

На правах рукописи

Саркисян Карен Сергеевич

Флуоресцентные белки  
с анионным хромофором на основе триптофана

специальность 03.01.03 (молекулярная биология)

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва, 2015

Работа выполнена в лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

**Научный руководитель:**

Лукьянов Константин Анатольевич, доктор биологических наук

**Официальные оппоненты:**

**Швядас Витаутас - Юозапас Каятоно**, доктор химических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ).

**Соболев Александр Сергеевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Института биологии гена Российской академии наук.

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН)

Защита диссертации состоится 16 декабря 2015 года в 10:00 часов на заседании совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН по адресу: 117997, г.Москва, ул. Миклухо-Макляя, д. 16/10.

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

Автореферат разослан \_\_\_\_ октября 2015 года.

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



# 1. Общая характеристика работы

## 1.1. Актуальность темы исследования

Современные способы прижизненной визуализации живых систем в значительной степени основываются на использовании флуоресцентных белков. Вскоре после открытия возможности использования флуоресцентных белков в качестве генетически кодируемых меток было обнаружено, что мутантные варианты природных флуоресцентных белков могут обладать более подходящими для флуоресцентной микроскопии свойствами по сравнению с белками дикого типа.

Активная разработка мутантных вариантов флуоресцентных белков началась в середине 1990-х годов и продолжается сейчас. На сегодняшний день она привела к появлению множества меток, отличающихся биохимическими и фотофизическими свойствами. За крайне широким спектральным разнообразием существующих флуоресцентных белков (чуть менее, чем полностью покрывающим видимый спектр) стоят отличия в химической структуре формируемых хромофоров и степени их ионизации.

В настоящей работе мы исследовали возможность достижения неопisanного ранее анионного состояния триптофанового хромофора флуоресцентных белков, а также применили созданные нами белки в микроскопии времени жизни флуоресценции.

## 1.2. Степень разработанности области исследования

Разработанные на сегодняшний день флуоресцентные белки спектрально охватывают диапазон видимого света от фиолетового до дальне-красного. Основные типы хромофоров были получены и охарактеризованы в 1990-х и начале 2000-х годов. На сегодняшний день в базе данных Protein Data Bank содержится более 350 структур флуоресцентных белков, а основные аминокислотные позиции, отвечающие за биохимические и фотофизические свойства белка, хорошо охарактеризованы.

Несмотря на это, предсказание биохимических и фотофизических свойств флуоресцентного белка по его аминокислотной последовательности является нерешенной задачей, и разработка новых меток с заданными свойствами исключительно *in silico* пока невозможна.

В области практического использования флуоресцентных белков продолжается создание и оптимизация конструкций для оптогенетических приложений, а также создание меток для конкретных задач микроскопии (например, для визуализации *in vivo* в тканях животных, оптимизации белков для двухфотонного возбуждения, микроскопии сверхвысокого разрешения и других). Кроме того, активно продолжается разработка основанных на флуоресцентных белках генетически кодируемых сенсоров клеточных процессов.

### 1.3. Цели и задачи

Основной целью нашей работы являлось достижение в нативном флуоресцентном белке ионизации триптофанового хромофора.

В качестве подзадач в настоящей работе можно выделить создание мутантных вариантов цианового флуоресцентного белка mCerulean, их подробную биохимическую и спектральную характеристику, а также тестирование возможности их применения в микроскопии.

### 1.4. Теоретическая и практическая значимость работы

К теоретической значимости работы можно отнести достижение в биологической системе ионизованного состояния индольного фрагмента триптофана, ранее считавшегося невозможным при физиологических условиях. Мы показали, что по меньшей мере в составе более протяженной ароматической структуры (хромофора флуоресцентного белка) такое состояние возможно и может быть стабильно *in vivo*.

Возможность существования триптофана в анионном состоянии следует учитывать при интерпретации свойств флуоресцентных белков, в том числе — сложных спектральных свойств оранжевых флуоресцентных белков, содержащих DsRed-подобные хромофоры на основе триптофана.

Мы предполагаем, что стабилизация анионного состояния осуществляется за счет взаимодействий с модифицированным нами аминокислотным микроокружением в белковой глобуле. Помимо этого, как предположили на основании наших результатов Ларичева с соавторами<sup>1</sup>, ионизованный триптофановый хромофор может быть стабилизирован за счет переходного сольватированного состояния белка, характеризуемого частично открытым  $\beta$ -бочонком. Если это так, полученные данные являются первым свидетельством того, что переходные конформационные состояния могут контролировать оптические свойства флуоресцентных белков.

К практически значимым аспектам работы можно отнести необычные фотофизические и фотохимические свойства достигнутого состояния хромофора. В частности, разработанные белки с анионными триптофановыми хромофорами обладают необычно долгим для флуоресцентных белков временем жизни флуоресценции, что позволяет их рассматривать как перспективные метки для микроскопии времени жизни флуоресценции. Обнаруженная высокая фотохимическая активность триптофанового хромофора в анионном состоянии потенциально может быть использована для создания фотопереключаемых флуоресцентных меток или оптогенетических инструментов.

---

<sup>1</sup>См. работу Laricheva et al., «pH-dependent Transient Conformational States Control Optical Properties of Cyan Fluorescent Protein», JACS 2015.

## **1.5. Положения, выносимые на защиту**

1. Методами рационального дизайна и направленной молекулярной эволюции впервые созданы флуоресцентные белки с хромофорами на основе триптофана, находящимися в анионном состоянии при физиологических условиях.
2. Полученные зеленые флуоресцентные белки WasCFP и NowGFP обладают наибольшим среди флуоресцентных белков временем жизни флуоресценции (5.1 нс), а FRET-пары на основе NowGFP — широким динамическим диапазоном и наибольшим ферстеровским радиусом среди описанных к настоящему времени пар флуоресцентных белков.
3. Обнаружен новый тип фотоконверсии флуоресцентных белков, сопровождающийся сменой флуоресценции с зеленой на голубую.
4. На основе биохимических и кристаллографических данных предложен единый механизм, описывающий спектральные свойства белков WasCFP и NowGFP при изменении pH и фотоконверсии.
5. Показано, что белок NowGFP позволяет использовать дополнительный временной канал для микроскопии времени жизни флуоресценции, обеспечивая возможность одновременной визуализации с другими зелеными флуоресцентными белками.

## **1.6. Структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 85 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 131 ссылку. Диссертация содержит 36 рисунков и одну таблицу.

## **1.7. Апробация работы**

Основные материалы диссертации были доложены на конференции Lemanic Neuroscience Annual Meeting (Les Diablerets, Швейцария; 2012), XXVI Зимней молодежной научной школе ИБХ РАН (Москва, Россия; 2013), конференции Seeing is Believing (EMBL, Heidelberg, Германия; 2013), и симпозиуме летней школы RIKEN Brain Science Institute (Wako City, Saitama, Япония; 2013).

## **1.8. Публикации**

По материалам диссертации опубликовано четыре статьи в международных рецензируемых журналах.

## 2. Основное содержание работы

Флуоресцентные белки, — необычное белковое семейство, встречающееся только в некоторых группах многоклеточных животных, — характеризуются высококонсервативной пространственной структурой и отличаются от других белков способностью к формированию внутри белковой глобулы протяженной ароматической структуры — хромофора. Хромофор формируется из собственных аминокислотных остатков и обеспечивает способность флуоресцентных белков к поглощению и испусканию видимого света, а формирование хромофора катализируется самой молекулой флуоресцентного белка.

Реакции, приводящие к формированию хромофора, требуют лишь наличия в окружающей среде кислорода, и потому практически независимы от того, в какой системе экспрессируется ген флуоресцентного белка: белок способен к сворачиванию и флуоресценции и в клетках прокариот, и в клетках эукариот, и даже в системе *in vitro* трансляции. Именно автономность формирования хромофора во флуоресцентных белках является причиной того, что флуоресцентные белки стали основным инструментом визуализации клеточных структур и процессов в биологических исследованиях.

Химическая структура формируемого хромофора зависит от аминокислотных остатков, которые несет белок в области, подвергающейся автокатализу. Все флуоресцентные белки, поглощающие свет в видимом диапазоне, содержат в составе хромофора хотя бы одну ароматическую аминокислоту. В природных флуоресцентных белках встречаются исключительно хромофоры на основе тирозина, однако в мутантных белках, полученных в биотехнологии, тирозин хромофора может быть заменен на другие ароматические аминокислоты без потери способности белка к флуоресценции. Химическая структура хромофора, а также его ионизация, в наибольшей степени определяют фотофизические свойства флуоресцентного белка.

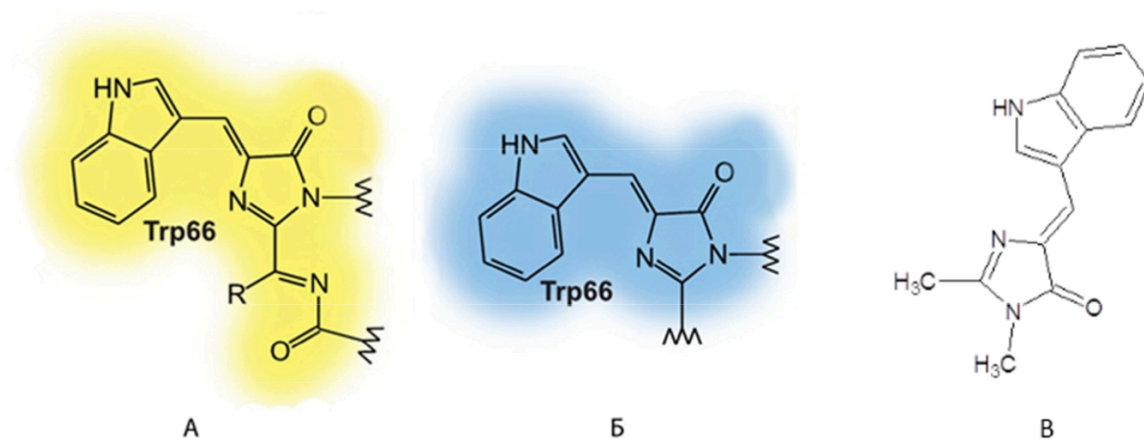
В спектре возбуждения флуоресценции многих зеленых флуоресцентных белков с хромофором на основе тирозина можно обнаружить пики, соответствующие двум состояниям хромофора — нейтральному (в области 400 нм) и анионному (около 480 нм). Соотношение величин этих пиков определяется белковым микроокружением хромофора, а ключевые аминокислотные положения, влияющие на степень ионизации хромофора, на сегодняшний день хорошо изучены. Помимо структуры белка, на соотношение нейтральной и заряженной форм могут оказывать влияние такие факторы, как pH или интенсивное облучение светом определенной длины волны. В целом, это свойство широко используется в методах на основе флуоресцентных белков. Так, переход хромофора при облучении из нейтральной в анионную форму и обратно является основой механизма работы некоторых фотоактивируемых флуоресцентных белков. В генетически кодируемых индикаторах на основе флуоресцентных белков измерение соотношения между спектрально отличающимися формами хромофора позволяет получать сигнал, не зависящий от концентрации индикатора.

Для циановых флуоресцентных белков с хромофором на основе *триптофана* такого рода спектрально различимые формы не наблюдались. В нашей лаборатории недавно было впервые показано, что индольный фрагмент в *химически синтезированном* хромофоре циановых флуоресцентных белков способен к ионизации ( $pK_a$  12.4), при этом изменяются также и спектральные свойства. Эти экспериментальные данные легли в основу настоящей работы, в которой мы предприняли попытку достигнуть в триптофановом хромофоре ранее не описанного состояния индольного фрагмента — его ионизации в молекуле белка при физиологических условиях. Мы предположили, что помещение в ближайшее микроокружение хромофора химических групп с основными свойствами (например, аминогруппы лизина или гуанидиновой группировки аргинина) может способствовать ионизации триптофанового хромофора и изменению его спектральных свойств. Настоящая работа в первую очередь посвящена проверке этого предположения.

## 2.1. Ионизация триптофанового хромофора в нативном белке

### 2.1.1. Титрование синтетического аналога триптофанового хромофора

Идея о возможности ионизации хромофоров на основе триптофана возникла в результате анализа проведенного в нашей лаборатории pH-титрования химически синтезированного хромофора, подобного хромофору циановых флуоресцентных белков<sup>1</sup> (Рисунок 2.1, в).



**Рис. 2.1:** Структуры хромофоров на основе триптофана.

(А) – хромофор оранжевых флуоресцентных белков, содержащий ацилиминную связь;

(Б) – хромофор циановых флуоресцентных белков, не содержащий ацилиминную связь;

(В) – использованный в работе химически синтезированный хромофор, подобный хромофору циановых флуоресцентных белков.

При низких ( $pK_\beta = 3.6$ ) и высоких значениях pH ( $pK_\alpha = 12.4$ ) в спектре поглощения этого соединения возникал батохромный сдвиг — смещение максимума поглощения в длинноволновую

<sup>1</sup>Химическое название соединения — (5Z)-5-(1H-индол-3-илметилден)-2,3-диметил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-он.

область (Рисунок 2.2). Учитывая значения  $pK_a$  входящих в хромофор групп, мы сделали вывод о том, что, скорее всего, причиной батохромного сдвига при защелачивании является ионизация атома азота индольного фрагмента хромофора.

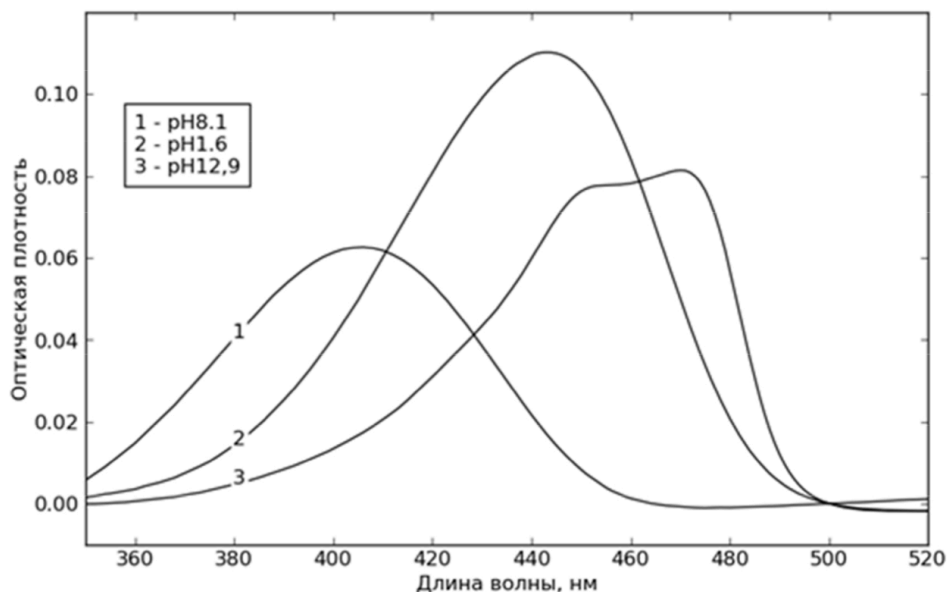


Рис. 2.2: Спектры поглощения синтетического хромофора в кислой, нейтральной и щелочной средах.

Полученное при титровании хромофора значение  $pK_a$  (12.4) оказалось существенно ниже, чем  $pK_a$  атома азота в молекулах свободного индола ( $pK_a = 17$ ) и боковой группе триптофана. Снижение  $pK_a$  до 12.4, вероятно, связано с включением индольного фрагмента в протяженную ароматическую систему хромофора. Значение  $pK_a$  12.4 объясняло, почему во всех разработанных до настоящей работы циановых флуоресцентных белках хромофоры существуют в нейтральном состоянии: значения pH, необходимые для ионизации, находятся вне физиологического диапазона<sup>2</sup> и приводят к денатурации большинства белков.

С другой стороны, значение 12.4 находилось существенно ближе к физиологическому диапазону pH (pH 4.5—8.0), чем  $pK_a$  свободного индола ( $pK_a = 17$ ). Известно, что погруженные в белковую глобулу заряды способны сильно влиять на ионизацию окружающих химических групп, и мы предположили, что  $pK_a$  хромофора, находящегося внутри белковой глобулы, можно *дополнительно* понизить, если поместить в непосредственной близости от него положительно заряженную группу. В случае успеха, при достаточном снижении  $pK_a$ , ионизации триптофанового хромофора мы ожидали достичь и в нативном флуоресцентном белке при физиологических pH.

<sup>2</sup>У человека pH внутриклеточных компартментов находится в диапазоне от 4.5 (в люмене лизосом) до 7.5-8.0 (в матриксе митохондрий). Внеклеточные значения pH достигают, с одной стороны, 1.0 в желудочном соке, и 8.1 в секретах поджелудочной железы, с другой.



## 2.1.2. Выбор модельного белка для проведения мутагенеза

Для проверки нашего предположения о возможности дополнительного снижения  $pK_a$  хромофора при помещении рядом положительно заряженной группы, мы провели направленный мутагенез флуоресцентного белка с хромофором на основе триптофана.

В качестве модельного белка мы выбрали широко используемый в микроскопии циановый флуоресцентный белок mCerulean, формирующий хромофор на основе триптофана. Проведя компьютерное моделирование эффектов замен на лизин и аргинин в различных аминокислотных позициях mCerulean, мы остановились на четырех позициях, в которых возникновение мутации могло привести к появлению контакта между боковой цепью аминокислоты и индольным фрагментом хромофора: V61, I146, T203 и S205.

В соответствии с нашей гипотезой, при ионизации хромофора мутантных белков на спектрах их поглощения и флуоресценции мы ожидали увидеть батохромный<sup>3</sup> сдвиг по сравнению со спектрами mCerulean — подобный тому, который был обнаружен на спектрах химически синтезированного хромофора циановых флуоресцентных белков и который известен для ионизации хромофоров на основе тирозина.

Мы провели направленный мутагенез и получили восемь мутантных генов, кодирующих белок mCerulean с одной из следующих замен: V61K, V61R, I146K, I146R, T203K, T203R, S205K, S205R. Мутантные гены были клонированы в вектор pQE-30 для экспрессии в *E. coli*.

Колонии *E. coli*, экспрессирующие белки с заменами S205K, S205R, T203R и V61R, не флуоресцировали. Яркая, сравнимая с диким типом флуоресценция наблюдалась в мутантах T203K, I146K и I146R. Существенно более тусклым оказался белок mCerulean V61K.

Для определения спектров поглощения и флуоресценции мы очистили мутантные белки металлоафинной хроматографией. Спектры мутантов с заменами I146K, T203K и I146R не отличались значительно от спектров родительского белка mCerulean. На спектрах же мутанта V61K был обнаружен небольшой дополнительный пик, сдвинутый в длинноволновую область более чем на 40 нм (Рисунок 2.3а, малиновая кривая).

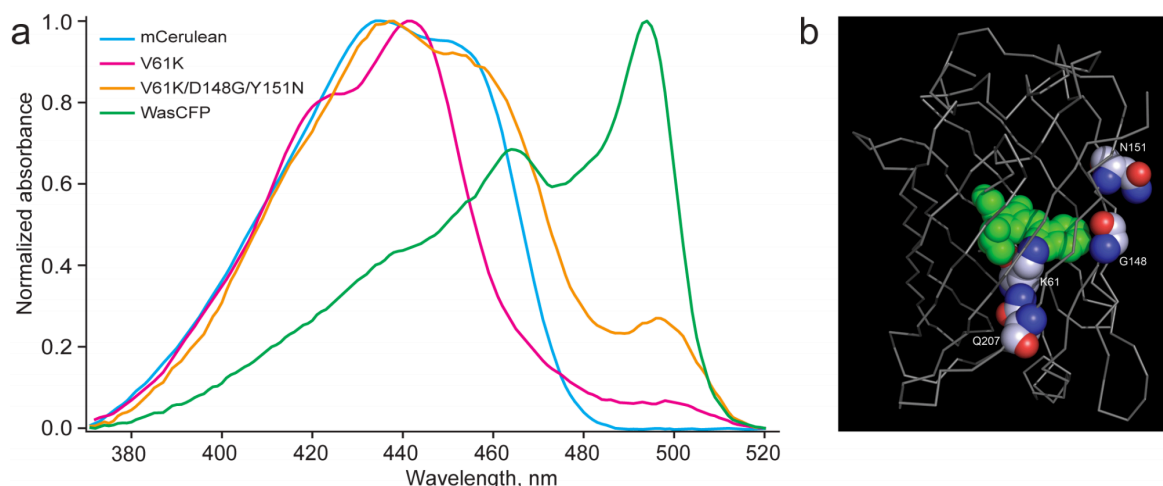
## 2.1.3. Случайный мутагенез белка mCerulean V61K

Полученный мутантный белок mCerulean V61K заинтересовал нас, так как появление нового длинноволнового пика могло свидетельствовать о ионизации хромофора. Однако с точки зрения дальнейшей работы этот белок обладал рядом недостатков, затрудняющих характеристику новой спектральной формы: тусклой и медленно появляющейся флуоресценцией, низкой долей длинноволнового пика.

Для преодоления этих недостатков нами был проведен раунд направленной эволюции<sup>4</sup> белка

---

<sup>3</sup>Батохромный — смещенный в длинноволновую область



**Рис. 2.3:** Направленная эволюция белка mCerulean. (a) Спектры поглощения мутантов WasCFP, полученных в настоящей работе; (b) Смоделированные на структуре mCerulean аминокислотные замены, отобранные нами в ходе направленной эволюции.

mCerulean V61K с экспрессией в *E. coli* и отбором на скорость появления флуоресценции и яркость колоний. На этом этапе мы отобрали несколько десятков мутантов, спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции которых затем были измерены без очистки — в бактериальном лизате.

Среди охарактеризованных таким образом мутантов мы выбрали мутант с наибольшим соотношением величин длинноволнового пика к основному пику возбуждения флуоресценции. Этим мутантом оказался белок mCerulean V61K D148G Y151N (см. спектр поглощения на Рисунке 2.3а, оранжевая кривая).

Несмотря на то, что mCerulean V61K D148G Y151N флуоресцировал ярче белка mCerulean V61K и демонстрировал повышенную долю длинноволнового пика, мы продолжили направленную эволюцию с целью дальнейшего увеличения доли длинноволновой формы.

#### 2.1.4. Случайный мутагенез белка mCerulean V61K D148G Y151N

При скринировании библиотеки мутантов белка mCerulean V61K D148G Y151N мы изменили критерий отбора — на этот раз отбор осуществлялся визуально по соотношению яркостей колонии *E. coli* при возбуждении фиолетовым ( $420 \pm 20$  нм) и синим ( $480 \pm 20$  нм) светом. Мы отобрали около 50 колоний, для которых яркость флуоресценции, возбуждаемой синим светом, значительно превышала яркость флуоресценции, возбуждаемой фиолетовым светом. Аналогично предыдущему раунду направленной эволюции для отобранных колоний были определены

<sup>4</sup>Вкратце, раунд направленной эволюции в этой работе включал в себя создание библиотеки мутантных вариантов методом «ПЦР с ошибками», клонирование библиотеки в вектор pQE-30, трансформацию в бактерии, выращивание бактериальных колоний на чашках Петри, и их отбор по определенному критерию — в данном случае, по яркости колоний спустя 14 часов после трансформации. Более подробно методика проведения направленной эволюции описана в основном тексте диссертации в разделе «Материалы и методы».

спектры флуоресценции.

Отсеквенировав десять мутантов, выбранных на основании анализа спектров, мы обнаружили, что среди них четыре содержали общую замену H169L, 3 гена содержали общую замену P58L и еще два – L207Q, один ген имел единственную замену F223L.

Для дальнейшей работы мы выбрали наиболее яркий из отобранных белков, содержащий лишь одну дополнительную мутацию — L207Q (mCerulean V61K D148G Y151N L207Q, спектр поглощения — зеленая кривая на Рисунке 2.3). Предполагая, что длинноволновый пик на спектрах этого белка может соответствовать ионизованному по остатку триптофана хромофору, мы назвали его WasCFP (W in anionic state CFP)

Мы провели дополнительный раунд случайного мутагенеза WasCFP с целью еще большего увеличения доли длинноволновой формы. Однако после анализа спектров возбуждения более сотни мутантов мы не нашли ни одного белка с большим соотношением длинноволнового пика к коротковолновому, чем в исходном белке. Таким образом, для дальнейшей характеристики полученной длинноволновой спектральной формы мы остановились на белке WasCFP.

### 2.1.5. Спектральные характеристики WasCFP

Спектры поглощения WasCFP отличались при различных температурах и значениях pH и демонстрировали наличие как минимум двух форм белка, существующих в равновесии. Одна из форм (сходная с той, в которой существует родительский белок mCerulean) обладала широким двугорбым пиком поглощения с максимумами при 434 и 458 нм. При возбуждении флуоресценции эта форма испускала циановый свет с максимумом при 478 нм. Другая форма — появившаяся в мутанте V61K — обладала пиком с максимумом поглощения при 494 нм и флуоресцировала в зеленой области спектра (максимум флуоресценции при 505 нм).

Молярные коэффициенты экстинкции WasCFP при комнатной температуре (23°C) и нейтральных pH (pH 7.4) составили  $25650 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  при 434 нм и  $49300 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  при 494 нм. Квантовый выход флуоресценции при возбуждении светом 434 нм составил 0.48, а при возбуждении светом 494 нм — 0.85 (при комнатной температуре и нейтральных pH).

Равновесие между двумя спектральными формами в WasCFP оказалось крайне чувствительным к изменениям условий среды. В частности, мы наблюдали «перетекание» длинноволнового («зеленого») пика поглощения в коротковолновый («циановый») при закислении раствора, а также при увеличении температуры. Все спектральные изменения, связанные с изменениями pH и температуры, протекали быстро и обратимо, а на денатурирующем полиакриламидном электрофореze образца WasCFP мы не обнаружили продуктов фрагментации<sup>5</sup>.

Мы обнаружили нехарактерную для флуоресцентных белков чувствительность спектров по-

---

<sup>5</sup>Фрагментация белковой цепи с разрывом в области хромофора характерна для флуоресцентных белков, содержащих ацилиминную связь в хромофоре.

глощения к сравнительно небольшим концентрациям мочевины: при возрастании концентрации мочевины оптическая плотность раствора возрастала, но только в области поглощения «зеленой» формы.

Мы измерили кинетику затухания флуоресценции WasCFP при различных pH <sup>сноска 6</sup> и обнаружили, что флуоресценция длинноволновой формы WasCFP затухает по моноэкспоненциальному закону со временем жизни 5.1 нс. Полученное время жизни флуоресценции оказалось самым долгим среди всех известных флуоресцентных белков и примерно вдвое превышало время жизни большинства зеленых флуоресцентных белков. Это означало, что WasCFP мог стать перспективной меткой для микроскопии времени жизни флуоресценции.

Подробно описанные спектральные изменения и их интерпретация рассматриваются в основном тексте диссертации, их детали важны для оценки достоверности предложенной нами структурной модели, описанной в разделе 2.1.7 автореферата.

### **2.1.6. Соответствует ли длинноволновый пик поглощения молекулам белка с ионизованным хромофором?**

Мы подробно рассматриваем вопрос об природе длинноволновой формы в основном тексте диссертации. Вкратце, мы считаем, что длинноволновый пик на спектрах белка WasCFP действительно формируется в результате поглощения света молекулами белка с отрицательно заряженным хромофором. В пользу этого свидетельствуют следующие наблюдения:

- Длинноволновый пик возник в результате замены гидрофобной аминокислоты на аминокислоту с основной группой;
- Длинноволновый пик поглощения выражен в щелочных условиях;
- Длинноволновый пик поглощения исчезает при повышении температуры, когда влияние окружающих хромофоров аминокислотных взаимодействий снижается;
- Денатурированный в щелочных условиях белок (и mCerulean, и WasCFP) имеет сдвинутый в длинноволновую область пик на спектре поглощения по сравнению с нативным Cerulean. Этот пик соответствует анионному состоянию хромофора и формируется в результате суперпозиции трех полос поглощения. Спектр нативного WasCFP, снятый в условиях доминирования длинноволновой формы, также имеет три максимума поглощения, и положения этих максимумов близки к положению максимумов на спектре денатурированного белка.

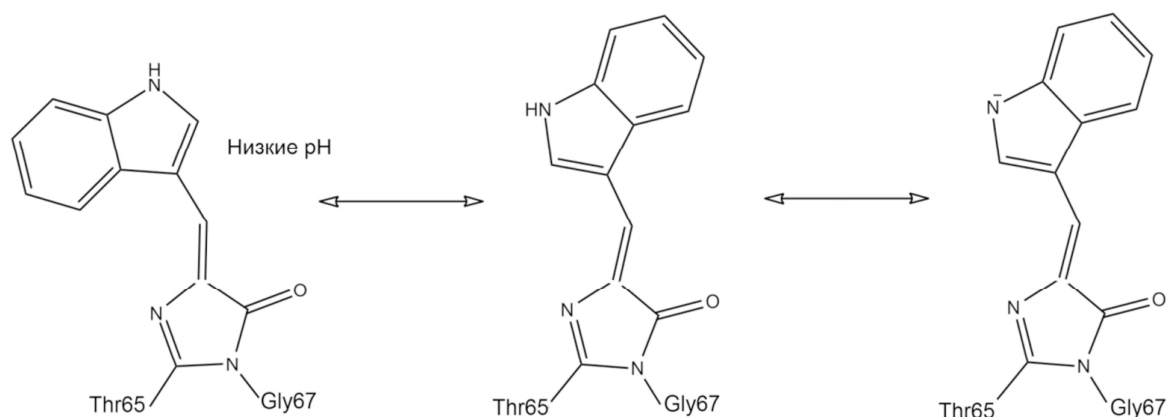
### **2.1.7. Предполагаемые структурные основы наблюдаемых явлений**

Мы предлагаем следующую модель для описания наблюдаемых спектральных изменений. Хромофор в белке WasCFP может существовать в трех состояниях – нейтральном E-изомеризованном

---

<sup>6</sup> Данная работа была проведена совместно с Кириллом Солнцевым (Georgia Institute of Technology, Атланта, Джорджия, США) и с лабораторией физической биохимии института Биохимии им. А.Н.Баха РАН.

(вокруг  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -связи остатка триптофана), нейтральном Z-изомеризованном и анионном Z-изомеризованном (Рисунок 2.4).



**Рис. 2.4:** Предполагаемые состояния хромофора в белке WasCFP.

Нейтральный E-изомер стабилен при низких значениях pH, имеет гипсохромно сдвинутый «двугорбый» пик поглощения с максимумами при 415 и 435 нм и двугорбый пик флуоресценции с максимумами 461 и 479 нм.

Спектры нейтрального Z-изомера практически повторяют спектр Cerulean. Эта форма имеет двугорбый пик поглощения с максимумами 434 и 453 нм и двугорбый пик флуоресценции с максимумами около 480 и 502 нм.

Анионный Z-изомер на спектре поглощения имеет основной батохромно сдвинутый пик с максимумом около 494 нм и, вероятно, дополнительный пик с максимумом в области 460 нм. Спектр флуоресценции этой формы имеет пик на 505 нм и плечо около 540 нм. Анионная форма стабильна при низких температурах, нейтральных и щелочных pH (вплоть до pH 9.5).

## 2.2. WasCFP в качестве метки для флуоресцентной микроскопии

Для проверки возможности использования WasCFP в качестве флуоресцентной метки в культурах клеток млекопитающих мы провели временную трансфекцию клеток НЕК 293Т плазмидой, содержащей ген WasCFP под контролем цитомегаловирусного промотора.

Мы обнаружили, что для WasCFP возможна детекция флуоресцентного сигнала как в циановой, так и в зеленой областях спектра, однако яркость экспрессирующих его клеток и соотношение сигнал/шум оказались низкими. Отчасти, это могло объясняться тем, что при температуре 37°C анионная форма WasCFP нестабильна, и доля молекул с ионизованным хромофором мала.

В связи с этим мы продолжили случайный мутагенез WasCFP с целью получения белка, в котором анионная форма бы доминировала при 37°C и яркость которого была бы высокой. Рекордно долгое время жизни флуоресценции WasCFP означало, что с точки зрения практического применения WasCFP является перспективной меткой для микроскопии времени жизни флуоресценции.

## 2.3. Получение белка со стабильной анионной формой хромофора

### 2.3.1. Направленная эволюция WasCFP с отбором на яркость и стабильность анионной формы

Так как предыдущая попытка направленной эволюции WasCFP оказалась неудачной (см. раздел 2.1.4), в этот раз мы изменили методику скринирования. Зная о зависимости доли длинноволновой формы WasCFP от температуры, на этот раз мы отбирали мутантов WasCFP по яркости зеленой флуоресценции при нагревании колоний до 50°-60° Цельсия. Мы рассчитывали, что сможем таким образом отобрать мутант с одновременно более яркой и более стабильной зеленой формой.

Действительно, уже на первом раунде направленной эволюции нами был отобран мутант, обладающий повышенной яркостью и повышенной долей длинноволновой формы. Мы провели еще четыре раунда, в которых мы отбирали мутанты с постепенно увеличивающейся долей анионной формы и яркостью (спектры поглощения нескольких из них показаны на рисунке 2.5). После каждого раунда мы измеряли время жизни флуоресценции отобранных мутантных белков, чтобы убедиться, что время жизни не уменьшилось по сравнению с WasCFP. Результатом направленной эволюции стал яркий зеленый флуоресцентный белок, отличающийся тринадцатью аминокислотными заменами от WasCFP (E6K, L42M, T43S, V68M, I128V, V150A, N164Y, K166T, N170D, I171V, Q177L, T230P, M233A). Мы назвали его NowGFP.

### 2.3.2. Спектральные характеристики NowGFP

Максимумы поглощения и возбуждения флуоресценции NowGFP совпадают и приходятся на 494 нм (Рисунок 2.6, а). Максимум эмиссии находится на 502 нм. Коэффициент экстинкции при 494 нм составляет  $56700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ , а квантовый выход —  $0.76$ <sup>сноска 7</sup>.

Так же, как и в WasCFP, равновесие между нейтральной и анионной формами хромофора в NowGFP зависят от pH и температуры. В NowGFP, однако, анионная форма доминирует при 37°C, 50°C и даже более высоких температурах и в более широком диапазоне pH (Рисунок 2.6, b и c).  $pK_a$  NowGFP<sup>8</sup> составляет 6.2.

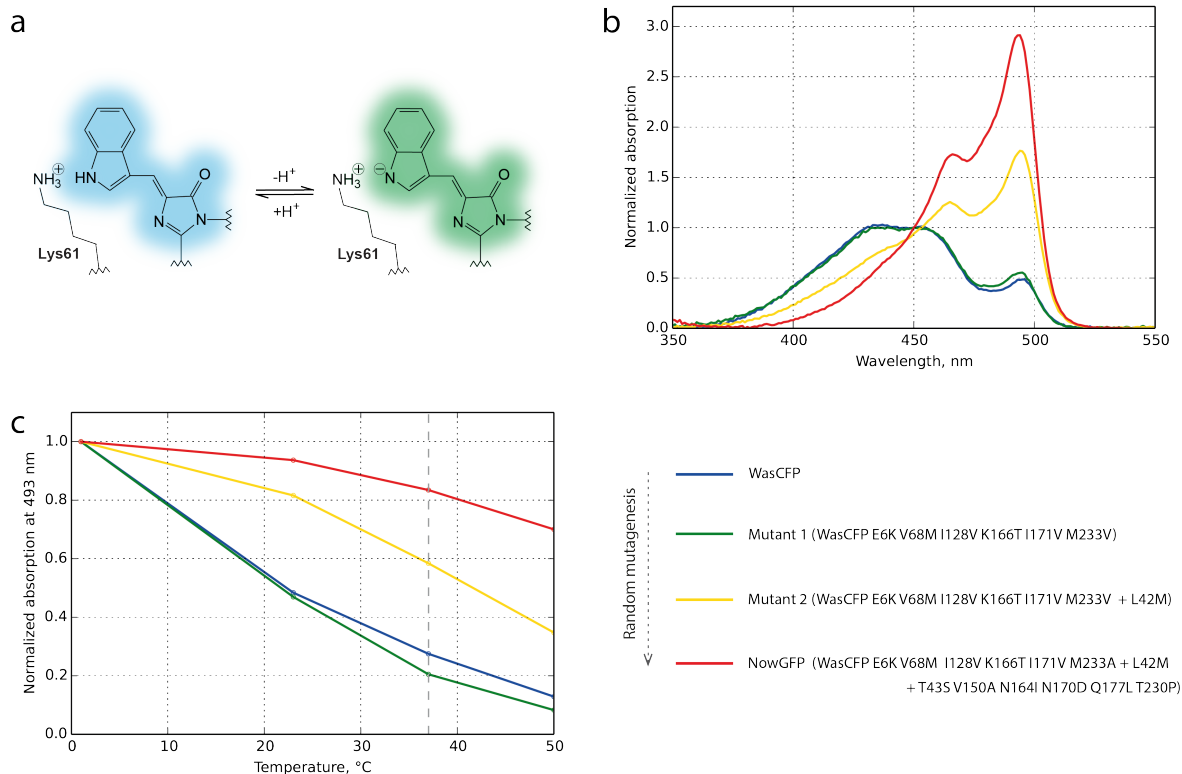
NowGFP унаследовал необычно долгое время жизни флуоресценции зеленой формы WasCFP: флуоресценция NowGFP также затухает моноэкспоненциально с временем жизни 5.1 нс (Рисунок 2.6, d). Кроме того, мы обнаружили, что время жизни флуоресценции не зависит от pH (Рисунок 2.6, b).

Измеренные в лаборатории Михаила Дробышева (Department of Cell Biology and Neuroscience,

---

<sup>7</sup>Измерения при комнатной температуре и pH 7.4.

<sup>8</sup>В области разработки флуоресцентных белков термин  $pK_a$  означает не совсем то же, что и в классической биохимии.  $pK_a$  называют значение pH, при котором флуоресценция падает в два раза относительно pH с максимальной яркостью. Так как заряд хромофора и окружающих химических групп прямо не измеряется, это значение  $pK_a$  может не совпадать со значением pH, при котором половина молекул белка несет заряженные хромофоры.



**Рис. 2.5:** Направленная эволюция с отбором на стабилизацию анионной формы.

(a) Нейтральное и анионное состояния хромофора на основе триптофана, предположительно, существуют в белке WasCFP в равновесии.

(b) Нормализованные спектры поглощения (при 37°C и pH 7.4) некоторых мутантов WasCFP, отобранных нами в ходе направленной эволюции. Спектр каждого мутанта нормализован на собственную изобестическую точку, определенную из температурной зависимости спектров поглощения.

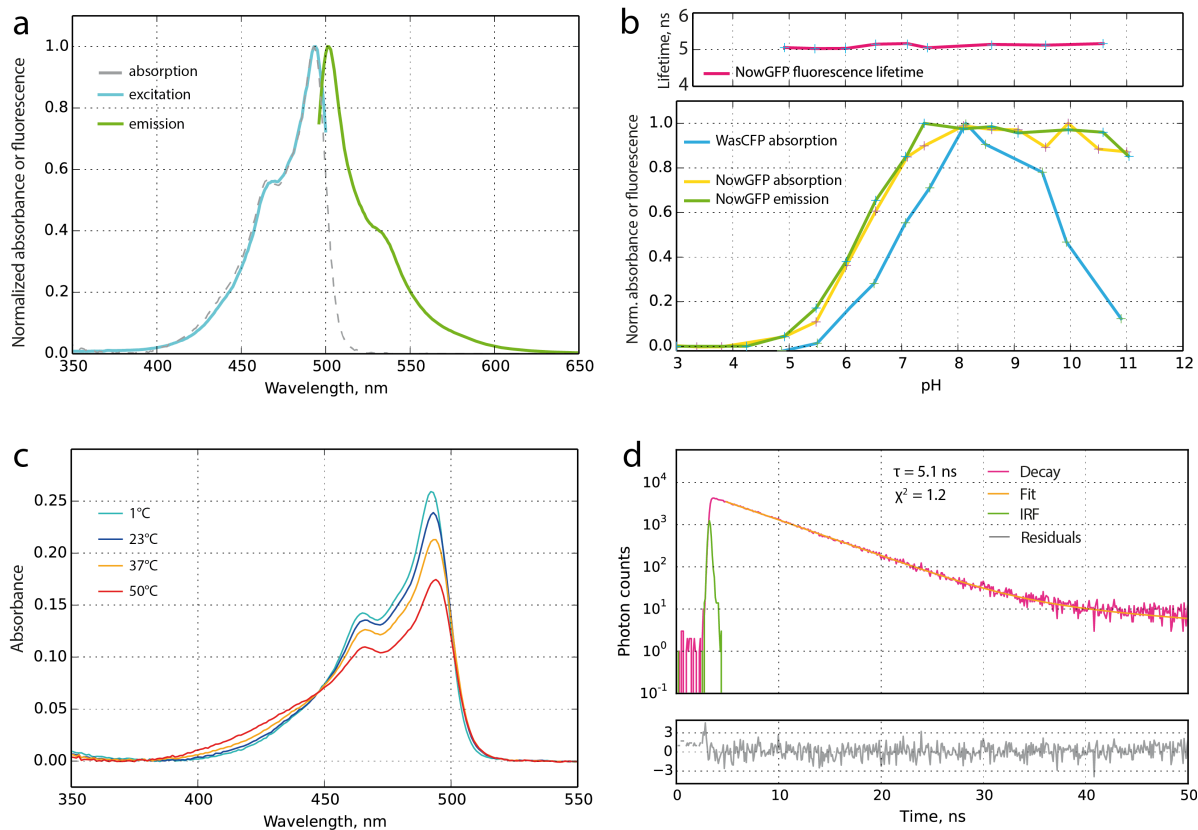
(c) Нормализованные значения оптической плотности при 493 нм растворов некоторых из отобранных нами мутантных белков при различных температурах.

Montana State University, Bozeman, MT 59717, США) спектры двухфотонного возбуждения флуоресценции NowGFP предоставили новое независимое свидетельство в пользу того, что хромофор в NowGFP находится в анионном состоянии.

В то время, как ожидаемый пик двухфотонного возбуждения (равный удвоенному значению пика однофотонного возбуждения) составляет 988 нм, максимум сечения двухфотонного возбуждения NowGFP приходится на 920 нм (и составляет  $17 \text{ GM}^9$ ). Для родительского белка mCerulean пик двухфотонного возбуждения практически совпадает с удвоенным значением пика однофотонного возбуждения.

Из литературы известно, что подобные гипсохромные<sup>10</sup> сдвиги двухфотонных спектров характерны для белков с анионными хромофорами (и GFP-, и DsRed-подобными), в то время, как у всех флуоресцентных белков с нейтральными хромофорами (с Tyr, Trp, Phe, и His в положении 66) максимум двухфотонного и удвоенный максимум однофотонного возбуждения совпадают или отличаются незначительно.

<sup>10</sup>Гипсохромные — смещенные в коротковолновую область.



**Рис. 2.6:** Спектральные свойства NowGFP. (a) Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции NowGFP. (b) Зависимость спектров поглощения, спектров флуоресценции, а также времени жизни флуоресценции от pH. (c) Зависимость спектров поглощения NowGFP от температуры. (d) Кинетика затухания флуоресценции NowGFP.

Подробнее двухфотонные спектры и их интерпретация описаны в разделе 4.4.2 основного текста диссертации.

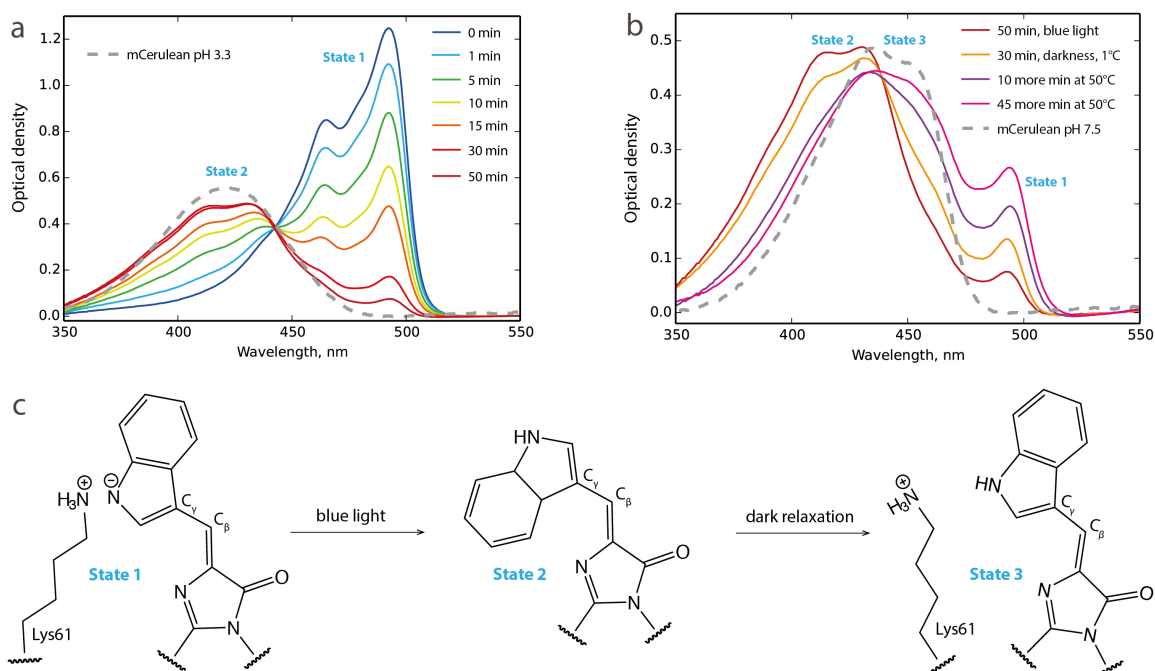
### 2.3.3. Фотопереключения NowGFP

Мы обнаружили, что NowGFP проявляет свойства фотопереключаемого белка (Рисунок 2.7). Короткое облучение NowGFP синим светом обратимо фотопереключает NowGFP в нефлуоресцентное состояние, из которого белок возвращается в течение нескольких секунд. Напротив, продолжительное облучение ярким синим светом приводит к необратимой фотоконверсии анионной формы NowGFP в форму с циановой флуоресценцией и низким квантовым выходом. Подобные фотопереключения из зеленых форм в циановые не были известны для флуоресцентных белков и описаны нами впервые.

Мы также обнаружили, что фотопереключенная форма NowGFP светонезависимо превращается в еще одну спектральную форму в течение нескольких часов (этот переход сопровождается небольшим восстановлением анионной формы и ускоряется при повышении температуры).

<sup>10</sup>Сечение двухфотонного возбуждения измеряется в единицах Гепперт-Майер (ГМ); 1 ГМ =  $10^{-50} \cdot \text{см}^4 \cdot \text{с} \cdot \text{фот}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$





**Рис. 2.7:** Фотопереключения NowGFP.

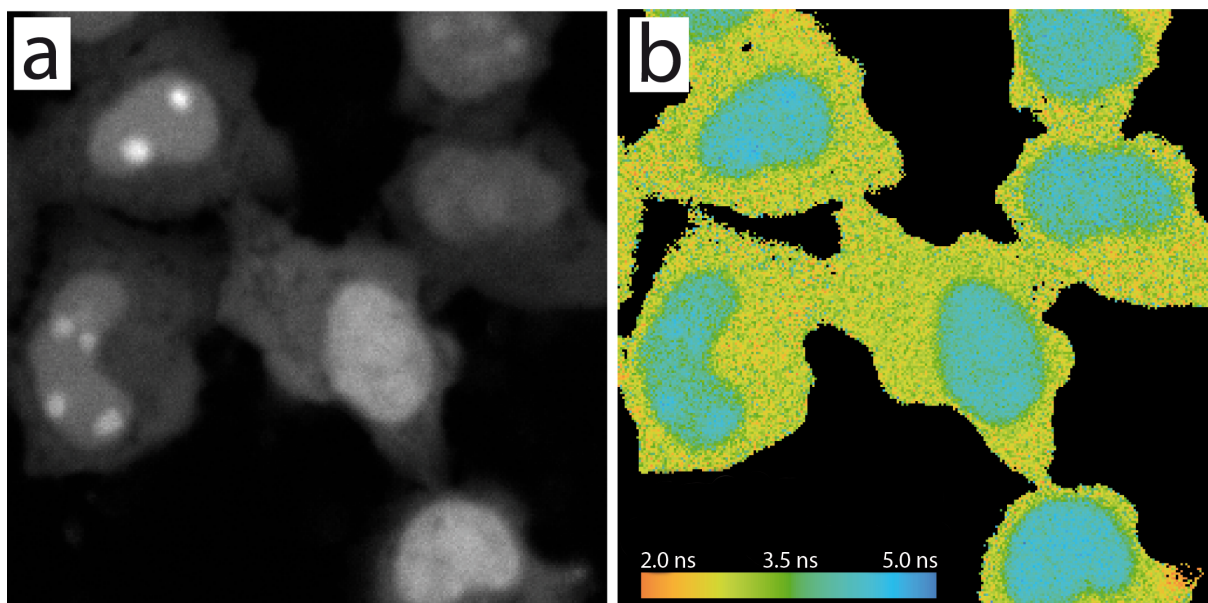
(а) Спектры поглощения NowGFP во время светозависимой фазы фотоконверсии (при pH 7.4 и 1°C). Спектр mCerulean при pH 3.3 показан пунктирной линией для сравнения. В кислых условиях показана изомеризация хромофора Cerulean вокруг  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -связи.

(б) Изменения спектров поглощения фотопереключенного NowGFP во время светонезависимой релаксации при температурах 1°C и 50°C. Пунктирной линией показан спектр mCerulean при нейтральных pH (7.5).

(в) Предлагаемая модель структурных причин фотоконверсии. Анионный хромофор на основе триптофана (состояние 1) под действием синего света превращается в  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -изомеризованный нейтральный хромофор (состояние 2), который затем релаксирует в «нормальную» конформацию нейтрального хромофора, наблюдаемую в белке Cerulean при нейтральных pH (состояние 3).

Мы заметили, что спектры поглощения формы, возникающей при облучении синим светом, близки к спектрам поглощения нейтрального хромофора mCerulean при низких значениях pH (в этих условиях происходит изомеризация хромофора вокруг  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -связи). А спектры поглощения формы, образующейся светонезависимого превращения, похожи на спектры mCerulean в нейтральных pH.

На основании этих наблюдений мы предлагаем следующее структурное объяснение наблюдаемых спектральных форм (Рисунок 2.7, в). До облучения NowGFP существует преимущественно в форме белка с анионным хромофором (состояние 1). Облучение синим светом приводит к изомеризации анионного хромофора вокруг  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -связи, потери его предполагаемого контакта с Lys61 и протонированию (состояние 2). Фотоизомеризация сопровождается дополнительными необратимыми фотохимическими процессами, препятствующими восстановлению анионной формы. Светонезависимая стадия представляет собой медленную изомеризацию обратно вокруг  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -связи, приводящую к состоянию 3 — нейтральному хромофору, подобному состоянию хромофора в белке mCerulean. Это же состояния хромофора можно достичь в NowGFP при высоких температурах или низких pH. Однако восстановления анионного состояния хромофора из состояния 3 не происходит, так как аминокислотное окружение было необратимо изменено при фото-



**Рис. 2.8:** Разрешение сигналов EGFP и NowGFP в клетках HeLa Kyoto по времени жизни.

Представлены изображения клеток, коэкспрессирующих EGFP с сигналом экспорта из ядра (NES) и фьюз NowGFP с гистонем H2B. На изображении **a** цвет кодирует интенсивность флуоресценции, на изображении **b** — среднее время жизни флуоресценции.

конверсии.

## 2.4. Кристаллографическое исследование NowGFP

Совместно с нами в лаборатории рентгеноструктурного анализа ИБХ методом кристаллографии была получена структура белка NowGFP в кислых и щелочных условиях, а также структура NowGFP, облученного ярким синим светом.

В этой работе обнаружено, что Lys61 в NowGFP существует в двух конформациях, заселенность которых зависит от pH (Рисунок 2.9). В частности, в соответствии с предложенной нами моделью, было обнаружено, что Lys61 демонстрирует pH-зависимые конформационные переходы. При pH 9.0 80% остатков лизина находятся в прямом контакте с атомом азота индольного фрагмента хромофора, а при закислении до pH 4.8 доля молекул, в которых Lys61 контактирует с индольным фрагментом хромофора, падает до 20%.

В структуре облученного синим светом образца NowGFP было обнаружено резкое снижение электронной плотности в области боковой цепи Lys61. Масс-спектрометрия облученного и необлученного образцов NowGFP выявила разницу в 43 Да между соответствующими пептидами, содержащими Lys61. Предположительно, обнаруженная разность в массе соответствует потере фрагмента NH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH- при облучении и свидетельствует в пользу разрушения боковой группы Lys61 по связи C<sub>γ</sub>-C<sub>δ</sub>.

## 2.5. NowGFP в качестве метки для флуоресцентной микроскопии

Несмотря на описанные фотоконверсии, меченые NowGFP клеточные структуры можно визуализировать в конфокальном микроскопе при умеренных интенсивностях света. Получаемые хорошо разрешенные изображения демонстрируют, что NowGFP не формирует белковых агрегатов даже при экспрессии во фьюзах, чувствительных к мономерности флуоресцентного белка (например, во фьюзах с гистоном H2B или цитокератином-18, Рисунок 2.10).

## 2.6. NowGFP в качестве метки для микроскопии времени жизни флуоресценции

Время жизни флуоресценции NowGFP составляет 5.1 нс, в то время как для большинства зеленых флуоресцентных белков эта характеристика лежит в диапазоне 2-3 нс. Это дало основания предположить, что структуры, меченные NowGFP и другими флуоресцентными белками, могут быть визуализированы одновременно с высоким контрастом с помощью микроскопии времени жизни флуоресценции.

Чтобы проверить это предположение, мы провели коэкспрессию фьюза NowGFP с гистоном H2B и EGFP-NES<sup>11</sup> в клетках HeLa. Мы обнаружили укорочение времени жизни флуоресценции NowGFP до 4.5 нс — эффект, описанный для других флуоресцентных белков *in vivo*. Несмотря на сокращение времени жизни, флуоресцентные сигналы NowGFP и EGFP разрешаются с очень высоким временным контрастом, превышающим 2 наносекунды (Рисунок 2.8).

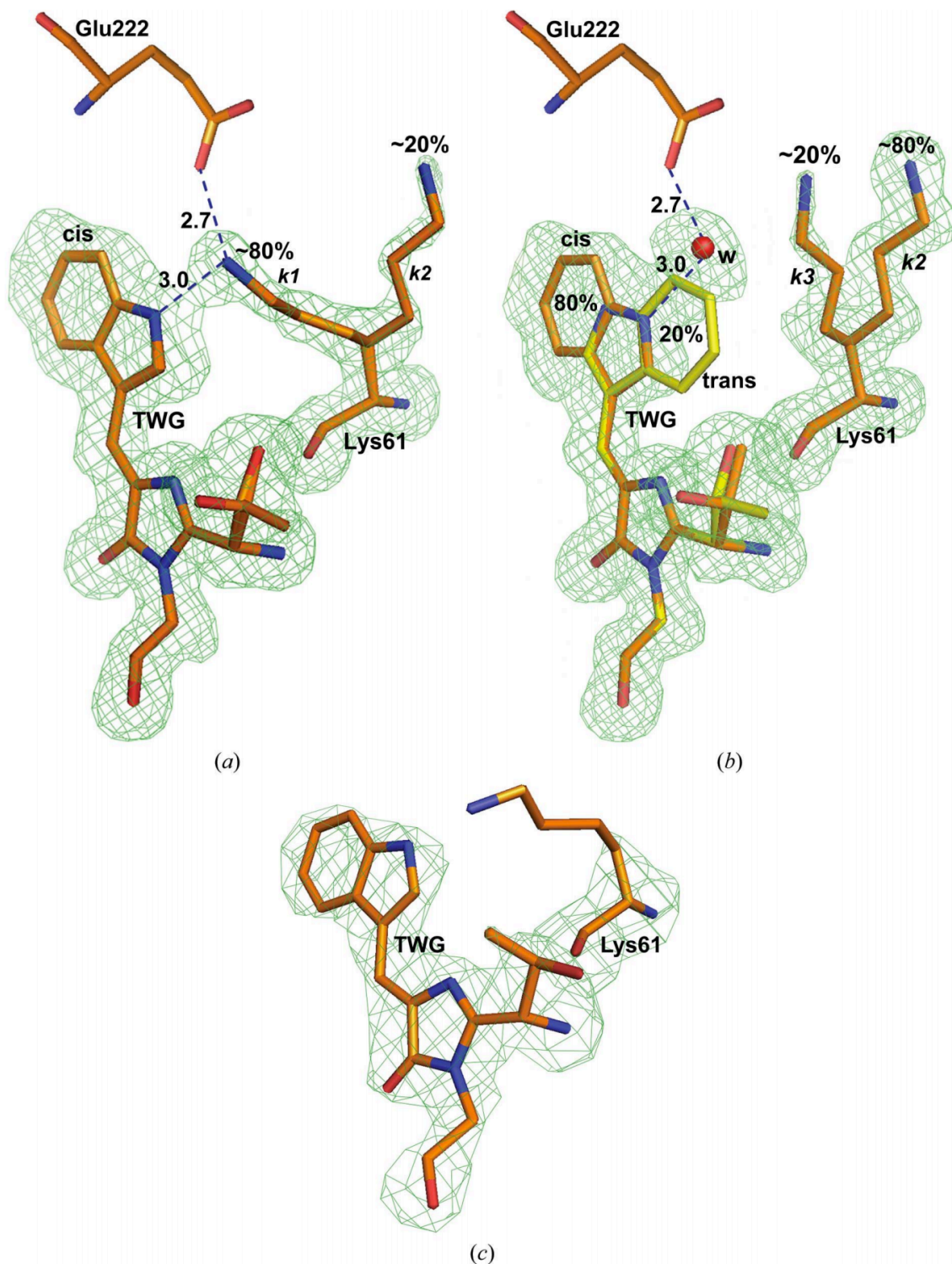
Для проверки применимости NowGFP для исследований в модельных животных и возможности разрешения сигналов NowGFP и EGFP в тканях животных, совместно с Петром Лидским (Институт биологии гена РАН, Москва, Россия) были созданы трансгенные дрозофилы, в которых ген NowGFP-NLS<sup>12</sup> был помещен под контроль регуляторной последовательности UAS. NowGFP экспрессировался в оптических долях мозга и глазных дисках. Взрослые мухи не имели нарушений развития глаз, что свидетельствует о низкой токсичности NowGFP.

Скрещивание полученных трансгенов с трансгеном, экспрессирующим фьюз EGFP с актином-5C в слюнных железах и передней области пищеварительного тракта, позволило нам проверить возможность одновременной визуализации EGFP и NowGFP в одном животном. Микроскопия времени жизни флуоресценции препарированной личинки выявила ожидаемые паттерны экспрессии флуоресцентных белков, а сигналы EGFP и NowGFP действительно оказались хорошо отличимы по времени жизни флуоресценции (с контрастом более 1,5 нс), несмотря на укорочение

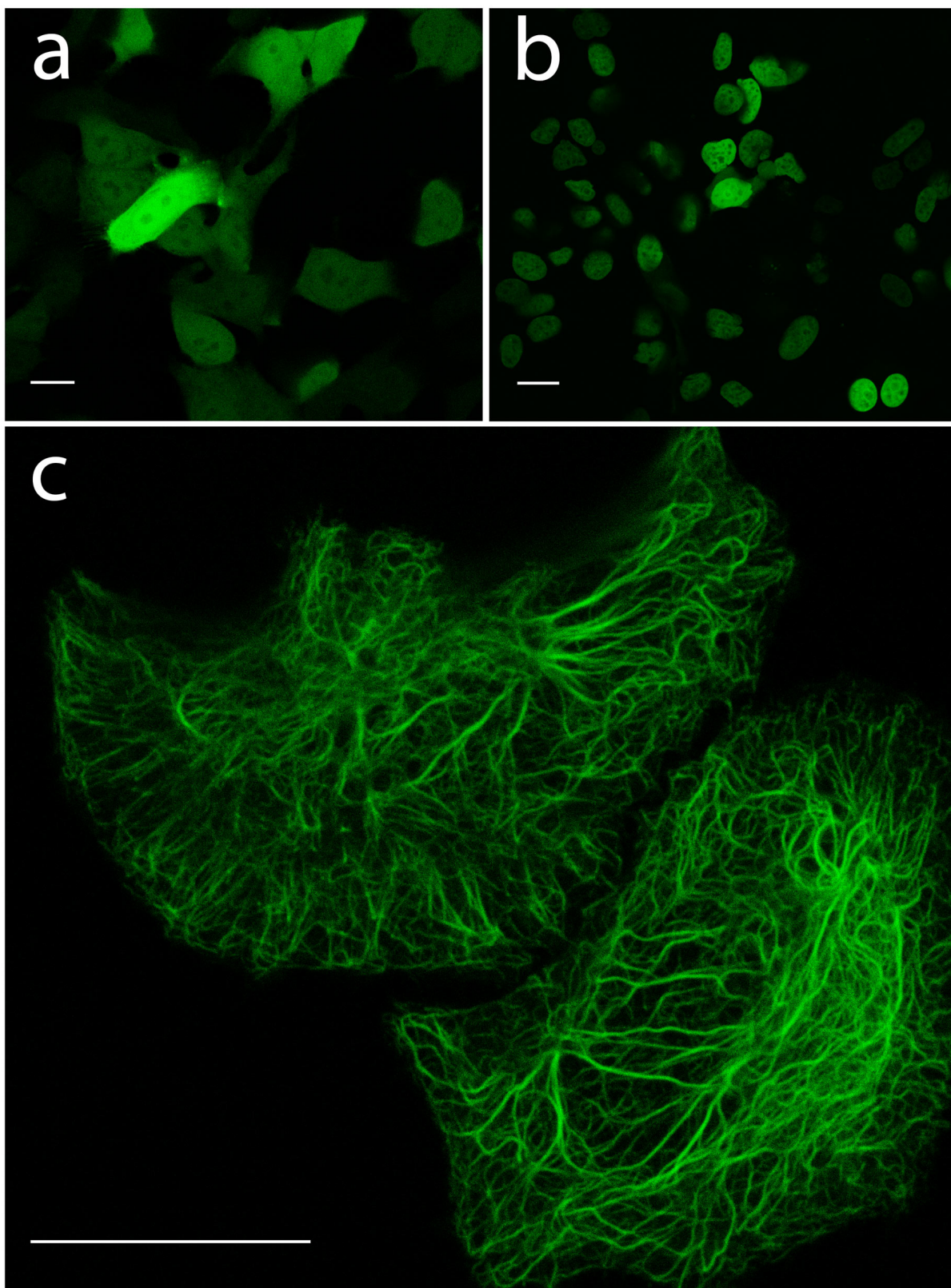
---

<sup>11</sup>NES, Nuclear Export Signal — последовательность из 4 гидрофобных аминокислот белка, узнаваемая экспортинами и обеспечивающая транспорт белка из ядра в цитоплазму через ядерные поры.

<sup>12</sup>NLS, Nuclear Localization Signal — последовательность из нескольких положительно заряженных аминокислот, экспонируемых на поверхности белка, узнаваемая импортинами и обеспечивающая транспорт белка в ядро.



**Рис. 2.9:** Конформации хромофора, Lys61 и Glu222, обнаруженные в структурах NowGFP при pH 9.0 (a), pH 4.8 (b), а также в структуре облученного синим светом белка (c). На рисунке видны альтернативные конформации Thr65 и Lys61, частичное присутствие транс-конформации хромофора индольного кольца триптофана (показана желтым, pH 4.8), а также разрушение Lys61 при облучении синим светом.



**Рис. 2.10:** Конфокальная микроскопия с использованием NowGFP в качестве метки. Изображения клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих NowGFP в цитоплазме (a), во фьюзе с гистоном H2B (b) и с цитокератином-18 (c). Белый отрезок соответствует расстоянию в 15 мкм.

времен жизни обоих белков из-за фиксации образцов в глицероле<sup>13</sup>.

Мы также проверили возможность визуализации NowGFP в теплокровных организмах. Нами была создана стабильная линия клеток HeLa, экспрессирующая NowGFP в цитоплазме. Мы использовали клетки этой линии для заражения голых мышей и снимали выросшие опухоли с помощью FLIM-микроскопии. Флуоресценция NowGFP легко детектировалась сквозь кожу мыши, а время жизни флуоресценции опухолей, экспрессирующих NowGFP, составило около 4.6 нс. Отметим, что время жизни EGFP в похожих моделях составляет 2.8 нс.

Описанные выше эксперименты показывают, что NowGFP действительно может быть использован в качестве метки для FLIM-микроскопии как *in vitro*, так и *in vivo*. Более того, NowGFP открывает новый временной канал для мультипараметрического имаджинга вместе с EGFP и другими флуоресцентными белками.

## **2.7. NowGFP в качестве донора при ферстеровском резонансном переносе энергии**

Долгое время жизни флуоресценции NowGFP позволяло предположить, что его использование в качестве донора в так называемых FRET-FLIM сенсорах может увеличить динамический диапазон таких сенсоров. Действие FRET-FLIM сенсоров основано на изменении эффективности ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) между двумя красителями при изменении концентрации аналита. При возрастании эффективности FRET время жизни флуоресценции красителя-донора сокращается, что детектируется с помощью микроскопии времени жизни флуоресценции (FLIM). Одним из основных преимуществ такого подхода является независимость сигнала от концентрации сенсора, различий в фотостабильности донора и акцептора энергии, а также в отсутствии необходимости сложной калибровки системы перед измерениями.

Совместно с нами в Технологическом университете Тампере (Tampere University of Technology, Тампере, Финляндия) на основе белка NowGFP была получена панель зелено-красных FRET-сенсоров для микроскопии времени жизни флуоресценции. Было обнаружено, что варианты, основанные на парах белков NowGFP-TdTomato и NowGFP-mRuby2, обладают высоким динамическим диапазоном, а пара NowGFP-TdTomato — наибольшим ферстеровским радиусом среди всех опубликованных сенсоров на основе флуоресцентных белков (6.57 нм). Полученные результаты демонстрируют перспективность использования NowGFP в качестве основы для построения генетически кодируемых сенсоров.

---

<sup>13</sup>Время жизни флуоресценции обратно зависит от локального показателя преломления: чем больше показатель преломления, тем короче регистрируемое время жизни флуорофора.

### 3. Заключение

За время, которое прошло с получения основных результатов настоящей работы до момента написания диссертации, было проведено несколько исследований, основанных на описанных в этой работе результатах.

Для WasCFP методами компьютерного моделирования предсказано, что белок может находиться в сольватированном переходном состоянии, характеризуемом частично открытым  $\beta$ -бочонком. Доля заселенности этого состояния растет с 12% до 53% при возрастании pH от 6.1 до 8.1. Авторы работы предположили, что изменение заселенности переходного состояния отражает изменения спектров поглощения, вызываемые сдвигами pH. Таким образом, по их мнению, энергетические затраты на ионизацию остатка триптофана в хромофоре компенсируются не только стабилизирующей заменой V61K, но также локальным сольватированием ионизуемого участка и подвижностью  $\beta$ -бочонка. Полученные данные являются первым свидетельством того, что переходные конформационные состояния могут контролировать оптические свойства флуоресцентных белков <sup>1</sup>.

Также на основе пары белков NowGFP и EGFP совместно с Университетом Амстердама (University of Amsterdam, Амстердам, Нидерланды) нами разработан одноцветный зеленый вариант сенсора клеточного деления FUCCI, позволяющий производить определение фазы клеточного цикла по времени жизни флуоресценции. В отличие от опубликованной версии сенсора FUCCI, полученный нами вариант при визуализации занимает лишь один канал флуоресцентного микроскопа и дает возможность одновременной визуализации клеточных процессов и структур.

---

<sup>1</sup>См. работу Laricheva et al., «pH-dependent Transient Conformational States Control Optical Properties of Cyan Fluorescent Protein», JACS 2015.

## 4. Выводы

1. Методами рационального дизайна и направленной молекулярной эволюции впервые созданы флуоресцентные белки с хромофорами на основе триптофана, находящимися в анионном состоянии при физиологических условиях.
2. Полученные зеленые флуоресцентные белки WasCFP и NowGFP обладают наибольшим среди флуоресцентных белков временем жизни флуоресценции (5.1 нс), а FRET-пары на основе NowGFP — широким динамическим диапазоном и наибольшим ферстеровским радиусом среди описанных к настоящему времени пар флуоресцентных белков.
3. Обнаружен новый тип фотоконверсии флуоресцентных белков, сопровождающийся сменой флуоресценции с зеленой на голубую.
4. На основе биохимических и кристаллографических данных предложен единый механизм, описывающий спектральные свойства белков WasCFP и NowGFP при изменении pH и фотоконверсии.
5. Показано, что белок NowGFP позволяет использовать дополнительный временной канал для микроскопии времени жизни флуоресценции, обеспечивая возможность одновременной визуализации с другими зелеными флуоресцентными белками.



## 5. Работы, опубликованные по теме диссертации

1. Karen S. Sarkisyan, Ilia V. Yampolsky, Kyril M. Solntsev, Sergey A. Lukyanov, Konstantin A. Lukyanov and Alexander S. Mishin. *"Tryptophan-based chromophore in fluorescent proteins can be anionic."* Scientific Reports, 2012; 2:608, doi: 10.1038/srep00608
2. Karen S. Sarkisyan, Alexander S. Goryashchenko, Dmitry A. Gorbachev, Peter V. Lidsky, Nina G. Bozhanova, Andrey Yu. Gorokhovatsky, Alina R. Pereverzeva, Alina P. Ryumina, Victoria V. Zherdeva, Alexander S. Savitsky, Kyril M. Solntsev, Andreas S. Bommarius, George V. Sharonov, Konstantin A. Lukyanov and Alexander S. Mishin. *"Green fluorescent protein with anionic tryptophan-based chromophore and long fluorescence lifetime."* Biophysical Journal, 2015; 109(2):380-9 doi: 10.1016/j.bpj.2015.06.018
3. Vladimir Z. Pletnev, Nadya V. Pletneva, Karen S. Sarkisyan, Alexander S. Mishin, Konstantin A. Lukyanov, Ekaterina A. Goryacheva, Rustam H. Ziganshin, Zbigniew Dauter and Sergei Pletnev. *"Crystal structure of green fluorescent protein NowGFP with an anionic tryptophan-based chromophore."* Acta Crystallographica D, 2015; 71:1699-1707 doi: 10.1107/S1399004715010159
4. Bobin George Abraham, Karen S. Sarkisyan, Alexander S. Mishin, Ville Santala, Nikolai V. Tkachenko, Matti Karp. *"Fluorescent protein based FRET pairs with improved dynamic range for fluorescence lifetime measurements."* PLOS One, 2015; 10:e0134436 doi: 10.1371/journal.pone.0134436