonance energy transfer and contact-mediated quenching in oligonucleotide probes // *Nucleic Acids Res. Oxford Academic,* 2002. Vol. 30, № 21. P. e122–e122.
  198. Pang A.H. et al. A crystal structure of coil 1B of vimentin in the filamentous form provides a model of a high-order assembly of a vimentin filament // *The FEBS Journal.* 2018. Vol. 285, № 15. P. 2888–2899.
  199. Llères D. et al. Quantitative analysis of chromatin compaction in living cells using FLIM-FRET // *J. Cell Biol.* 2009. Vol. 187, № 4. P. 481–496.
  200. Freeman A.K., Morrison D.K. 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2011. Vol. 22, № 7. P. 681–687.
  201. Davis J.R., Tapon N. Hippo signalling during development // *Development.* 2019. Vol. 146, № 18.
  202. Calses P.C. et al. Hippo Pathway in Cancer: Aberrant Regulation and Therapeutic Opportunities // *Trends Cancer Res.* 2019. Vol. 5, № 5. P. 297–307.
  203. Qin L., Dong Z., Zhang J.-T. 14-3-3 $\sigma$  regulation of and interaction with YAP1 in acquired gemcitabine resistance via promoting ribonucleotide reductase expression // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 14. P. 17726–17736.
  204. Kouzarides T. Chromatin Modifications and Their Function // *Cell.* 2007. Vol. 128, № 4. P. 693–705.
  205. Grashoff C. et al. Measuring mechanical tension across vinculin reveals regulation of focal adhesion dynamics // *Nature.* 2010. Vol. 466, № 7303. P. 263–266.
  206. Ziegler W.H. et al. Integrin connections to the cytoskeleton through talin and vinculin // *Biochemical Society Transactions.* 2008. Vol. 36, № 2. P. 235–239.
  207. Becker N. et al. Molecular nanosprings in spider capture-silk threads // *Nat. Mater.* 2003. Vol. 2, № 4. P. 278–283.
  208. Mishin A. et al. Live-cell nanoscopy enabled with transient labeling and the control of fluorophore blinking // *EPJ Web of Conferences.* 2018. Vol. 190. P. 03008.
  209. Lambert G.G. et al. *Aequorea's* secrets revealed: New fluorescent proteins with unique properties for bioimaging and biosensing // *PLoS Biol.* 2020. Vol. 18, № 11. P. e3000936.
  210. Gaume X. et al. In vivo Study of the Histone Chaperone Activity of Nucleolin by FRAP // *Biochem. Res. Int.* 2011. Vol. 2011. P. 187624.
  211. Murakoshi H. et al. Single-molecule imaging analysis of Ras activation in living cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004. Vol. 101, № 19. P. 7317–7322.