

Федеральное агентство научных организаций (ФАНО России)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской Академии Наук

На правах рукописи

Саркисян Карен Сергеевич

**Флуоресцентные белки**  
**с анионным хромофором на основе триптофана**  
специальность 03.01.03 (молекулярная биология)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук  
Лукьянов Константин Анатольевич

Москва, 2015

# Оглавление

<b>1 Введение</b>	<b>4</b>
<b>2 Обзор литературы</b>	<b>5</b>
2.1 Взаимодействия полярных аминокислот в белках . . . . .	6
2.1.1 Причины, приводящие к изменениям $pK_a$ боковых групп аминокислот . . . . .	6
2.1.2 Заряд-зарядовые взаимодействия . . . . .	7
2.1.3 Заряд-дипольные взаимодействия . . . . .	7
2.1.4 Эффекты десольватирования . . . . .	9
2.1.5 Погружение заряженных аминокислот в белковую глобулу . . . . .	10
2.1.6 Возможность ионизации остатка триптофана в нативных белках . . . . .	13
2.2 Флуоресцентные белки . . . . .	15
2.2.1 Пространственная структура флуоресцентных белков . . . . .	16
2.2.2 Вторичные структуры и топология бочонка . . . . .	16
2.2.3 Фолдинг флуоресцентного белка . . . . .	17
2.2.4 Формирование хромофора . . . . .	18
2.2.5 Аминокислоты, катализирующие формирование хромофора . . . . .	19
2.2.6 Структуры хромофоров природных флуоресцентных белков . . . . .	20
2.2.7 Хромофоры флуоресцентных белков, полученных в биотехнологии . . . . .	22
2.2.8 Влияние аминокислотного окружения на спектральные свойства флуоресцентного белка . . . . .	23
<b>3 Материалы и методы исследования</b>	<b>26</b>
3.0.9 Амплификация ДНК и анализ продуктов амплификации . . . . .	26
3.0.10 Создание библиотек случайных мутантов для направленной эволюции . . . . .	26
3.0.11 Направленный мутагенез кодирующей последовательности белков . . . . .	28

3.0.12	Электрическая трансформация клеток <i>E. coli</i> (электропорация) . . . . .	31
3.0.13	Химическая трансформация клеток <i>E.coli</i> . . . . .	32
3.0.14	Выделение плазмидной ДНК . . . . .	32
3.0.15	Секвенирование плазмидной ДНК . . . . .	33
3.0.16	Экспрессия и очистка рекомбинантных белков . . . . .	33
3.0.17	Измерение спектров поглощения и флуоресценции . . . . .	33
3.0.18	pH-титрование . . . . .	34
3.0.19	Титрование мочевиной . . . . .	34
3.0.20	Компьютерное моделирование . . . . .	34
3.0.21	Временная экспрессия в эукариотических клетках . . . . .	34
3.0.22	Флуоресцентная микроскопия . . . . .	35
3.0.23	Обработка данных . . . . .	35
<b>4</b>	<b>Результаты и обсуждение</b>	<b>36</b>
4.1	Ионизация хромофора на основе триптофана в нативном белке . . . . .	37
4.1.1	Выбор модельного белка для проведения мутагенеза . . . . .	37
4.1.2	Выбор позиций для мутагенеза . . . . .	39
4.1.3	Получение мутантов mCerulean методом направленного мутагенеза . . . . .	39
4.1.4	Случайный мутагенез белка mCerulean V61K . . . . .	40
4.1.5	Случайный мутагенез белка mCerulean V61K D148G Y151N . . . . .	41
4.1.6	Спектральные характеристики WasCFP . . . . .	41
4.1.7	Зависимость спектров поглощения WasCFP от температуры . . . . .	46
4.1.8	Зависимость спектров поглощения WasCFP от pH . . . . .	46
4.1.9	Зависимость спектров флуоресценции от pH . . . . .	46
4.1.10	Зависимость спектров поглощения WasCFP от концентрации мочевины . . . . .	49
4.2	Интерпретация спектральных свойств WasCFP . . . . .	50
4.2.1	Являются ли пики на 495 нм и 458 нм пиками поглощения одной формы белка? . . . . .	50
4.2.2	Что происходит с белком при значениях pH ниже 6? . . . . .	50
4.2.3	Почему положения изобестических точек для температурной и pH-зависимостей спектров поглощения отличаются? . . . . .	50
4.2.4	Почему увеличивается оптическая плотность в области поглощения длинноволновой формы при увеличении концентрации мочевины? . . . . .	51

4.2.5	Почему длинноволновая форма белка исчезает при высоких рН (рК = 10.5)? . . .	51
4.2.6	Чем объясняется зависимость спектров поглощения от рН? . . . . .	51
4.2.7	Чем объясняется зависимость спектров поглощения от температуры? . . . . .	51
4.2.8	Соответствует ли длинноволновый пик поглощения молекулам белка с ионизованным хромофором? . . . . .	51
4.2.9	Предполагаемые структурные основы наблюдаемых явлений . . . . .	53
4.3	WasCFP в качестве метки для флуоресцентной микроскопии . . . . .	55
4.4	Получение белка со стабильной анионной формой хромофора . . . . .	57
4.4.1	Направленная эволюция WasCFP с отбором на яркость и стабильность анионной формы . . . . .	57
4.4.2	Спектральные характеристики NowGFP . . . . .	57
4.4.3	Фотопереключения NowGFP . . . . .	59
4.5	Кристаллографическое исследование NowGFP . . . . .	61
4.6	NowGFP в качестве метки для флуоресцентной микроскопии . . . . .	62
4.7	NowGFP в качестве метки для микроскопии времени жизни флуоресценции . . . . .	66
4.8	NowGFP в качестве донора при ферстеровском резонансном переносе энергии . . . . .	68
<b>5</b>	<b>Заключение</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Выводы</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Сокращения, научный жаргон и переводные термины</b>	<b>72</b>



# 1. Введение

Функциональность белков определяется входящими в их состав химическими группами. Используя ограниченный набор химических групп стандартных двадцати аминокислот, ферменты катализируют очень разные по механизмам химические реакции, в которых эти группы могут выступать в роли нуклеофильных, электрофильных или кислотно-основных катализаторов.

Считается, что многофункциональность химических групп достигается за счет разной степени их протонирования, а каталитическая активность белка, как следствие, — за счет стабилизации определенного состояния химической группы в активном центре [1, 2]. Стабилизация того или иного состояния осуществляется в белке с помощью локальных взаимодействий с окружающими аминокислотами.

В настоящей работе мы предприняли попытку достигнуть ранее не описанного и маловероятного состояния индольного фрагмента остатка триптофана — его ионизации в молекуле белка при физиологических условиях. Идея работы возникла при анализе результатов рН-титрования химического аналога хромофора циановых флуоресцентных белков, синтезированного в группе И.В. Ямпольского (Группа синтеза природных соединений ИБХ РАН). Титрование показало, что при сильном защелачивании в спектрах поглощения этого соединения возникает сдвиг, свидетельствующий о его ионизации по остатку триптофана. Нас заинтересовала возможность достижения подобной ионизации внутри нативного белка, и настоящая работа посвящена проверке этого предположения.

В качестве модельного объекта мы выбрали циановый флуоресцентный белок mCerulean. Триптофан-66 в mCerulean участвует в посттрансляционной серии внутримолекулярных реакций, приводящих к формированию в белке протяженной ароматической структуры — хромофора. С помощью направленного мутагенеза мы поместили в разные участки mCerulean остатки лизина и аргинина, ожидая, что их положительно заряженные боковые цепи смогут стабилизировать анионное состояние триптофана-66 в хромофоре. В настоящей работе подробно рассматриваются свойства полученных нами мутантных белков и возможность их практического применения во флуоресцентной микроскопии.

## 2. Обзор литературы

Обзор литературы состоит из двух частей. В первой из них автор постарался проанализировать накопленные знания о взаимных эффектах, которые полярные аминокислоты оказывают друг на друга, находясь в белковой глобуле. В этой части рассматриваются как общие электростатические эффекты в белках, так и непосредственно относящиеся к данной работе эффекты погружения остатков лизина и аргинина внутрь белковой глобулы. Первая часть завершается анализом возможности ионизации остатка триптофана в нативном белке.

Вторая часть обзора литературы посвящена флуоресцентным белкам. В ней изложены история изучения флуоресцентных белков, сведения о пространственной структуре, фолдинге, механизмах формирования хромофора и типах формируемых хромофоров. В конце второй части приводятся краткие сведения о взаимодействиях хромофора с аминокислотным окружением.

## 2.1. Взаимодействия полярных аминокислот в белках

Ферменты катализируют разнообразные по механизмам реакции, используя небольшое количество химических групп, входящих в состав двадцати стандартных аминокислот. В большинстве случаев лишь одиннадцать из двадцати — полярные и заряженные аминокислоты — напрямую участвуют в катализе [3].

В состав боковых цепей полярных аминокислот входят семь различных химических групп: имидазольная (гистидин), гуанидиновая (аргинин), аминная (лизин), карбоксильная (глутаминовая и аспарагиновая кислоты), амидная (глутамин и аспарагин), гидроксильная (серин, треонин и тирозин) и тиольная (цистеин) группы [4]. Ферменты также используют в катализе ионы металлов, молекулы воды и различные кофакторы — однако разнообразие каталитических возможностей возникает не столько из разнообразия химических групп, сколько из их способности, взаимодействуя друг с другом, менять свои химические свойства. Большинство из перечисленных семи функциональных групп способны выступать в роли нуклеофильных, электрофильных или кислотно-основных катализаторов в зависимости от степени своей ионизации [1].

В белках легкость ионизации группы определяется ее природой (собственным значением  $pK_a$ ) и взаимодействиями с аминокислотным микроокружением, которое формируется вокруг нее в белковой глобуле. Взаимодействия с частично или полностью заряженными атомами микроокружения могут привести к значительному сдвигу  $pK_a$  группы — превышающему в некоторых случаях 8 единиц [5].

В этой части Обзора литературы мы кратко рассмотрим накопленные сведения о взаимодействиях полярных и заряженных аминокислот в белках, перечислим основные причины, приводящие к изменениям в  $pK_a$  боковых цепей аминокислот, и подробно остановимся на эффектах погружения положительно заряженных аминокислот в гидрофобное ядро белка. В заключение мы рассмотрим известные на сегодняшний день данные о взаимодействиях, в которые вступает триптофан, и о ионизации триптофана.

### 2.1.1. Причины, приводящие к изменениям $pK_a$ боковых групп аминокислот

Необычные сдвиги  $pK_a$  химических групп, стабилизируемые в белках, во многих исследованных примерах являются необходимыми для функционирования этих белков. Как правило, стабилизация необычных значений  $pK_a$  используется в активных центрах ферментов [6], в различных биологических системах, связанных с переносом протонов и электронов (например, в АТФазах [7] и цитохром-оксидазах [8]), а также в системах, связанных с поддержанием осмотического гомеостаза [9, 10] и прохождением светозависимых процессов [11, 12].

Причины, приводящие к сдвигам  $pK_a$ , имеют электростатическую природу, и могут быть разделены на три категории: заряд-зарядовые взаимодействия, заряд-дипольные взаимодействия и эффекты десольватирования. Ниже мы рассмотрим каждую категорию более подробно.

### 2.1.2. Заряд-зарядовые взаимодействия

Заряд-зарядовые взаимодействия возникают при близком расположении двух ионизуемых групп в белковой глобуле. В этом случае величина сдвига  $pK_a$  определяется силой электростатических взаимодействий между ионизуемыми группами. Согласно закону Кулона<sup>1</sup>, эта сила зависит от величины взаимодействующих зарядов, расстояния между ними и диэлектрической проницаемости среды [13]. Последнее, в частности, означает, что в белковой глобуле (где значение диэлектрической проницаемости ниже, чем в водном растворе) эффекты заряд-зарядовых взаимодействий проявляются значительно сильнее.

Рассмотрим несколько сценариев, которые могут быть реализованы при взаимодействии, например, ионизуемой каталитической группы фермента с расположенной в непосредственной близости заряженной группой.

- Если обе группы в ионизованной форме *депротонированы и заряжены отрицательно*, на них действуют Кулоновские силы отталкивания. В этом случае значения  $pK_a$  обеих групп будут возрастать, облегчая их протонирование и нейтрализацию и снижая тем самым энергию системы [1]. В качестве примера подобных взаимодействий можно привести повышение  $pK_a$  Glu172 с 4.0 до 6.7 в активном центре ксиланазы *Bacillus circulans* [14], а также сдвиги  $pK_a$  отрицательно заряженных аминокислот в активных центрах РНКазы Н1 [15], пепсин-подобных аспарагиновых протеаз и лизоцима из белка куриных яиц [1].
- Аналогичным образом, если в ионизованной форме обе группы *протонированы и заряжены положительно*, значения их  $pK_a$  будут понижаться, способствуя депротонированию. Примером такой ситуации является понижение  $pK_a$  Lys116 в активном сайте ацетоацетат-декарбоксилазы более, чем на 4 единицы [16].
- Наконец, *если одна из групп заряжена положительно, а другая — отрицательно*, то положительно заряженная группа будет снижать  $pK_a$  отрицательно заряженной, и наоборот, — поддерживая сосуществование противоположно заряженных групп. Такие взаимодействия обнаружены в активном центре цистеиновых протеиназ [17], белка ArsC [18], аланиновой рацемазы [19, 20] и UDP-галактоза-4-эпимеразы [21].

### 2.1.3. Заряд-дипольные взаимодействия

Заряд-дипольные взаимодействия в белках, как правило, связаны с формированием водородной связи или расположением ионизуемой группы на конце альфа-спирали.

---

<sup>1</sup> В векторном виде в формулировке Ш. Кулона закон записывается следующим образом:  $\vec{F}_{12} = k \cdot \frac{q_1 \cdot q_2}{r_{12}^2} \cdot \frac{\vec{r}_{12}}{r_{12}}$ , где  $\vec{F}_{12}$  — сила, с которой заряд 1 действует на заряд 2;  $q_1$  и  $q_2$  — величина зарядов;  $\vec{r}_{12}$  — радиус-вектор (вектор, направленный от заряда 1 к заряду 2, и равный по модулю расстоянию между зарядами —  $r_{12}$ );  $k$  — коэффициент пропорциональности.

## Эффекты, связанные с формированием водородных связей

Ионируемая группа может взаимодействовать с частичными зарядами и микроскопическими диполями, которые образуются в полярных остатках и связанных молекулах воды, через формирование водородной связи. Для этого необходимо, чтобы один из взаимодействующих атомов (донор) обладал слабыми кислотными свойствами, а другой (акцептор) — слабыми основными [1].

В зависимости от расстояния между взаимодействующими атомами, длина нормальной или слабой водородной связи лежит в пределах от 2.7 до 3.0 ангстрем. Энергия, высвобождающаяся при образовании водородной связи (от -1 до -3 ккал/моль), может быть потрачена на увеличение  $pK_a$  донора и одновременно — на энергетически эквивалентное уменьшение  $pK_a$  акцептора водородной связи. Такие эффекты описаны для активных центров аспартатаминотрансферазы [22] и креатинкиназы [20].

Формирование водородной связи может повлиять и на  $pK_a$  более удаленных атомов за счет стабилизации одной из таутомерных форм молекулы, как, например, в каталитическом центре сериновых протеаз [23].

В случае, когда  $pK_a$  взаимодействующих атомов очень близки, водородная связь может получиться необычно короткой (2.6 ангстрем), приводя к еще более существенным сдвигам  $pK_a$  (высвобождающаяся энергия в этом случае может превышать 7 ккал/моль) [24]. К примеру, в органических молекулах, относящихся к классу так называемых «протонных губок», две ионируемые группы оказываются стерически фиксированными в непосредственной близости друг от друга. Сильное электростатическое отталкивание приводит к снижению  $pK_a$  одной из групп, и протон оказывается крепко связанным между взаимодействующими атомами [25]. Высокоэнергетические короткие водородные связи широко встречаются и в белках [26], внося энергетический вклад как в общую стабилизацию структуры, так и непосредственно участвуя в функционировании белка (например, через стабилизацию промежуточных состояний реакций [27, 28]).

## Эффекты взаимодействий с альфа-спиралями

Другим распространенным в белках примером заряд-дипольных взаимодействий является взаимодействие альфа-спиралей с расположенным на их конце аминокислотным остатком. Альфа-спирали представляют собой макроскопические диполи, образующиеся за счет параллельного выравнивания полярных пептидных связей, формирующих спираль. В результате такого выравнивания атомы кислорода карбонильных групп оказываются ориентированными параллельно оси спирали и направленными в сторону ее С-конца, в то время как протоны амидных групп соединены водородной связью с карбонильными группами и направлены в сторону N-конца [1].

Такой набор ориентированных вдоль одной оси диполей создает на концах альфа-спирали частичные заряды, которые могут влиять на характеристики находящихся поблизости групп.

Величина наводимых зарядов составляет примерно +0.5 элементарного заряда на N-конце и -0,5 — на C-конце, что также влияет и на свойства концевых групп, как доноров и акцепторов водородных связей [1].

Эффекты влияния альфа-спирали на  $pK_a$  концевых аминокислотных остатков (необходимые для функционирования фермента) описаны для триозофосфатизомеразы [29, 30], белков семейства тиоредоксина [31] и некоторых тирозинфосфатаз [32].

#### 2.1.4. Эффекты десольватирования

Эффекты десольватирования проявляются во время фолдинга белка — при энергетически невыгодном переносе заряженной группы из гидрофильного растворителя (например, воды, где значение диэлектрической проницаемости составляет 78) в гидрофобное белковое окружение, в котором величина диэлектрической проницаемости оказывается существенно ниже<sup>2</sup> [33]. На основании изучения различных природных белков считается, что, в отсутствие дополнительных стабилизирующих взаимодействий с заряженной группой, внесение заряда приводит к резкой дестабилизации белковой глобулы [34, 35] (но см. работу [36]).

В соответствии с этим, неполярные аминокислотные остатки обычно находятся внутри белковой глобулы, а полярные и ионизируемые остатки, как правило, экспонированы на поверхности [37]. В структурах, в которых полярные и ионизируемые остатки все же встречаются внутри молекулы и — что важно — не имеют прямой связи с функционированием белка, заряженные группы боковых цепей в большинстве случаев стабилизированы несколькими водородными связями и/или солевыми мостиками [38].

Так же как и другие зарядовые взаимодействия, эффект погружения заряженной группы в гидрофобное белковое окружение используется в ферментах для модулирования свойств тех или иных каталитически важных остатков [1]. Например, в случае кетостероидизомеразы повышение  $pK_a$  Tyr114 до значения, совпадающего с  $pK_a$  енольного кислорода, обеспечивает формирование прочной водородной связи и стабилизацию промежуточного состояния реакции [40]. Другие функционально важные сдвиги  $pK_a$ , связанные с изменением гидрофобности окружения заряженной группы, обнаружены в 4-оксалокротонаттаутомеразе [41], различных альдолазах антител [42] и фотоцикле бактериородопсина [43].

Более подробно эффекты погружения заряженных аминокислот внутрь белковой молекулы — в первую очередь, положительно заряженных лизина и аргинина, — будут рассмотрены в следующем разделе.

---

<sup>2</sup>Энергия переноса ионизируемой группы из воды в белковое окружение связана с диэлектрической проницаемостью внутри белковой глобулы, физическим размером заряженной группы, размером глобулы и соответствующими изменениями  $pK_a$  формализмом Борна — см. работу [39].

## 2.1.5. Погружение заряженных аминокислот в белковую глобулу

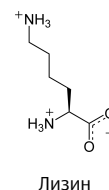
Накопленные на сегодняшний день данные об эффектах погружения положительно заряженных аминокислот в белки можно условно разделить на две группы. В первую входят результаты изучения природных белков, в которых встречаются погруженные в глобулу заряды. Вторую группу, значительно пополнившуюся за последние несколько лет, составляют исследования по помещению заряженных аминокислот в белки с помощью направленного мутагенеза. Среди них особенно важны оказались систематические работы, проведенные в группе Бертрана Гарсиа-Морено, в которых были аккуратно измерены эффекты погружения зарядов в каждую внутреннюю аминокислотную позицию стафилококковой нуклеазы — классического объекта в этой области исследований. Работы Гарсиа-Морено позволили по меньшей мере качественно ответить на вопрос о том, насколько толерантность белков к погруженным зарядам требует предсуществующей электростатической оптимизации белка, и насколько сильно отличаются эффекты погружения разных аминокислот.

В настоящей работе мы проводили замены по внутренним аминокислотным позициям во флуоресцентном белке на лизин и аргинин, в связи с чем на следующих страницах хотим подробно остановиться на эффектах погружения лизина и аргинина в белковую глобулу.

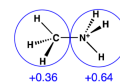
### Лизин, погруженный в белковую глобулу

Внутренние остатки лизина, обнаруженные в структурах природных белков, часто претерпевают значительные изменения  $pK_a$  аминогруппы боковой цепи молекулы. Помимо уже упоминавшегося примера с понижением  $pK_a$  Lys116 в активном сайте ацетоацетат-декарбоксилазы более чем на 4 единицы [16], изменение  $pK_a$  внутренних остатков лизина известно для альдолазы антител [42], бактериородопсина [44, 45], аспартат-аминотрансферазы [22], стафилококковой нуклеазы [46] и ряда других белков.

Лизин несет сравнительно компактную заряженную группу<sup>3</sup>, и потому энергия его погружения в белковую глобулу велика (например, по сравнению с глутаматом). Наиболее систематические сведения о состоянии лизина в гидрофобном окружении белка на данный момент принесла работа Хармса с соавторами, в которой замены на лизин были внесены в каждую внутреннюю позицию стафилококковой нуклеазы, и в полученных мутантах было измерено значение  $pK_a$  лизина [36]).



<sup>3</sup> Автор считает важным упомянуть, что формальный заряд, изображаемый на атоме азота аминогруппы лизина, не означает, что атом азота положительно заряжен — атом азота более электроотрицателен, чем атомы углерода и водорода, с которыми он связан, и потому заряжен отрицательно. В боковой группе лизина положительный заряд сосредоточен на атомах водорода аминогруппы, а также — что важно — сравнимый по величине положительный заряд несет соседняя с аминогруппой CH<sub>2</sub>-группа. Последнее, в частности, объясняет почему более половины остатков лизина вступают в пикатионные взаимодействия не аминогруппой, а соседней CH<sub>2</sub>-группой.



Из двадцати пяти внутренних позиций в стафилококковой нуклеазе лишь в шести замена на лизин не привела к значительному изменению его  $pK_a$ . Авторы замечают, что в этих позициях остатки лизина могут быть частично экспонированы на поверхность белковой глобулы, или быть вовлеченными в динамические процессы, проводя определенную долю времени в высокополярном микроокружении (что было показано ими ранее для Lys38 [36]).

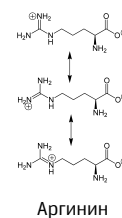
В девятнадцати оставшихся позициях  $pK_a$  лизина оказалось пониженным по сравнению с его  $pK_a$  в воде — в соответствии с уже известными для природных белков значениями  $pK_a$  внутренних остатков лизина [16]. Некоторые измеренные авторами значения оказались понижены более, чем на пять единиц, являясь наиболее низкими значениями  $pK_a$ , зарегистрированными для остатков лизина в белках.

Авторы работы вычислили также свободную энергию Гиббса, затрачиваемую на погружение положительного заряда внутрь стафилококковой нуклеазы. Для разных позиций в белки эти значения составили от 1.5 до 6.9 ккал/моль — согласуясь с измеренными ими ранее значениями для помещения в те же позиции отрицательных зарядов [47]. Полученные значения свободной энергии крайне интересны<sup>4</sup>. Во-первых, они демонстрируют неожиданную способность белков к стабилизации зарядов внутри гидрофобной глобулы. Во-вторых, позволяют оценить минимальную термодинамическую стабильность, которой должен обладать белок, чтобы оставаться хотя бы частично сфолдированным, когда внутренние аминокислотные остатки становятся заряженными в результате выполнения белком своей функции.

Последнее утверждение интересно и с точки зрения возможных путей эволюции белков, функция которых зависит от наличия внутренних зарядов. В частности, авторы предположили, что ферменты могли эволюционировать путем случайных внесений ионизируемых групп в высокостабильные гидрофобные структуры — без необходимости предварительного возникновения в белке стабилизирующего микроокружения.

#### Аргинин, погруженный в белковую глобулу

Аргинин является наиболее часто встречаемой заряженной аминокислотой внутри белковой глобулы [49]. С точки зрения погружения в белковую глобулу положительного заряда, аргинин отличается от лизина тем, что обладает большим значением  $pK_a$  и имеет более протяженную боковую цепь, а заряд на гуанидиновой группировке менее локализован, чем на аминогруппе лизина — делая его более слабой кислотой, чем протонированный лизин. До 2011 года, однако, было опубликовано лишь две работы, в которых прямо измеряется  $pK_a$  аргинина в гидрофобном окружении белковой глобулы. Обе работы проведены на остатках аргинина внутри белковых каналов, и в обоих случаях остатки аргинина обнаружены в нейтральном состоянии [50, 51] — то



<sup>4</sup>Для сравнения, разрыв одной водородной связи во вторичной структуре стоит белку порядка 1.5-2.0 ккал/моль [48]



есть со значительно измененным значением  $pK_a$ .

В 2011 году было опубликовано еще одно исследование группы Гарсиа-Морено, продолжающее серию работ по погружению заряженных аминокислот в белки [49]. В нем был проведен систематический анализ замен всех внутренних позиций в стафилококковой нуклеазе на аргинин. Вопреки ожиданиям, в результате исследования авторы обнаружили, что в отличие от замен на глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту и лизин, помещение аргинина внутрь стафилококковой нуклеазы практически не приводит к изменениям его  $pK_a$ . Во всех внутренних позициях стафилококковой нуклеазы боковая цепь аргинина оставалась протонированной даже при pH 10.

Одним из объяснений обнаруженного эффекта может быть «слишком» большое значение  $pK_a$ , требующее больших энергетических затрат для депротонирования аргинина в физиологическом диапазоне pH и потому не создающее соответствующего минимума на энергетическом ландшафте белка [49]. Расшифровка кристаллографических структур мутантов стафилококковой нуклеазы с внутренними остатками аргинина позволила предположить другую возможную причину, стоящую за способностью аргинина оставаться протонированным в нетолерантном к зарядам микроокружении. Структуры показали, что заряженная гуанидиновая группировка оказывается стабилизирована многочисленными водородными связями с полярными атомами белка и связанными молекулами воды: вероятно, способность к такой стабилизации объясняется длиной и гибкостью боковой цепи аргинина, позволяющей ей найти в молекуле белка стабилизирующее микроокружение. Отметим, что предложенные объяснения не являются взаимоисключающим.

Неожиданная способность аргинина оставаться заряженным внутри белка объясняет важную роль внутренних остатков аргинина в белках, где погруженные в гидрофобное окружение или липидный бислой заряды необходимы для выполнения белком своей функции.

### 2.1.6. Возможность ионизации остатка триптофана в нативных белках

В отличие от полярных аминокислот, боковая цепь триптофана традиционно считается нетитруемой в нативном белке [1] и, следовательно, неионизируемой в физиологическом диапазоне pH<sup>5</sup>. В приводимых в литературе таблицах, суммирующих данные о pK<sub>a</sub> боковых цепей аминокислот, триптофан никогда не указывается в качестве ионизируемого остатка. Свободный индол имеет pK<sub>a</sub> 16.2 [52] в воде и 21.1 в диметилсульфоксиде (ДМСО) [53].

Нам не удалось найти в литературе ни одного свидетельства ионизации остатка триптофана в нативных белках. В то же время, известно несколько типов взаимодействий триптофана, о которых автор хотел бы упомянуть.

#### Взаимодействия индольного фрагмента триптофана в нативных белках

Несмотря на то, что ионизация триптофана в нативных белках не описана, известно, что индольный фрагмент триптофана образует водородные связи и чувствителен к полярности аминокислотного окружения [57]. В частности, спектры флуоресценции триптофана претерпевают bathochromный сдвиг порядка 35-40 нм при переходе из неполярного окружения в полярное (Рисунок 2.1).

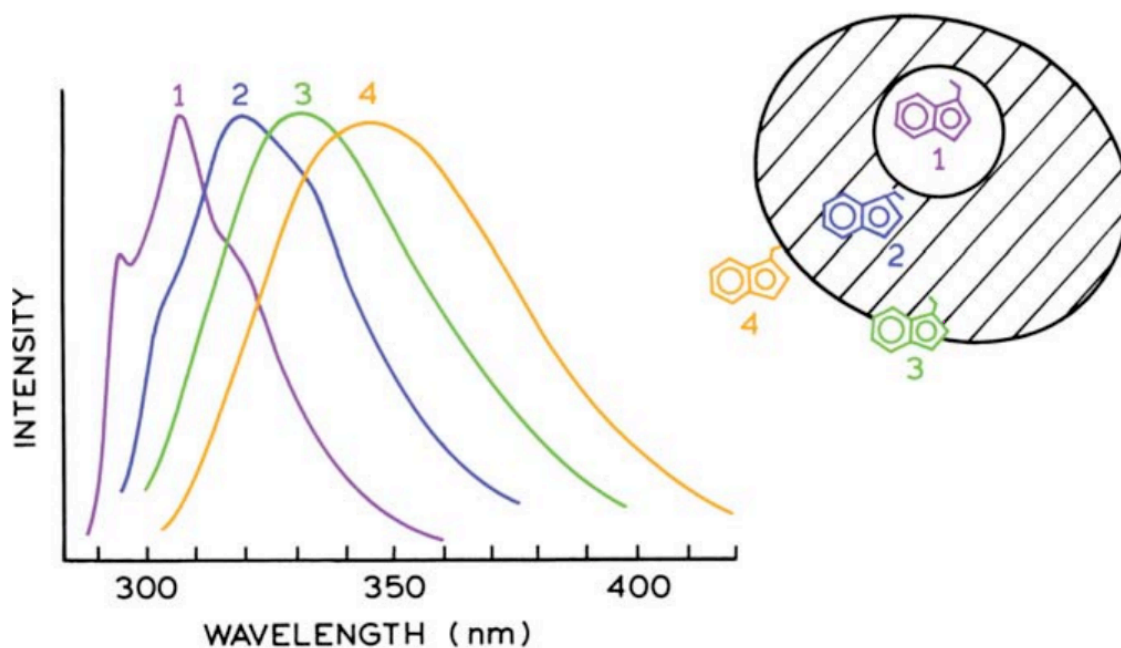
Триптофан в белках также вступает в пи-катионные взаимодействия ( $\pi$ -cation interactions). Пи-катионные взаимодействия представляют собой нековалентные взаимодействия между богатой электронной плотностью пи-системой (чаще — ароматической системой) и положительно заряженной частицей — ионом металла, ионом аммония или боковой цепью аминокислоты.

В белках пи-катионные взаимодействия проявляются, прежде всего, во взаимодействиях ароматических аминокислот с положительно заряженными аминогруппой лизина и гуанидиновой группой аргинина, а также при узнавании рецепторами положительно заряженных групп лигандов. Энергия пи-катионных взаимодействий в белках достигает 2-5 ккал/моль, делая их энергетически не менее значимыми, чем взаимодействия, образуемые через водородные связи и формирование ионных пар [58].

На основании анализа 593 кристаллографических структур негомологичных белков было обнаружено, что 25% всех триптофанов в белках участвуют в пи-катионных взаимодействиях [59]. Пи-катионные взаимодействия играют ключевую роль при связывании нейромедиаторов с их рецепторами, при узнавании белками «гистонового кода», в биосинтезе терпенов и других биологических процессах [58].

---

<sup>5</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 [54–56].



**Рис. 2.1:** Спектры эмиссии триптофана в зависимости от погруженности в белковую глобулу. Приведены спектры остатков триптофана апоазурина Pfl (1), рибонуклеазы T1 (2), стафилококковой нуклеазы (3) и глюкагона (4). Рисунок приведен из [57]

#### Известные примеры ионизации триптофана

Фотоионизация триптофана считается одним из основных процессов, обеспечивающих фотоокисление белков под действием интенсивного ультрафиолетового облучения [60]. Поглощая квант света, молекула триптофана распадается с образованием катион-радикала  $\text{TrpH}^{+\cdot}$  и сольватированного электрона. Этот процесс может происходить в результате тепловой ионизации из синглетного возбужденного состояния, триплетного состояния, крайне короткоживущего префлуоресцентного состояния, а также при двухфотонном поглощении [61].

Другой пример ионизации триптофана был обнаружен при исследовании свойств аминокислот методом спектроскопии проходящих электронов. В этой работе была показана возможность формирования стабильного анионного состояния индольного фрагмента триптофана в газовой фазе [62].

## 2.2. Флуоресцентные белки

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

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 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.

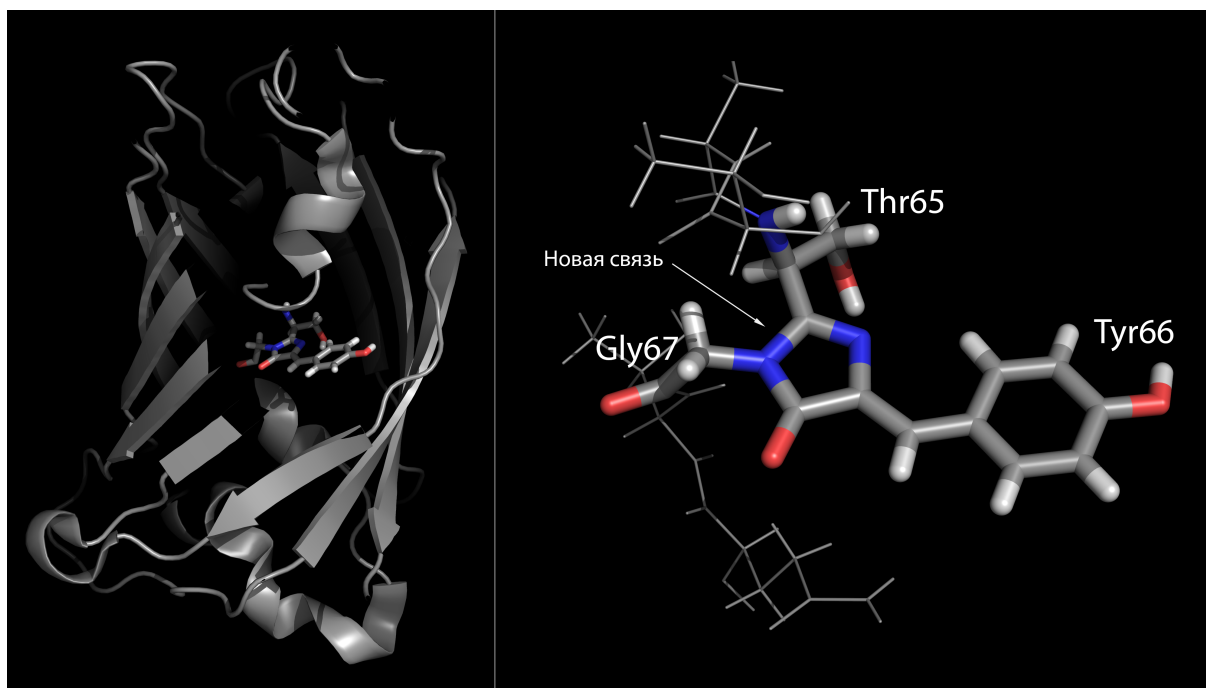
Первый флуоресцентный белок (зеленый флуоресцентный белок, GFP) был выделен в 1962 году Осаму Шимомурой из медузы *Aequorea victoria*<sup>6</sup> при изучении ее биолюминесценции [63]. Долгое время оставалось неизвестным, что хромофор GFP не является отдельно синтезируемым в клетках медузы кофактором, а формируется из собственных аминокислот белка в результате автокатализа. Лишь спустя 30 лет потенциал флуоресцентных белков для клеточной биологии был осознан, когда в 1992 году ген GFP был клонирован Дугласом Прашером [64], а в 1994 году Мартином Чалфи и коллегами было показано, что GFP может быть использован в качестве генетически кодируемой метки в гетерологических системах [65, 66]. Два годами позже появились первые кристаллические структуры GFP, прояснившие формирование хромофора и взаимодействия с окружающими аминокислотами [67, 68].

В последующие несколько лет в лаборатории Роджера Тсьена было обнаружено, что мутагенезом GFP можно получить спектрально отличающиеся мутанты с цветом флуоресценции от синего до желтого [69, 70]. Мутантов, флуоресцирующих в красной области спектра, получить не удавалось. В 1999 году Михаилом Матцем и коллегами было обнаружено, что флуоресцентные белки присутствуют не только в биолюминесцентных организмах, и первые красные флуоресцентные белки были клонированы из кораллов, существенно расширив палитру доступных флуоресцентных меток [71].

На сегодняшний день флуоресцентные белки обнаружены во многих эволюционных ветвях

---

<sup>6</sup>Названия природных флуоресцентных белков часто даются по сокращенному названию организма, из которого флуоресцентный белок был выделен. Так, зеленый флуоресцентный белок из *Aequorea victoria* обычно называют avGFP.



**Рис. 2.2:** Структура молекулы флуоресцентного белка и формируемого в ней хромофора.

многоклеточных животных (от кишечнорастворимых до хордовых) [72]. Для биотехнологических применений разработаны тысячи мутантных белков с различными свойствами, а кристаллографические разрешены более 350 структур различных флуоресцентных белков. Несмотря на огромный объем накопленной информации, биологическая роль флуоресцентных белков до сих пор остается неясной — неизвестно даже, связана ли эта роль с флуоресценцией.

В настоящем обзоре литературы мы не будем подробно останавливаться на существующих теориях о роли флуоресцентных белков в живых организмах и на эволюции этого белкового семейства — интересующимся этим вопросом стоит обратиться к прекрасному обзору Чудакова с соавторами [72]. Здесь мы подробно рассмотрим пространственную структуру флуоресцентных белков и различные типы формируемых ими хромофоров.

### 2.2.1. Пространственная структура флуоресцентных белков

Флуоресцентные белки состоят из 220-240 аминокислот и имеют молекулярную массу около 25 кДа. Несмотря на значительные отличия в аминокислотной последовательности, пространственная структура всех флуоресцентных белков очень консервативна. Флуоресцентные белки укладываются в бочонок из 11  $\beta$ -цепей. Внутри бочонка проходит протяженная центральная  $\alpha$ -спираль, а ее торцы формируются из петель и коротких альфа-спиральных участков. Хромофор образуется из остатков центральной альфа-спирали, прерывая ее примерно посередине (Рисунок 2.2). Размер бочонка составляет 2,4 x 4,2 нм.

### 2.2.2. Вторичные структуры и топология бочонка

C- и N-концы флуоресцентного белка расположены на одной из «крышек» бочонка. Вскоре после N-концевого неструктурированного «хвоста» флуоресцентный белок формирует короткую альфа-спираль, за которой следуют три  $\beta$ -цепи (в каждую  $\beta$ -цепь во флуоресцентном белке входит по 10-13 аминокислотных остатков, если не считать петель). После третьей  $\beta$ -цепи полипептидная цепь оказывается на противоположной «крышке» бочонка. Отсюда она входит внутрь бочонка, сворачиваясь в протяженную  $\alpha$ -спираль (аминокислотные остатки 56-72 в avGFP), из трех остатков которой образуется хромофор. Пройдя через весь бочонок,  $\alpha$ -спираль снова оказывается на стороне C- и N-концов белка, где прерывается и формирует еще две коротких альфа-спирали. На формирование перечисленных вторичных структур уходит чуть больше трети аминокислотных остатков (остатки 1-90). Остальные две трети полипептидной цепи формируют исключительно оставшиеся 8  $\beta$ -цепей и соединяющие их петли.

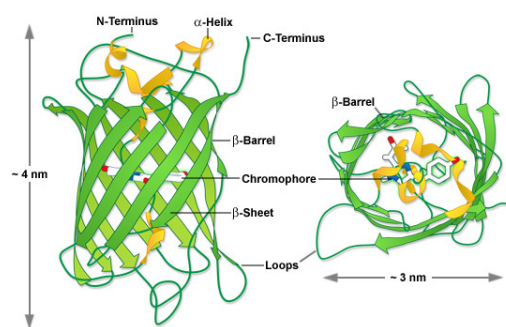


Рис. 2.3: Структура бета-бочонка

Важно отметить, что описанная топология бочонка не является обязательной для корректного фолдинга и флуоресценции белка. На сегодняшний день создано множество пермутированных вариантов белка с измененной топологией [72].

В целом, в состав  $\beta$ -слоев белка входят около 130 остатков, и еще около 35 остатков формируют  $\alpha$ -спирали. Оставшиеся 75 аминокислот, почти треть белка, образуют петли — эволюционно самые консервативные участки флуоресцентных белков.

### 2.2.3. Фолдинг флуоресцентного белка

Фолдинг флуоресцентного белка интересен, так как является примером плохоизученного фолдинга больших белковых доменов со сложной топологией, содержащих более 200 аминокислотных остатков. В последние годы понимание сворачивания GFP углубилось, благодаря как экспериментальным работам, так и компьютерному моделированию [73–83].

В 2012 году Редди и коллеги предложили количественную модель сворачивания GFP, хорошо согласующуюся и с экспериментальными, и с теоретическими данными [84]. Согласно этой модели, фолдинг GFP происходит на сложном энергетическом ландшафте, содержащем сеть взаимосвязанных промежуточных состояний, через которые процесс проходит к нативному состоянию (Рисунок 2.4). Ландшафт содержит как кинетические, так и равновесные промежуточные состояния, и локальные минимумы, в которых «застревают» также неправильно сфолдировавшиеся структуры.

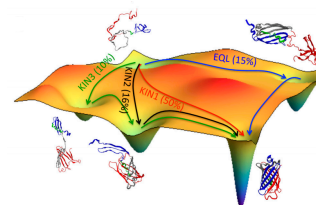


Рис. 2.4: Модель фолдинга флуоресцентного белка

На одном из мутантов avGFP (белке Citrine) Редди и коллеги показали, что сворачивание канали-

зировано и происходит преимущественно четырьмя путями разной заселенности. Сворачивание по наиболее заселенному пути (около 50% молекул) происходит двухэтапно. После синтеза происходит быстрое независимое сворачивание трех участков: сердцевины белка,  $\beta$ -слоев на N-конце белка и  $\beta$ -слоев на C-конце. Оно приводит к возникновению долгоживущего метастабильного состояния, в котором частично свернувшиеся участки путем диффузии и соударений наконец формируют нативную структуру, в соответствии с моделью сворачивания белка путем диффузии и соударений<sup>7</sup> [85].

Для различных белков время, которое занимает сворачивание, сильно отличается. В случае простых однодоменных белков с одноэтапным сворачиванием оно составляет микросекунды, но может занимать до минут и даже часов в случае белков, проходящих в сворачивании через цепь промежуточных состояний или требующих изомеризации пролина<sup>8</sup> [86]. GFP сворачивается с той же скоростью, что и большинство белков, — в течение нескольких миллисекунд [84]. Для появления флуоресценции, однако, помимо правильного сворачивания требуется созревание хромофора — процесс существенно более долгий.

#### 2.2.4. Формирование хромофора

Формирование хромофора представляет собой цепь последовательных химических реакций, приводящих к образованию протяженной ароматической структуры внутри белка. Реакции катализируются самим  $\beta$ -бочонком флуоресцентного белка и происходит после того, как общая структура бочонка сформировалась. Процесс занимает от 90 минут до 4 часов для avGFP [88] и зависит от ряда факторов — например, температуры и концентрации кислорода в среде.

Хромофор *зеленых*<sup>9</sup> флуоресцентных белков формируется из трех аминокислотных остатков в позициях 65, 66 и 67 в результате нескольких последовательных реакций. Точная последовательность этих реакций окончательно не выяснена даже для наиболее изученного белка avGFP [89], но, так или иначе, процесс включает в себя циклизацию полипептидной цепи по остаткам 65 и 67

---

<sup>7</sup>Этот процесс прекрасно иллюстрирует анимация, являющаяся дополнительным материалом к цитируемой статье Редди с соавторами. Анимацию можно найти в Интернете по адресу: <http://www.pnas.org/content/suppl/2012/07/02/1201808109.DCSupplemental/SM01.mpg>

<sup>8</sup>Пептидная связь имеет характер двойной связи и не допускает свободного вращения. Большинство пептидных связей в белках находятся в транс-конформации, прежде всего из-за стерических затруднений, возникающих между двумя  $\alpha$ -атомами в цис-изомерах. В пептидных связях, предшествующих пролину и другим N-замещенным аминокислотам, стерические затруднения существуют и в цис-, и в транс-изомерах, из-за чего заселенность обоих состояний сравнима.

Рибосома, однако, синтезирует пептиды только с транс-изомеризованным пролином, поэтому если цис-изомер пролина важен для правильного сворачивания, это может сильно замедлить фолдинг. В GFP два консервативных пролина находятся на одной из «крышек» бочонка и участвуют в формировании поворотов. Почти во всех известных структурах флуоресцентных белков структура связи перед Pro89 находится в цис-конформации, а связь перед Pro196 находится в транс-конформации [87]. По-видимому, для флуоресцентных белков изомеризация связи перед Pro89 не является этапом, ограничивающим скорость формирования третичной структуры.

с образованием имидазолонового кольца, его дегидратацию, а также окисление  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ -связи ароматической аминокислоты в положении 66 (Рисунок 2.5). Результатом этих реакций является образование бициклической сопряженной ароматической системы, протяженной, поляризованной и плоской достаточно, чтобы поглощать и испускать свет в видимой области спектра.

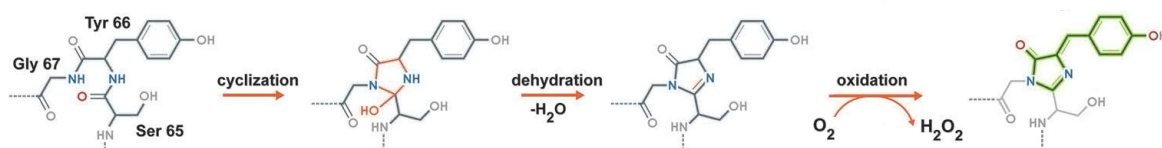


Рис. 2.5: Механизм образования GFP-подобного хромофора.

## 2.2.5. Аминокислоты, катализирующие формирование хромофора

Образование хромофора катализируется самой молекулой флуоресцентного белка. Ключевыми аминокислотными остатками, необходимыми для катализа, являются эволюционно консервативные Gly67, Arg96 и Glu222.

Gly67 абсолютно консервативен во всех флуоресцентных белках, способных к формированию хромофора, и является одной из аминокислот, входящих в зрелый хромофор. В незрелом белке благодаря Gly67 в альфа-спирали возникает излом, сближающий атом азота Gly67 и карбонильный атом аминокислоты в позиции 65. Считается, что помимо сближения реакционных групп, наличие излома уменьшает сеть водородных связей, которую необходимо разрушить при циклизации, снижая энергетический барьер реакции [88].

Два других каталитически важных аминокислотных остатка — Arg96 и Glu222 — также высококонсервативны, хотя известны примеры флуоресцентных белков, имеющих замены по этим положениям (как правило, на схожие аминокислоты - Arg96Lys<sup>10</sup> и Glu222Gln - [89, 90]). Предположительно, гуанидиновая группировка аргинина-96 взаимодействует с карбонильным атомом аминокислоты в позиции 66, стабилизируя его енольную форму, необходимую для циклизации. Глутамат222, хотя и прямо не взаимодействует с этим атомом, выступает в качестве основания, принимая протон карбонильного атома 66-ой аминокислоты по системе водородных связей - и также способствуя циклизации [89].

<sup>9</sup>Хромофоры *красных* флуоресцентных белков также формируются из остатков 65-67, но процесс включает созревания в себя дополнительные стадии. Анимация, хорошо иллюстрирующая описанные для зеленых хромофоров химические реакции, находится по адресу: <http://www.olympusconfocal.com/java/fpfluorophores/gfpfluorophore>, аналогичная анимация для красных хромофоров — по адресу: <http://www.olympusconfocal.com/java/fpfluorophores/dsredfluorophore>

<sup>10</sup>Отметим, правда, что время, которое требуется для созревания мутанта Arg96Lys, составляет несколько месяцев. Также отметим, что известны яркие и быстро созревающие флуоресцентные белки, содержащие замену Glu222Gly [91]. В этом



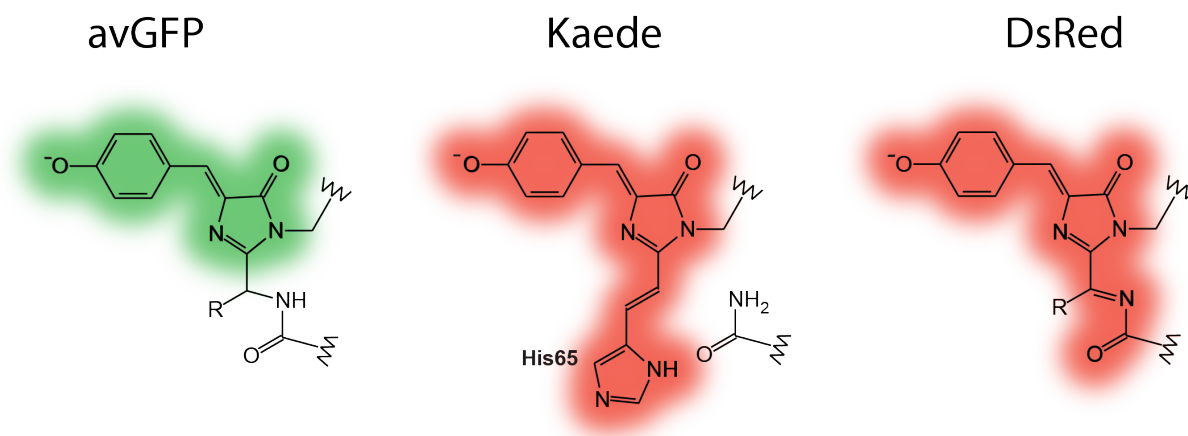


Рис. 2.6: Структуры хромофоров белков avGFP, Kaede и DsRed.

## 2.2.6. Структуры хромофоров природных флуоресцентных белков

Хромофоры, формирующиеся на основе остатка тирозина-66 по механизму, описанному выше, называют GFP-подобными. Свет, который излучают такие хромофоры (в ионизованном состоянии, см. ниже) лежит в «зеленой» области видимого спектра. Определенные изменения в аминокислотном окружении хромофора без каких-либо дополнительных ковалентных модификаций способны сдвигать спектры флуоресцентного белка с GFP-подобным хромофором в области более коротких или длинных волн, меняя цвет флуоресценции от голубого до желтого.

Однако красные белки на основе хромофора GFP, по-видимому, в природе не встречаются. Красная флуоресценция была достигнута в эволюции независимо несколькими путями, но так или иначе — путем увеличения числа атомов, вовлеченных в сопряженную ароматическую систему. В природе известно два основных типа «красных» хромофоров – это так называемые Kaede-подобные<sup>11</sup> и DsRed-подобные хромофоры (2.7). Оба молекулярных решения были найдены эволюцией в классе Anthozoa (кораллы) [72].

При формировании DsRed-подобного хромофора происходит дополнительное (по сравнению с GFP-подобным хромофором) окисление кислородом N-С $\alpha$ -связи 65-ой аминокислоты [93]. Образовавшаяся в результате окисления двойная связь (ацилиминная связь) оказывается вовлеченной в ароматическую систему хромофора.

---

случае катализ осуществляется молекулой воды, занимающей в структуре белка место боковой группы глутамата [92].

<sup>11</sup>При поиске изображений структур Kaede-подобных хромофоров в интернет-поисковиках вроде images.yandex.ru автор рекомендует вместо поискового запроса "Kaede" уточнять запрос поясняющими словами, например, "Kaede chromophore". По опыту автора, уточняющими словами также стоит дополнять поисковые запросы в случае поиска изображений, связанных с участвующим в апоптозе белком Bax, а также с флуоресцентным белком KillerRed.

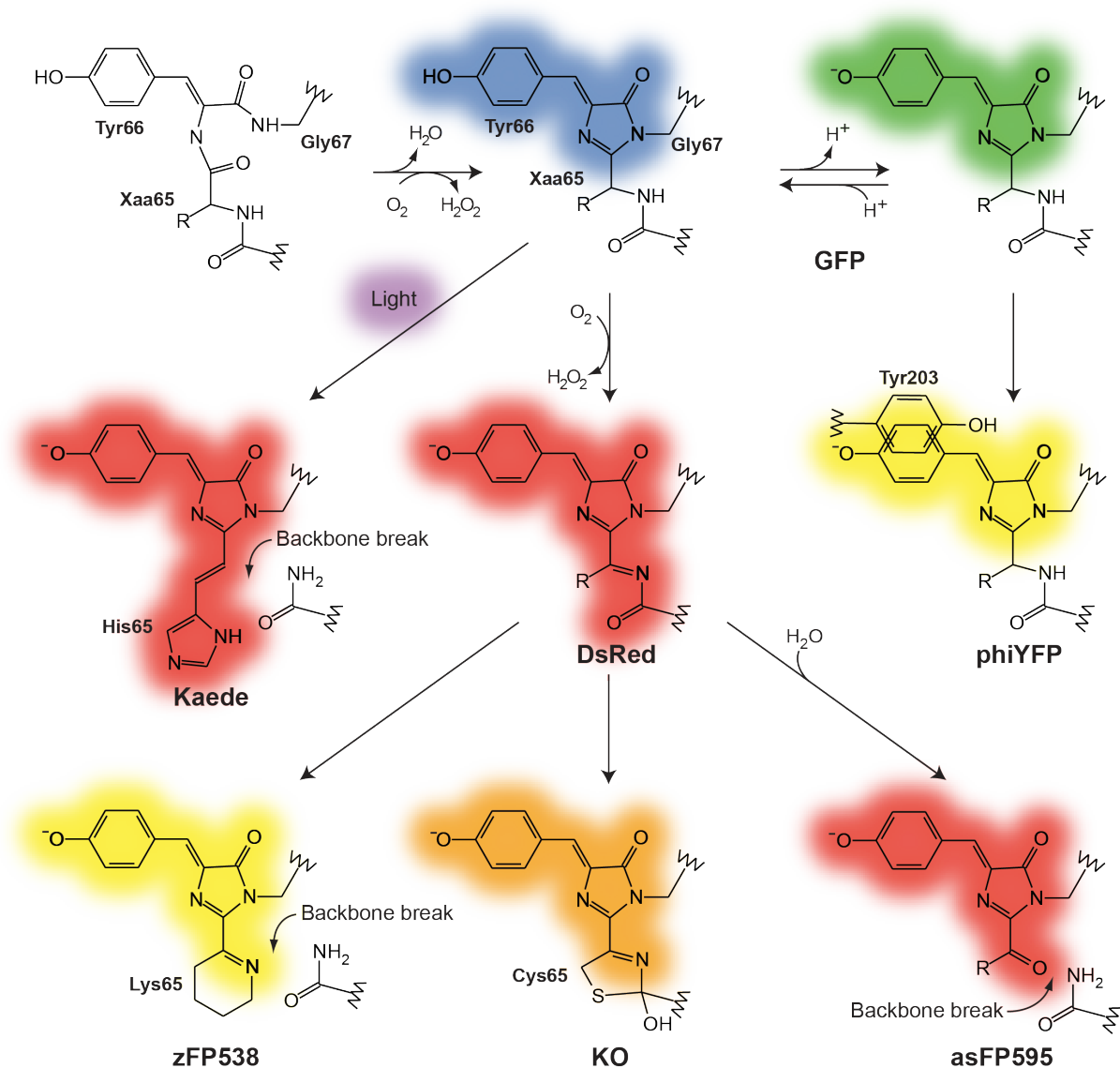


Рис. 2.7: Структуры хромофоров природных флуоресцентных белков.

При образовании Kaede-подобного хромофора происходит *разрыв* полипептидной цепи по той же N- $\alpha$ -связи 65-ой аминокислоты. Однако в этом случае ароматическая система расширяется за счет включения в ее состав боковой группы гистидина, который находится в 65-ом положении всех белков с Kaede-подобным хромофором [94].

В природе известны различные модификации DsRed-подобного хромофора. В белке zFP538 лизин-65 формирует дополнительный гетероцикл, также расширяя ароматическую систему [95, 96]. В белке Kusabira-Orange (KO) расширяющий хромофор гетероцикл формируется цистеином-65 [97]. В белке asFP595 ацилиминная связь DsRed-подобного интермедиата гидролизуеться с разрывом основной полипептидной цепи и включением в хромофор дополнительной кето-группы [98–100]. Структуры этих хромофоров представлены на Рисунке 2.7.

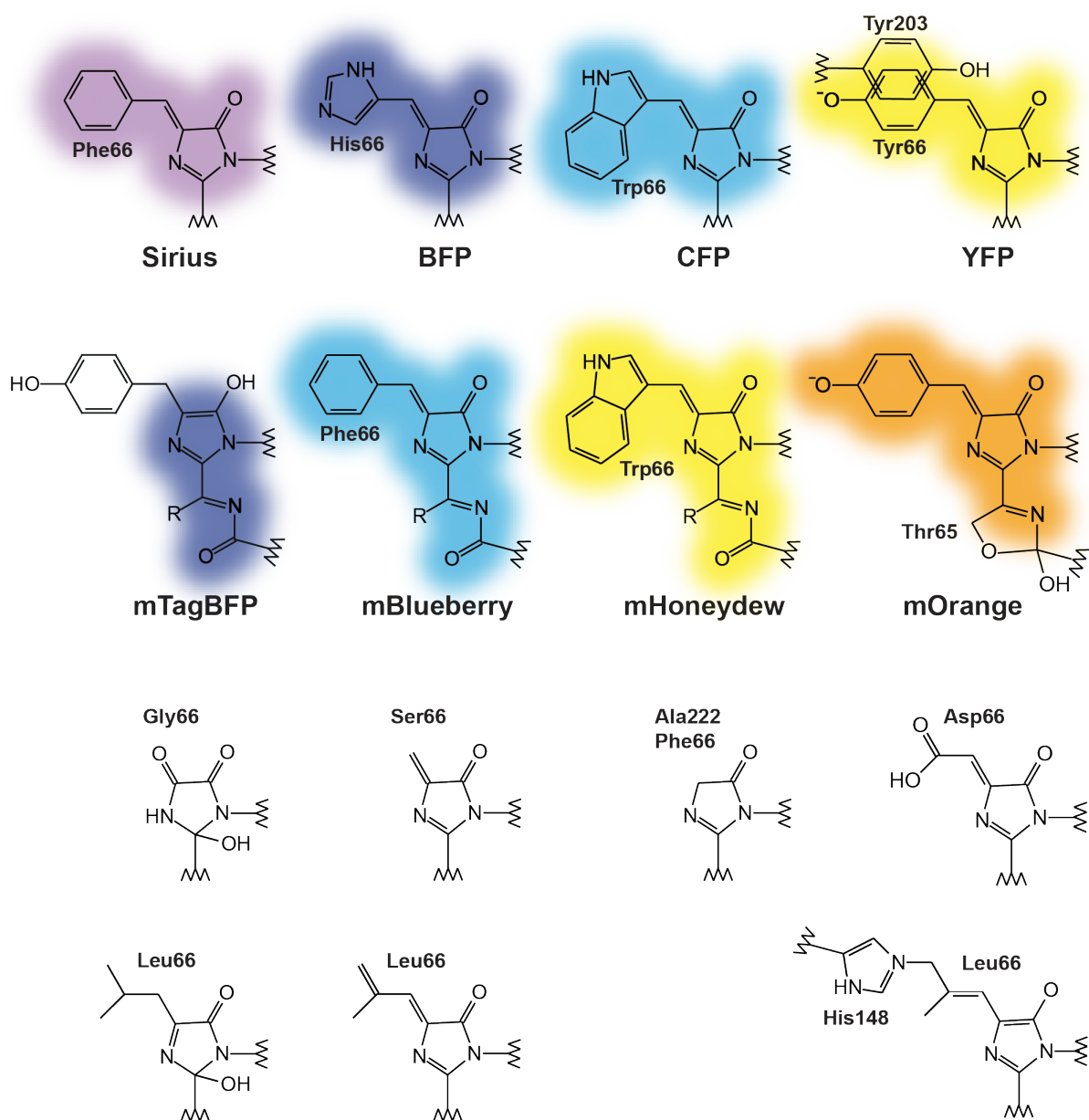


Рис. 2.8: Структуры хромофоров флуоресцентных белков, разработанных человеком.

### 2.2.7. Хромофоры флуоресцентных белков, полученных в биотехнологии

Ряд новых структур хромофоров (Рисунок 2.8) был получен мутагенезом природных флуоресцентных белков, прежде всего, по 66-му положению. По неизвестной причине (возможно, связанной с биологической ролью флуоресцентных белков [72, 101]) в 66-ом положении всех *природных* флуоресцентных белков находится тирозин. Замены по этому положению на другие ароматические аминокислоты не нарушают способность к флуоресценции, фолдинг и образование хромофора (что могло бы объяснить консервативность тирозина), но зато позволяют получить флуоресцентные белки с измененными спектральными свойствами [72, 87].

Замены тирозина-66 на другие ароматические аминокислоты приводят к гипсохромному смещению (то есть к смещению в коротковолновую область) спектров флуоресцентного белка. Замена тирозин-66 на триптофан в GFP-подобном хромофоре приводит к циановой флуоресценции,

замена на гистидин — к синей, а на фенилаланин — к фиолетовой. Аналогичным образом, замены тирозина-66 в белках, формирующих DsRed-подобный хромофор приводят к получению оранжевых (триптофан-66, [102]) и синих (гистидин-66 и фенилаланин-66) флуоресцентных белков [103].

### 2.2.8. Влияние аминокислотного окружения на спектральные свойства флуоресцентного белка

Многочисленные флуоресцентные белки *разных цветов*, несущие химически идентичный GFP-подобный хромофор, наглядно демонстрируют, что спектральные свойства флуоресцентного белка определяются не только структурой его хромофора, но и — в не меньшей степени — взаимодействиями между хромофором и его аминокислотным окружением. Наибольшее влияние на спектры оказывают стеккинг-взаимодействия хромофора с ароматическими аминокислотами, а также взаимодействия, определяющие ионизацию хромофора.

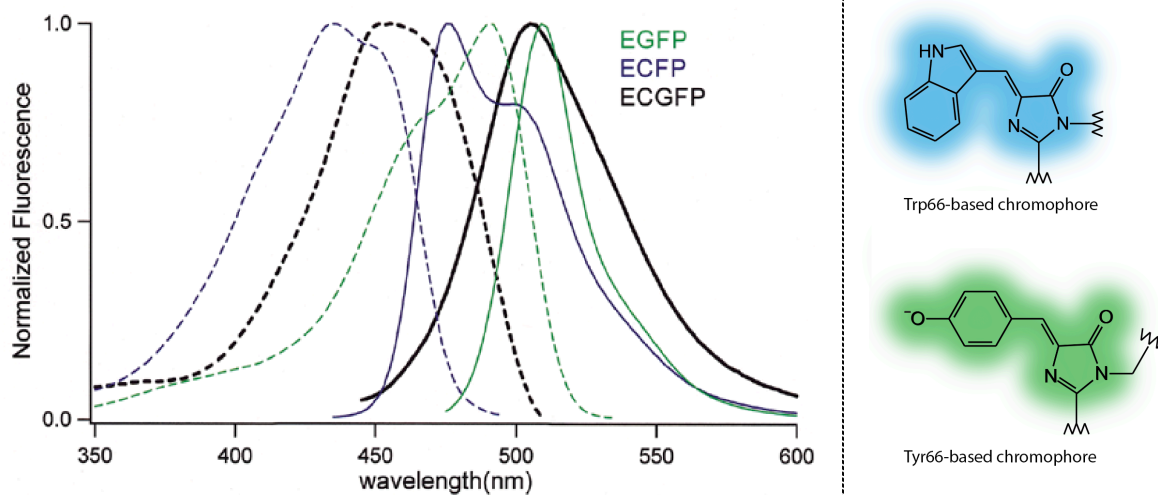
Стекинг-взаимодействия известны для желтых флуоресцентных белков, полученных на основе зеленых флуоресцентных белков при помещении остатка тирозина в положение 203. Боковая цепь тирозина-203 в желтых белках оказывается почти параллельна плоскости тирозина-66, входящего в хромофор, что приводит к перекрыванию р-орбиталей двух ароматических систем. В результате стеккинга возникает заметный батохромный сдвиг (сдвиг в длинноволновую область), превращающий зеленый флуоресцентный белок в желтый. Причиной сдвига является дополнительная электронная плотность, внесенная в хромофор остатком Tyr203, а также поляризация им аминокислотного микроокружения.

Батохромные сдвиги, вызванные стеккинг-взаимодействиями, как правило, не превышают 15-30 нм [72]. Впервые замены по положению 203, приводящие к стеккингу с хромофором, были обнаружены при разработке желтых флуоресцентных белков на основе avGFP [68], однако затем были найдены и в природе — в желтом флуоресцентном белке PhiYFP [104].

Замена на Tyr203 известна и для циановых флуоресцентных белков с хромофором на основе триптофана. В белке ECGFP эта замена привела к сдвигу спектров поглощения и флуоресценции на 20 нм в длинноволновую область [105], сохранив двугорбую форму спектра, характерную для белков с триптофановым хромофором.

Большие изменения спектральных свойств достигаются изменением ионизации хромофора. GFP-подобный хромофор содержит остаток тирозина-66, легко ионизируемого при физиологических pH. В связи с этим, во многих флуоресцентных белках (например, в avGFP) хромофор существует в равновесии между протонированной (нейтральной) и депротонированной (анионной) формами [70]. Максимум поглощения протонированного хромофора приходится на область 400 нм, а максимум поглощения анионной формы — в области 485 нм. Таким образом, ионизация GFP-подобного хромофора приводит к батохромному сдвигу в 85 нанометров.

Аминокислотное окружение играет ключевую роль в определении поляризации и ионизации хромофора. Как было рассмотрено в первой части обзора литературы, внутри белковой глобулы значения диэлектрической проницаемости оказываются существенно ниже, чем в водном раство-



**Рис. 2.9:** Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции белков ECFP, ECGFP и EGFP. Спектры возбуждения показаны пунктирными линиями, спектры эмиссии — сплошными. Белок ECFP содержит GFP-подобных хромофор на основе триптофана, белок ECGFP — такой же хромофор, но находящийся в стеккинг-взаимодействии с Tyr203, а белок EGFP — классический GFP-подобный хромофор на основе тирозина.

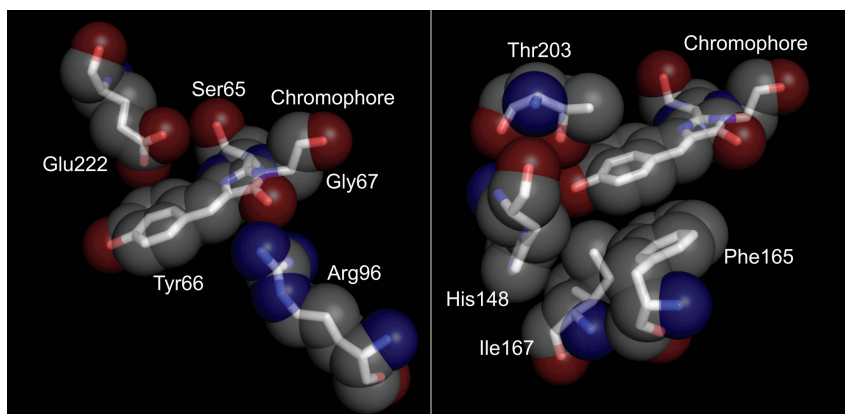
ре<sup>12</sup>, что приводит к усилению эффектов заряд-зарядовых взаимодействий и значительным изменениям рК химических групп. Эффекты аминокислотных замен в микроокружении хромофора могут быть как прямыми, так и опосредованными, проявляясь через перераспределение сетей водородных связей или фиксацию связанных молекул воды в глобуле белка. На сегодняшний день во флуоресцентных белках известен ряд положений, аминокислотные остатки в которых определяют степень поляризации хромофора.

Известно, например, что мутации по положению 65 - первому аминокислотному остатку, входящему в состав хромофора, - определяют ионизацию и спектральные свойства флуоресцентного белка. В частности, точечной мутацией S65T, сдвигающей равновесие в сторону депротонированного хромофора, из avGFP был получен белок EGFP (enhanced GFP)<sup>13</sup>, имеющий основной максимум поглощения в области 490 нм и поэтому более удобный с точки зрения флуоресцентной микроскопии [107].

На степень ионизации хромофора способны оказывать влияние практически все контактирующие аминокислоты. В наибольшей степени, однако, это характерно для остатков в положениях 148, 165, 167 и 203 (Рисунок 2.10) — ключевых позициях, определяющих не только ионизацию хромо-

<sup>12</sup>Расчетное значение диэлектрической проницаемости в гидрофобном ядре среднего белка составляет 2-4 [1], однако для многих белков опубликованы большие значения, полученные экспериментально [106]. Внутри молекулы флуоресцентного белка сосредоточено большое количество заряженных аминокислот и связанных молекул воды. В связи с этим, хотя автор диссертации не нашел в литературе работ, посвященных измерению диэлектрической проницаемости внутри флуоресцентного белка, можно ожидать, что ее значение окажется сравнительно высоким.

<sup>13</sup>Помимо замены S65T, белок EGFP также содержит еще одну мутацию по сравнению с avGFP, ускоряющую его созревание при 37°C — замену F64L.



**Рис. 2.10:** Ключевые аминокислоты из микроокружения хромофора.

фора, но и его конформацию, подвижность и способность к изомеризации [72, 108]. Так, например, мутация T203I по уже упоминавшемуся положению 203 известна тем, что смещает равновесие в сторону протонированного хромофора [69, 109].

Не все хромофоры флуоресцентных белков обладают способностью к ионизации в физиологических условиях. Боковые цепи фенилаланина и триптофана считаются неионизируемыми при физиологических pH — в связи с этим не ионизируются и основанные на Phe66 и Trp66 хромофоры синих и циановых белков (но см. раздел «Результаты и обсуждение»). DsRed-подобные хромофоры, напротив, в физиологических условиях почти всегда ионизованы [72].

## 3. Материалы и методы исследования

### 3.0.9. Амплификация ДНК и анализ продуктов амплификации

При клонированиях для амплификации ДНК и для тестирования полученных конструкций (скрининга) мы применяли стандартную полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с использованием Encyclo PCR Kit (Евроген). Амплификацию проводили с помощью прибора PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research), а продукты амплификации анализировали в 1-2% агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 0.5 мкг/мл.

Синтез олигонуклеотидов, использованных для амплификации ДНК, заказывали в компании Евроген.

### 3.0.10. Создание библиотек случайных мутантов для направленной эволюции

Для создания библиотек мутантов мутируемый ген амплифицировали в условиях, при которых полимеразы чаще допускает ошибки (так называемый ПЦР с ошибками, error-prone PCR), и клонировали в экспрессионный вектор pQE-30 под контроль промотора T5 для дальнейшей экспрессии в *E. coli*.

Случайный мутагенез проводили, используя Taq-полимеразу (Евроген), а в качестве матричной ДНК использовали плазмиду pQE-30 со вставкой кодирующей последовательности мутируемого флуоресцентного белка.

Для ПЦР мы использовали необычную смесь нуклеотидтрифосфатов и необычные солевые условия — такие, при которых Taq-полимераза допускает в среднем 8 мутаций на 1000 амплифицированных нуклеотидов за 25 циклов ПЦР [110, также см. протокол для набора Diversify PCR Random Mutagenesis Kit компании Clontech]<sup>1</sup>. Подробно протокол проведения случайного мутагена приведён ниже.

---

<sup>1</sup>[http://www.clontech.com/US/Products/PCR\\_RT-PCR\\_Real-Time\\_qPCR/Mutagenesis\\_Reagents/Diversify\\_Random\\_Mutagenesis\\_Kit](http://www.clontech.com/US/Products/PCR_RT-PCR_Real-Time_qPCR/Mutagenesis_Reagents/Diversify_Random_Mutagenesis_Kit)

## Протокол проведения случайного мутагенеза

Ниже приведен протокол для проведения случайного мутагенеза методом ПЦР с ошибками. Исходя из нашего опыта, полимеразы при описанных условиях допускает в 8-10 раз больше ошибок при прочтении нуклеотидов А или Т, чем при прочтении Г или С.

Итоговое количество ошибок, допущенных полимеразой, зависит не только от солевого состава раствора и концентраций нуклеотидов, но также от количества циклов амплификации. Таким образом, в одних и тех же условиях количество ошибок, допускаемых полимеразой, можно регулировать начальной концентрацией матричной ДНК.

В качестве источника дезоксинуклеотидтрифосфатов для ПЦР мы использовали смесь, аналогичную коммерчески доступной смеси Diversify Mutagenesis Kit компании Clontech (приведен состав 50-кратного раствора):

- 0.2 мМ dGTP,
- 0.2 мМ dATP,
- 1 мМ dCTP,
- 1 мМ dTTP.

Ниже приведен использованный нами состав реакции для проведения ПЦР с ошибками из расчета на 50 мкл реакционной смеси:

- 36 мкл деионизованной воды,
- 5 мкл 10x буфера для Taq-полимеразы (Евроген),
- 4 мкл MnSO<sub>4</sub> (8 мМ),
- 1 мкл dGTP (2 мМ),
- 1 мкл смеси нуклеотидтрифосфатов (см. выше),
- 1 мкл смеси праймеров (5 мкМ каждый),
- 1 мкл матричной ДНК (от 50 пг/мкл до 50 нг/мкл),
- 1 мкл 50x Taq-полимеразы (HS-Taq, Евроген).

Аmplифицированную ДНК очищали с помощью препаративного агарозного гель-электрофореза и подвергали расщеплению с помощью ферментов EcoRI и HindIII (Sibenzyme) в условиях, указанных производителем. Результаты расщепления анализировали агарозным гель-электрофорезом, после чего продукты рестрикции снова очищали с помощью препаративного агарозного гель-электрофореза. Очищенные фрагменты лигировали с помощью ДНК-лигазы бактериофага T4 (Евроген) в вектор mKate2/pQE-30, линейаризованный по сайтам EcoRI/HindIII. Наличие красного флуоресцентного белка mKate2 в векторе позволяло оценить качество получаемой библиотеки с точки зрения контаминации непрошедшим рестрикцию вектором, так как получение красных флуоресцентных белков при мутагенезе циановых - крайне маловероятно.



Продукт реакции лигирования очищали на колонках CleanUp Mini (Евроген) для того, чтобы очистить препарат от солей. Очищенный препарат использовали для электрической трансформации компетентных клеток *E. coli* штамма XL1-Blue, приготовленных по стандартному протоколу.

За день до высевания полученной библиотеки аликвоту трансформированных бактерий высевали на чашку Петри для определения разнообразия получившейся библиотеки (т.е. количества трансформированных бактерий). Оставшуюся суспензию бактерий хранили ночь при температуре 4°C.

На следующий день, определив разнообразие библиотеки (количество трансформированных бактерий), бактериальную суспензию рассеивали на чашки Петри так, чтобы число колоний на одной чашке не превышало 5 000. Чашки инкубировали от 12 до 18 часов при температуре 30°C или 37°C, в зависимости от экспериментальной задачи, затем чашки хранили при температуре 4°C.

Разнообразие получаемых библиотек в данной работе составляло от 50 000 до 5 000 000 вариантов. Критерий отбора колоний устанавливался индивидуально для каждого эксперимента (см. раздел Результаты и обсуждение).

### **3.0.11. Направленный мутагенез кодирующей последовательности белков**

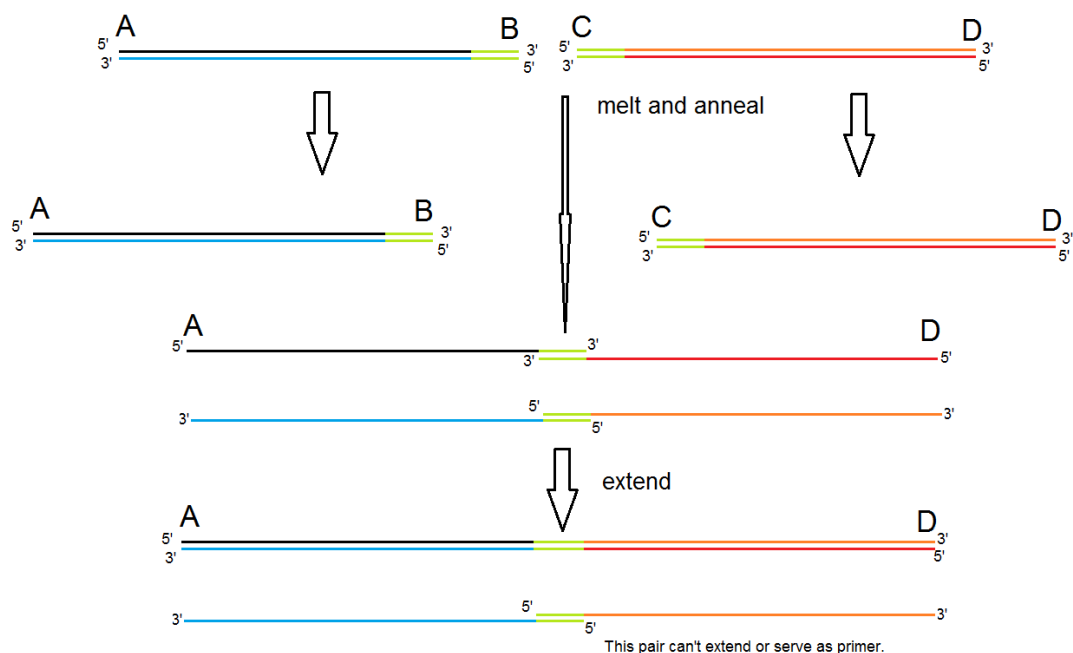
Мы использовали две технологии для сайт-направленного мутагенеза кодирующей последовательности флуоресцентных белков.

Направленный мутагенез последовательности белка mCerulean проводили с использованием технологии гибридизации фрагментов мутантного гена с последующим простраиванием (так называемый overlap-extension PCR [111], см. Рисунок 3.1). Направленный мутагенез одного из мутантов WasCFP проводили по технологии самособирающегося клонирования [112].

#### **Мутагенез с помощью «Overlap-extension PCR»**

При проведении мутагенеза с помощью методами «overlap-extension PCR» мы амплифицировали в двух пробирках по-отдельности две части мутируемого гена: от 5'-конца до предполагаемого места внесения мутации и от места внесения мутации до 3'-конца. Для амплификации использовали праймеры, содержащие желаемую мутацию. Кроме того, праймеры, использованные для амплификации разных частей гена, содержали комплементарные друг другу части.

Амплифицированные части гена смешивали, гибридизовали при температуре отжига комплементарных частей и достраивали до полноразмерного гена с желаемой мутацией с помощью ПЦР без праймеров с течение нескольких циклов. Не визуализируя с помощью электрофореза, полноразмерный продукт дополнительно амплифицировали, добавляя концевые праймеры в реакцию, и клонировали в вектор pQE-30 по сайтам BamHI и HindIII.



**Рис. 3.1:** Схема проведения мутагенеза методом overlap-extension PCR.

### Мутагенез с помощью «Self-assembly cloning»

Принцип самособирающегося клонирования (Рисунок 3.2) состоит в создании молекул ДНК с липкими концами с помощью гибридизации двух «смещенных» друг относительно друга ПЦР-продуктов. С длиной липких концов порядка 12 нуклеотидов клонирование проходит без предварительной реакции лигирования - за счет того, что клетки *E. coli* эффективно репарируют одностранные разрывы в дуплексе ДНК. Подробно технология самособирающегося клонирования описана в работе Матсумото с коллегами [112], а оптимизированный автором диссертации протокол приведен ниже.

При проведении мутагенеза с помощью методики самособирающегося клонирования мы амплифицировали вектор pQE-30, содержащий мутируемый ген флуоресцентного белка. Исходная методика самособирающегося клонирования описана для сборки генетических конструкций как минимум из двух фрагментов («вставки» и «вектора»). В случае мутагенеза мы не собирали новую конструкцию из двух частей, а просто модифицировали исходную, — поэтому мы амплифицировали весь вектор, создавая на концах молекулы комплементарные липкие концы. Мы использовали содержащие мутации праймеры, написанные с небольшим смещением друг относительно друга. С использованием таких праймеров в результате двух независимых амплификаций получались смещенные на длину липких концов ПЦР-продукты, представляющие собой линейаризованный вектор. Гибридизацией полученных ПЦР-продуктов мы получали молекулы вектора с комплементарными концами, который и использовали для трансформации.

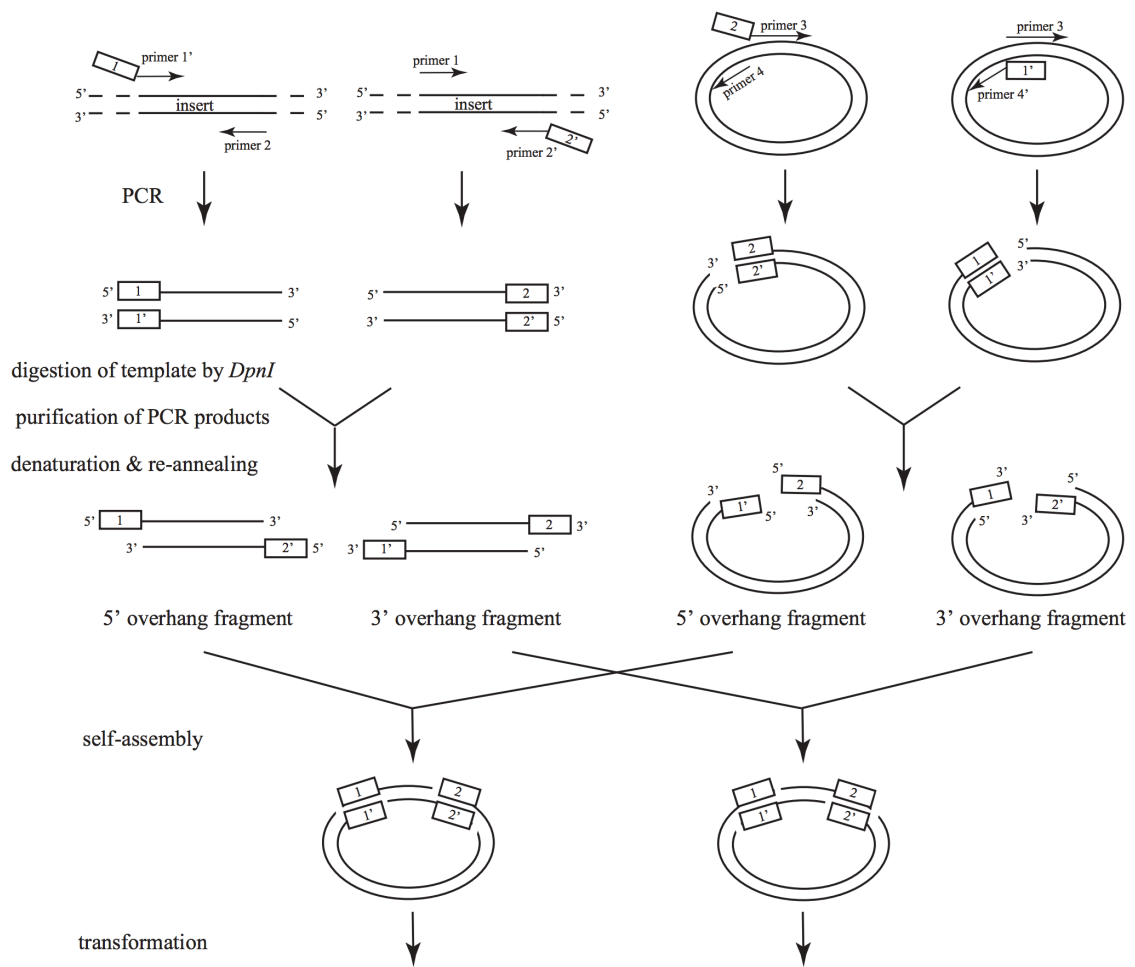


Рис. 3.2: Принцип самособирающегося клонирования.

Проведение самособирающихся клонирований обходится дороже, чем проведение классических клонирований по схеме «рестрикция-лигирование» (в том числе, мутагенеза с помощью «overlap-extension PCR») — из-за большего количества требуемых праймеров. В то же время, самособирающееся клонирование не зависит от наличия сайтов рестрикции, требует использования лишь одного фермента (работающего в буфере для ПЦР), не требует очисток ДНК с помощью препаративного электрофореза, не требует лигирования и занимает существенно меньше времени непосредственной «работы руками». Так, например, на параллельное создание пяти мутантов автору требуется 30-40 минут работы («чистого времени»).

#### Протокол проведения самособирающегося клонирования

- Провести ПЦР для амплификации фрагментов вставки и вектора (на каждый фрагмент - по две реакции ПЦР с разных праймеров),
- Подтвердить результаты амплификации с помощью электрофореза,
- Смешать в одну пробирку ПЦР-продукты #1 и #2 для вставки,
- Смешать в одну пробирку ПЦР-продукты #1 и #2 для вектора,
- Обработать ферментом DpnI или MspI для удаления метилированной ДНК в буфере для ПЦР при 37°C (15 минут для фермента Fermentas FD DpnI),
- Очистить ДНК на колонках, смыть гибридизационным буфером (см. состав буфера в статье - но и в лигазном буфере работает);
- Провести гибридизацию по схеме 95°C – 3 минуты, 25°C – 5 минут,
- Смешать продукты амплификации вставки и вектора, инкубировать 10 минут на комнатной температуре
- Провести химическую трансформацию *E.coli*

#### **3.0.12. Электрическая трансформация клеток *E. coli* (электропорация)**

Перед проведением электропорации для удаления солей реакцию лигирования очищали на колонках CleanUp Mini (Евроген) согласно протоколу производителя. 40 мкл электрокомпетентных клеток размораживали при 0°C, и в размороженные клетки вносили элюат реакции лигирования.

Клетки переносили в предварительно охлажденную кювету для электропорации (Альмабион, Россия) и производили электропорацию в приборе MicroPulser (Bio-Rad, США). Сразу после этого в кювету добавляли 1.5 мл среды SOB и полученную бактериальную суспензию переносили в пробирку. Перед высеванием на чашки Петри пробирку инкубировали 20 минут при температуре 37°C и интенсивном покачивании.

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

При химической трансформации реакций лигирования 80 мкл химически компетентных клеток (штамм XL1-Blue), хранившихся при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ , размораживали во льду в течение 10-15 минут, в пробирку добавляли 5-10 мкл реакции лигирования и инкубировали еще 10-15 минут во льду. Далее помещали пробирку в термостат и инкубировали 90 секунд при температуре  $42^{\circ}\text{C}$  (тепловой шок). Сразу после этого пробирку охлаждали во льду около минуты, после чего добавляли 200 мкл среды SOB и инкубировали еще 30-60 мин при  $37^{\circ}\text{C}$ . Полученную бактериальную суспензию высевали на чашки Петри.

Автор также обнаружил, что при трансформации не реакции лигирования, а плазмидной ДНК, не требуется ни размораживание во льду, ни инкубация клеток с добавленной ДНК, ни охлаждение после теплового шока, ни инкубация в среде SOB. Размораживание на комнатной температуре, быстро добавление сотен нанोगраммов плазмидной ДНК, тепловой шок и немедленное высевание на чашки стабильно приводят к получению тысяч колоний на одной чашке Петри — при этом затраченное на трансформацию время сводится к нескольким минутам.

### 3.0.14. Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК часть отобранной колонии *E. coli*, содержащей рекомбинантную плазмиду, переносили из чашки Петри в пластиковую пробирку объемом 15 мл, содержащую 5-7 мл среды LB с ампицилином (200 мкг/мл) или канамицином (100 мкг/мл) и инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 12-36 часов при интенсивном перемешивании в термостатируемом шейкере.

Затем полученную жидкую культуру *E. coli* осаждали центрифугированием в течение 5 мин с ускорением около 7500 g, супернатант удаляли. К полученному бактериальному осадку добавляли 250 мкл Раствора 1<sup>сноска 2</sup> интенсивно встряхивали до гомогенности. После этого в пробирку вносили 250 мкл Раствора 2<sup>сноска 3</sup> и перемешивали с помощью микроцентрифуги Vortex CV-1500. Далее добавляли 350 мкл Раствора 3<sup>сноска 4</sup>, аккуратно перемешивали, после чего центрифугировали 2 мин в настольной центрифуге при 13400 об/мин, супернатант переносили в чистую пробирку. К супернатанту добавляли 700 мкл изопропилового спирта, перемешивали и центрифугировали 10 мин при 13400 об/мин. Супернатант декантировали, пробирку аккуратно промывали 1 мл 96% этанола, стараясь не смыть осадок. Затем сбрасывали остатки жидкости на дно с помощью Vortex CV-1500 и удаляли их пипеткой. Осадок высушивали в течение 20 минут на  $37^{\circ}\text{C}$  и растворяли в 200 мкл деионизованной воды (mQ).

---

<sup>2</sup>Раствор 1: Tris-HCl (20-50 mM, pH 8.0) и РНКазы А (10 мг/мл)

<sup>3</sup>Раствор 2: 0.2M NaOH + 1%SDS

<sup>4</sup>Раствор 3: Ацетат калия 3M

### 3.0.15. Секвенирование плазмидной ДНК

Секвенирование заказывали в компании Евроген. Для секвенирования использовали праймеры, соответствующие участкам, фланкирующим полилинкер вектора. Для секвенирования конструкций в векторах pEGFP N1 или pEGFP-C1 использовали праймеры C1-forward2, C1-reverse2 (5'-CCATTGACGTCAATGGGAGTT-3' и 5'-CAAGTTAACAACAACAATTGCAT-3', соответственно). Для секвенирования конструкций в векторе pQE-30 использовали праймеры pQE-up и pQE-low (5'-ATTGTGAGCGGATAACAATTTC-3' и 5'-CCGAGCGTTCTGAACAAATC-3', соответственно). Результаты секвенирования анализировали в программе Unipro Ugene [113].

### 3.0.16. Экспрессия и очистка рекомбинантных белков

Для наращивания биомассы бактерий, экспрессирующих флуоресцентный белок, мы вносили колонию *E. coli* в 200 мл среды LB, содержащей ампицилин (100 мг/л), и инкубировали колбу при интенсивном покачивании и температуре 37°C в течение ночи. Об экспрессии и созревании фолдинге флуоресцентных белков можно судить по цвету бактериальной культуры: бактерии, экспрессирующие циановые флуоресцентные белки, выглядят зелеными при нормальном освещении. Если после ночной инкубации цвет бактериальной культуры нас не удовлетворял, мы изменяли условия экспрессии, регулируя, в основном, три параметра: температуру, концентрацию индуктора (IPTG, от 0 до 3 mM) и время индукции.

Готовую бактериальную культуру центрифугировали, супернатант выливали, а осадок ресуспендировали в фосфатном буфере и лизировали с помощью ультразвука. Для дальнейшего исследования рекомбинантные белки, содержащие N-концевой полигистидиновый участок (гис-таг), очищали с использованием металлаффинной кобальт-содержащей смолы TALON (Clontech). Элюцию со смолы и проводили с помощью фосфатного буфера, содержащего 250 mM имидазола, или (реже) с помощью фосфатного буфера, содержащего ЭДТА (этилендиаминтетрауксусную кислоту) в концентрации 200 mM.

### 3.0.17. Измерение спектров поглощения и флуоресценции

Спектры поглощения получали с использованием спектрофотометра Varian Cary 100 Bio. Для измерения спектров возбуждения и эмиссии флуоресцентных белков использовали флуоресцентный спектрофотометр Varian Cary Eclipse.

Молярный коэффициент экстинкции рассчитывался на основании измерения концентрации молекул со зрелым хромофором. Предположительно, в отсутствие специфических внутрибелковых взаимодействий в денатурированном белке, идентичные хромофоры разных белков имеют одинаковые коэффициенты экстинкции [114]. Молярный коэффициент экстинкции для денатурированного в щелоче цианового флуоресцентного белка измерен Лелимусином с соавторами и составляет  $46\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  при 460 нм [114].

Исходя из этого, концентрацию любого цианового флуоресцентного белка с хромофором на

основе триптофана можно точно оценить, денатурировав его в щелочи (1М NaOH). Полученная концентрация будет являться концентрацией исключительно молекул белка с сформированным хромофором. В отличие от определения концентрации белка по поглощению при 280 нм, измерение такой способ измерения не чувствителен к степени созревания белка и чистоте препарата.

### **3.0.18. pH-титрование**

Зависимость спектров поглощения и флуоресценции от pH определяли, растворяя аликвоты очищенного флуоресцентного белка в буферах с различными значениями pH. В работе были использованы 17 буферов с различными значениями pH на основе трех буферных систем: цитратной, фосфатной и боратной.

Для детального определения pH-зависимости спектров в области кислых pH, была приготовлена серия буферов на основе гидрофосфата натрия и лимонной кислоты. Состав и способ приготовления растворов можно найти в Интернете по адресу <http://goo.gl/PYQhdT>.

### **3.0.19. Титрование мочевиной**

Зависимость спектров поглощения и флуоресценции от концентрации мочевины определяли, добавляя аликвоты очищенного флуоресцентного белка в фосфатный буфер с той или иной концентрацией мочевины. pH буферов с мочевиной предварительно доводился до значений  $8.1 \pm 0.3$  растворами NaOH 1М и HCl 1М.

### **3.0.20. Компьютерное моделирование**

Для того, чтобы выбрать аминокислотные позиции для направленного мутагенеза, мы визуализировали опубликованную структуру белка Cerulean [114] (PDB ID: 2WSO) в метре в программе PyMol [115] и выбирали остатки из микроокружения хромофора для дальнейшего моделирования мутаций.

Эффекты мутаций на лизин и аргинин моделировали также в программе PyMol с помощью встроенного пакета «Mutagenesis». Этот же пакет использовался для оценки возможного эффекта аминокислотных замен, обнаруженных в мутантах mCerulean V61K, отобранных после случайного мутагенеза.

### **3.0.21. Временная экспрессия в эукариотических клетках**

Для временной трансфекции мы использовали клетки линий эмбриональной почки человека (HEK 293T) и рака шейки матки (HeLa и HeLa Kyoto). Клетки выращивали в среде DMEM/F-12 GlutaMAX Supplement (Life Technologies), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (PAA Laboratories) на 35-мм чашках Петри со стеклянным дном (World Precision Instruments). По

достижении 70-80% конфлюентности, среда менялась на 800 мкл среды Opti-MEM (Invitrogen) без сыворотки, и чашки Петри инкубировались 1 час при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе.

Трансфекцию проводили трансфекционным реагентом FuGene HD (Promega) по протоколу, указанному производителем. Через 12-48 часов инкубации при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе клетки анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

### 3.0.22. Флуоресцентная микроскопия

Мы использовали множество систем для флуоресцентной микроскопии:

- флуоресцентные бинокуляры Olympus SZX12 и Olympus SZX16,
- широкопольные флуоресцентные микроскопы Leica AF 6000 LX и Keyence Bioevo BZ-9000,
- конфокальные флуоресцентные микроскопы Leica DMIRE2 TCS SP2 и Leica SP8 STED 3X
- конфокальный флуоресцентный микроскоп, совмещенный с оборудованием для микроскопии времени жизни флуоресценции MicroTime 200 (Picoquant GmbH, Германия),
- FLIM-макроимаджер DCS120 Confocal Scanning FLIM System (Becker Hickl GmbH, Германия)

Чаще всего для визуализации флуоресценции трансфицированных клеток использовался флуоресцентный микроскоп Leica AF 6000 LX (Leica Microsystems AG). Мощность светового потока при съемке составляла в различных экспериментах от 50 до 340 мВатт/см<sup>2</sup>. Обработка полученных изображений с этого микроскопа производилась с использованием программы LAS AF Lite.

Библиотеки мутантов в *E. coli*, выращенные на чашках Петри, скринировали, как правило, визуально с помощью флуоресцентного бинокуляра Olympus SZX12. В некоторых экспериментах библиотеки анализировали на компьютере после съемки на широкопольном флуоресцентном микроскопе Keyence Bioevo BZ-9000, объединяя фотографии фрагментов чашки Петри в панорамное изображение в программе BZ-9000 Analyzer в автоматическом режиме. В некоторых случаях для обработки изображений использовали пакет программ ImageJ (NIH, Bethesda).

### 3.0.23. Обработка данных

Обработка данных производилась с помощью языка программирования Python 2.7, с использованием библиотек Pandas (<http://pandas.pydata.org>), NumPy ([www.numpy.org](http://www.numpy.org)), SciPy ([www.scipy.org](http://www.scipy.org)) и Matplotlib (<http://matplotlib.org>) в интерактивной среде Jupyter (<https://jupyter.org>) с помощью пакета Anaconda (<http://continuum.io>).



## 4. Результаты и обсуждение

Настоящая работа посвящена получению флуоресцентных белков с анионным хромофором на основе триптофана. Флуоресцентные белки с такими хромофорами не были описаны, однако в пользу *возможности* ионизации свидетельствовал результат проведенного в нашей лаборатории рН-титрования химически синтезированного хромофора, подобного хромофору циановых флуоресцентных белков <sup>1</sup> (Рисунок 4.2).

При низких ( $pK_{\beta} = 3.6$ ) и высоких значениях рН ( $pK_{\alpha} = 12.4$ ) в спектре поглощения этого соединения возникал батохромный сдвиг — смещение максимума поглощения в длинноволновую область (Рисунок 4.1).

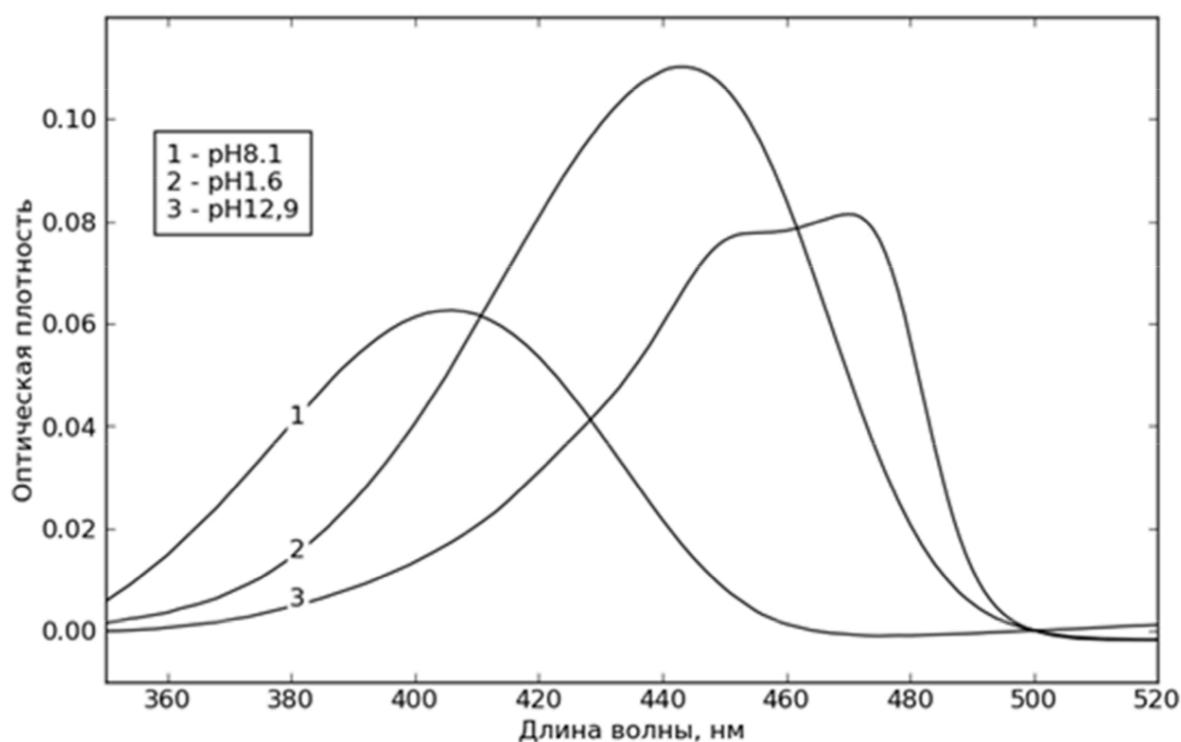


Рис. 4.1: Спектры синтетического хромофора в кислой, нейтральной и щелочной средах.

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

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.

Полученное при титровании хромофора значение  $pK_a$  (12.4) оказалось существенно ниже, чем  $pK_a$  атома азота в молекулах свободного индола ( $pK_a = 17$  [53]) и боковой группе триптофана. Снижение  $pK_a$  до 12.4, вероятно, связано с включением индольного фрагмента в протяженную ароматическую систему хромофора.

Полученное 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 и приводят к денатурации большинства белков.

С другой стороны, значение 12.4 находилось существенно ближе к физиологическому диапазону pH (pH 4.5-7.5), чем  $pK_a$  свободного индола ( $pK_a = 17$ ). Известно, что погруженные в белковую глобулу заряды способны сильно влиять на ионизацию окружающих химических групп [1], 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. Настоящая работа, таким образом, заключалась, в первую очередь, в проверке этого предположения.

## 4.1. Ионизация хромофора на основе триптофана в нативном белке

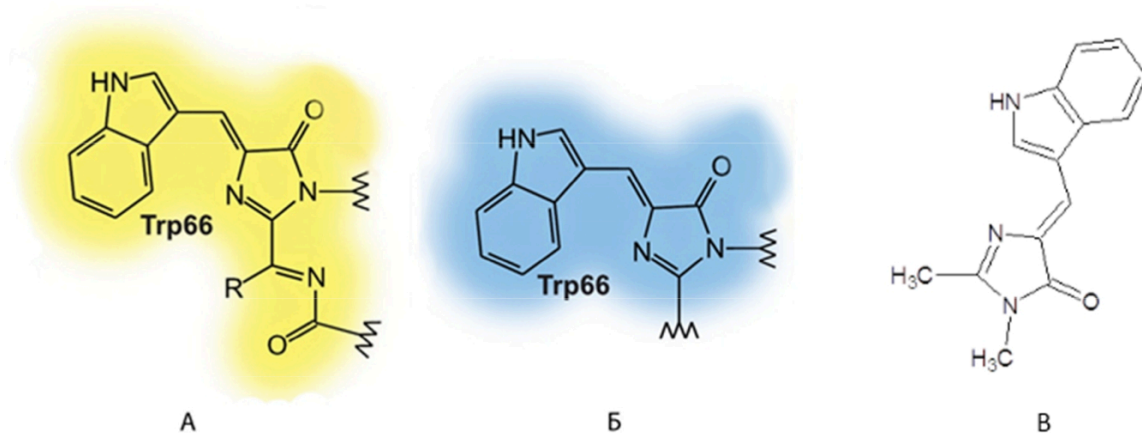
### 4.1.1. Выбор модельного белка для проведения мутагенеза

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 аминокислот, боковые группы которых потенциально способны при тесном контакте снизить  $pK_a$  хромофора и привести к его ионизации в нативном белке, мы выбрали лизин ( $pK_a$  боковой цепи составляет 10.50) и аргинин ( $pK_a$  гуанидиновой группировки — 12.48).

Существующие флуоресцентные белки с хромофором на основе триптофана можно разделить на две группы — белки с хромофорами, содержащими дополнительную двойную (ацилиминную) связь по сравнению с GFP-подобным хромофором, и не содержащими таковой (Рисунок 4.2).

Белки, имеющие ацилиминную связь в хромофоре, флуоресцируют в оранжевой области спектра (например, mHoneyDew [102]). С точки зрения ионизации остатка триптофана они интересны тем, что могут обладать более низким  $pK_a$  индольного фрагмента за счет дополнительного расширения ароматической системы при возникновении ацилиминной связи. В то же время, все разра-



**Рис. 4.2:** 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.

ботанные на сегодняшний день подобные белки неоптимальны для флуоресцентной микроскопии (медленное созревание, низкая фотостабильность), и до сих пор не получено ни одной кристаллической структуры подобных белков.

В первую очередь из-за отсутствия кристаллических структур оранжевых флуоресцентных белков, мы остановили свой выбор на циановом белке mCerulean<sup>2</sup>, относящимся к группе белков, *не* содержащих ацилиминной связи в хромофоре.

Белок mCerulean является популярным инструментом в современной клеточной биологии благодаря своей высокой яркости, быстрому созреванию, высокой стабильности и хорошей совместимости с желтыми флуоресцентными белками в качестве донора энергии при ферстеровском резонансном переносе энергии (FRET <sup>сноска 3</sup>). Кроме того, на момент начала нашей работы было опубликовано две структуры белка Cerulean (а на момент написания этого текста — уже четыре структуры) [114, 116–118].

Для проверки нашего предположения о возможности ионизации триптофанового хромофора мы решили провести мутагенез mCerulean по позициям, в которых замена на лизин или аргинин способна привести к тесному контакту между боковой группой аминокислоты и индольным фрагментом хромофора.

<sup>2</sup>Белок mCerulean не опубликован и является мутантом опубликованного белка Cerulean, несущим замену A206K. Эта замена известна тем, что увеличивает мономерность в мутантах avGFP.

<sup>3</sup>FRET (Forster Resonance Energy Transfer) — явление безызлучательного переноса энергии между флуорофорами, эффективно происходящее на расстояниях до 10 нм. FRET широко используется для визуализации белок-белковых взаимодействий.

В соответствии с нашей гипотезой, при достижении ионизации хромофора в мутантных белках, на спектрах их поглощения и флуоресценции мы ожидали увидеть батохромный сдвиг по сравнению со спектрами mCerulean — подобный тому, который был обнаружен на спектрах химически синтезированного хромофора CFP и который известен для ионизации хромофоров на основе тирозина.

#### 4.1.2. Выбор позиций для мутагенеза

Для того чтобы выбрать аминокислотные позиции для проведения мутагенеза, мы моделировали эффекты мутаций на лизин и аргинин в программе PyMol [115], используя одну из опубликованных структур белка Cerulean ([116], PDB ID — 2WSO).

При выборе мы руководствовались следующими соображениями:

- Аминокислота в выбранной позиции не должна участвовать в катализе созревания хромофора.
- Выбранная аминокислота входит в микроокружение хромофора (т.е. располагается близко к хромофору, а ее боковая цепь направлена внутрь  $\beta$ -бочонка).
- При компьютерном моделировании эффекта мутации положительно заряженная группа лизина или аргинина должна находиться в тесном контакте с хромофором хотя бы в одной из предсказанных конформаций.

Основываясь на этом, нами были выбраны четыре позиции<sup>4</sup> в белке mCerulean: V61, I146, T203 и S205 сноска 5.

#### 4.1.3. Получение мутантов mCerulean методом направленного мутагенеза

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*.

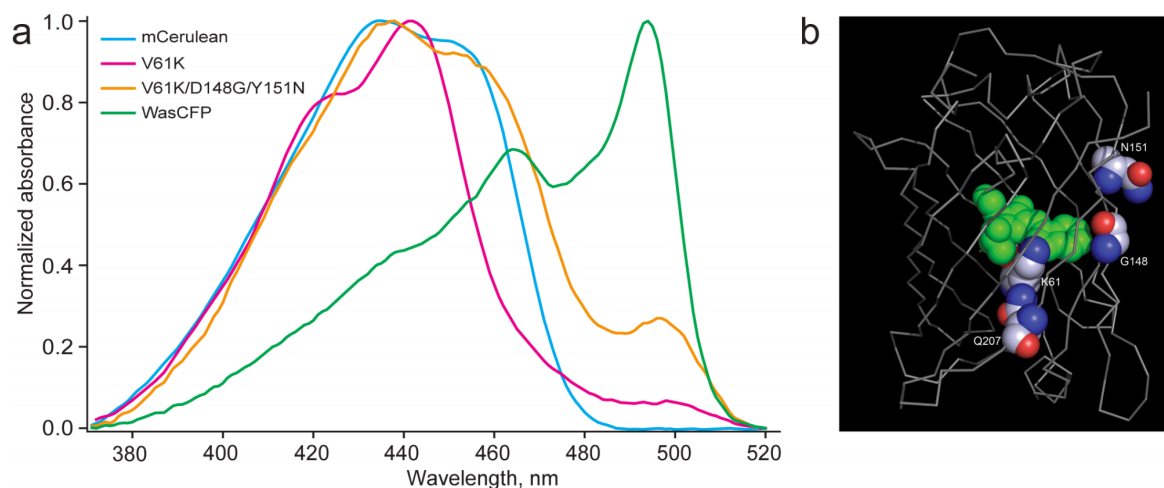
Колонии *E.coli*, экспрессирующие белки с заменами S205K, S205R, T203R и V61R, не флуоресцировали. Яркая, сравнимая с диким типом флуоресценция наблюдалась в мутантах T203K, I146K и I146R. Существенно более тусклым оказался белок mCerulean V61K.

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 4.3, малиновая кривая).

---

<sup>4</sup>Здесь и далее нумерация аминокислот приведена по последовательности avGFP.

<sup>5</sup>Однобуквенный и трехбуквенный коды аминокислот приведены в разделе 7.



**Рис. 4.3:** 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.

#### 4.1.4. 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>6</sup> белка 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 4.3, оранжевая кривая).

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

<sup>6</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 разделе «Материалы и методы».

#### 4.1.5. 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 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 4.3). 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 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.

#### 4.1.6. Спектральные характеристики WasCFP

Спектры поглощения WasCFP (mCerulean V61K D148G Y151N L207Q) отличались при различных температурах и значениях pH и демонстрировали наличие как минимум двух форм белка, существующих в равновесии (Рисунок 4.4). Одна из форм (сходная с той, в которой существует родительский белок mCerulean) обладала широким двугорбым пиком поглощения с максимумами при 434 и 458 нм. Другая форма — появившаяся в мутанте V61K — обладала пиком с максимумом поглощения при 494 нм. Спектр флуоресценции WasCFP также зависел от pH и температуры и демонстрировал наличие двух близко расположенных пиков (478 нм и 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).

Все спектральные изменения, связанные с изменениями pH и температуры, протекали быстро и обратимо (Рисунок 4.6), а на денатурирующем полиакриламидном электрофорезе образца

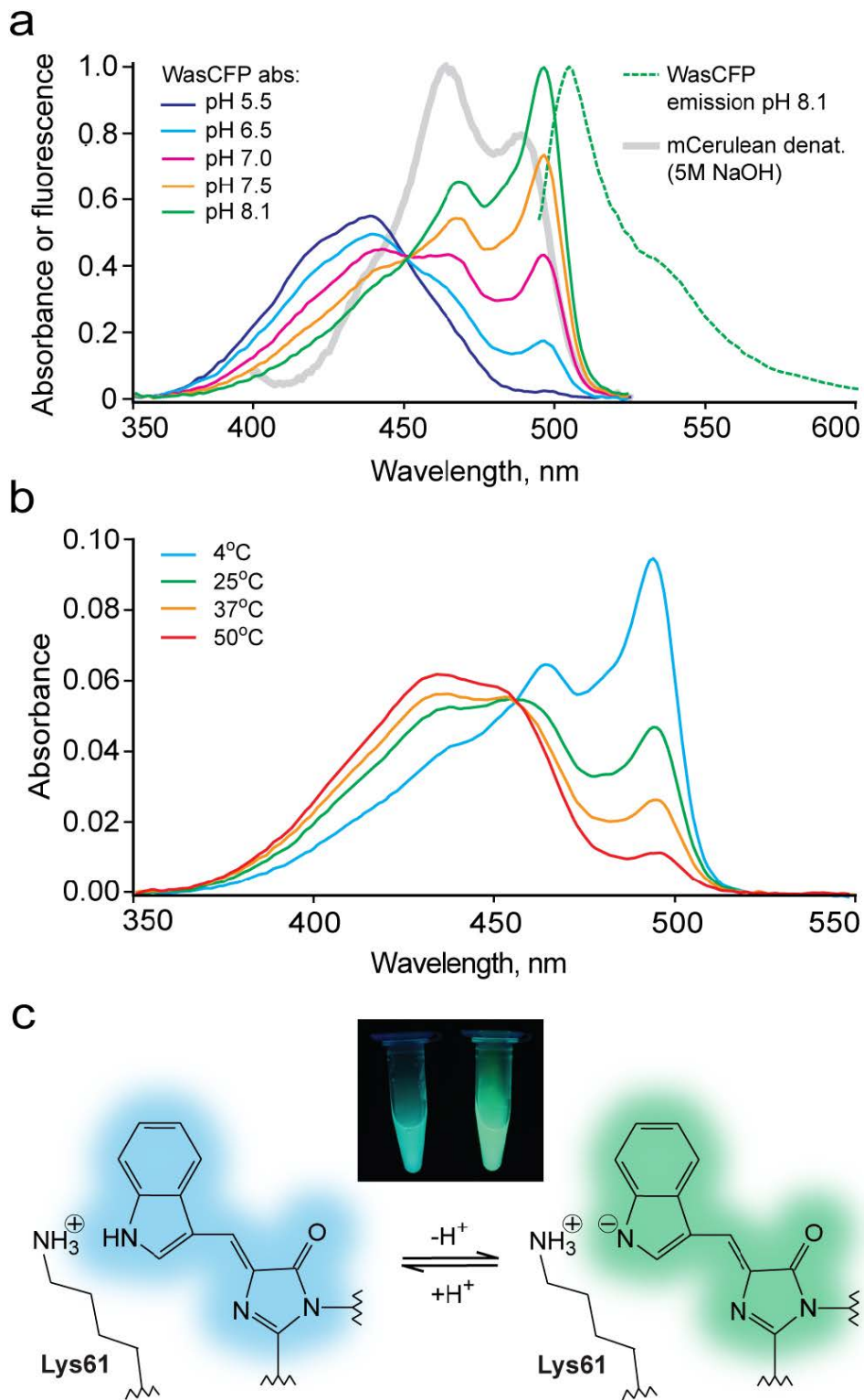
WasCFP мы не обнаружили продуктов фрагментации<sup>7</sup> (Рисунок 4.5).

Мы также измерили кинетику затухания флуоресценции WasCFP при различных pH<sup>8</sup> и обнаружили, что флуоресценция длинноволновой формы WasCFP затухает по моноэкспоненциальному закону со временем жизни 5.1 нс (Рисунок 4.7). 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 может быть перспективной меткой для микроскопии времени жизни флуоресценции.

---

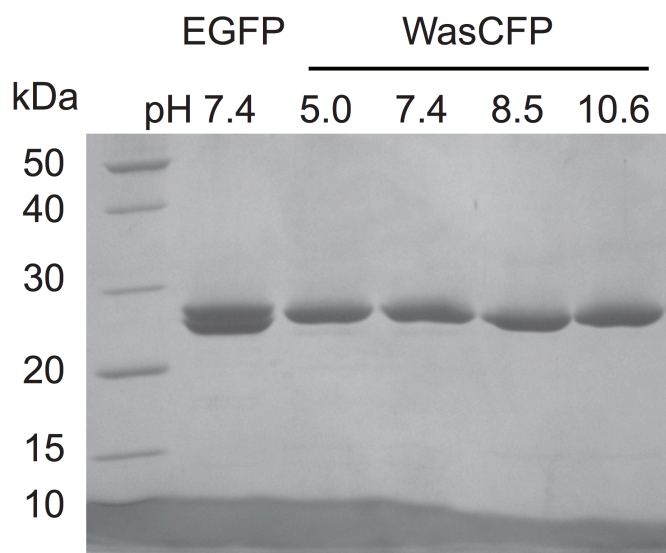
<sup>7</sup>Фрагментация белковой цепи с разрывом в области хромофора характерна для флуоресцентных белком, содержащих ацилиминную связь в хромофоре.

<sup>8</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.



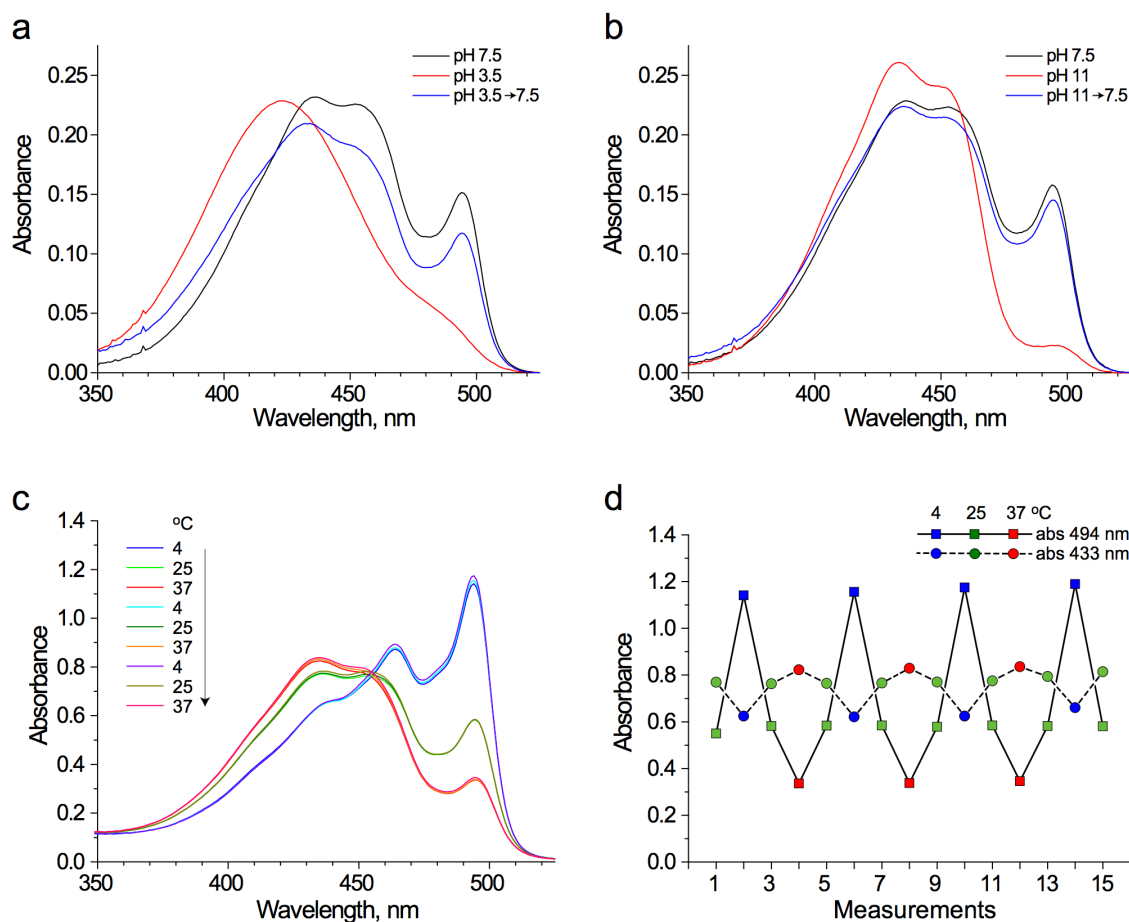
**Рис. 4.4:** Спектральные свойства WasCFP. (A) Спектры поглощения WasCFP при различных pH, спектр флуоресценции WasCFP и спектр поглощения mCerulean, денатурированного в щелочи. (B) Спектры поглощения WasCFP при различных температурах. (C) Флуоресценция WasCFP при pH 5.0 и pH 8.0 (облучение ультрафиолетовым светом).





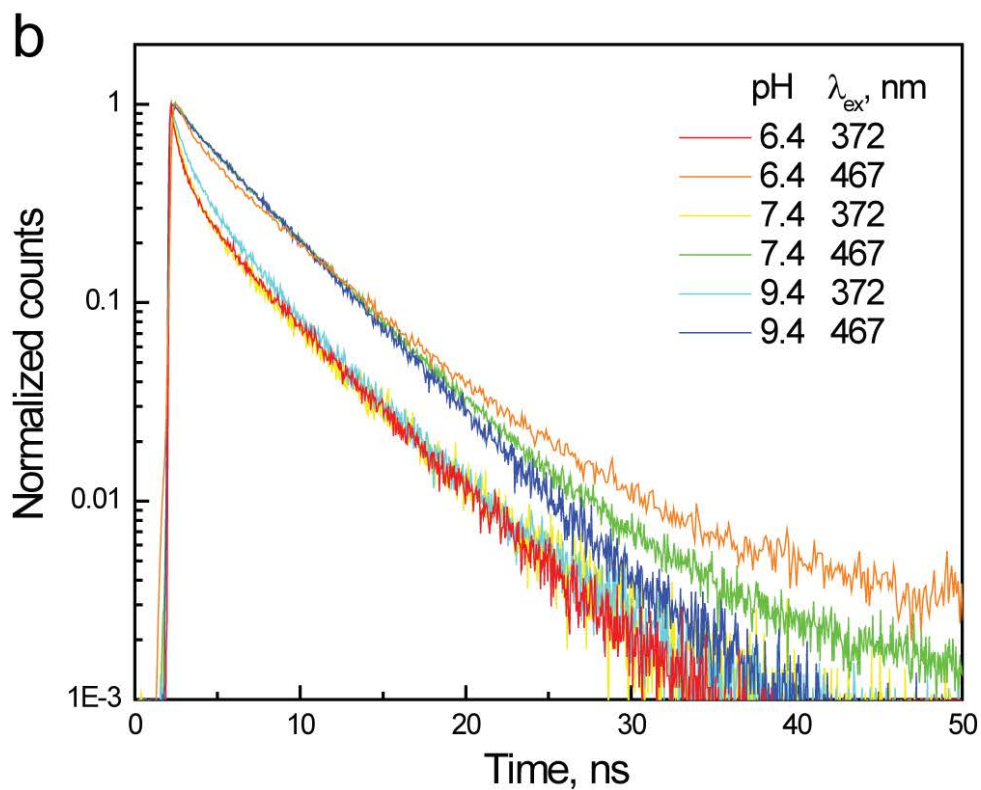
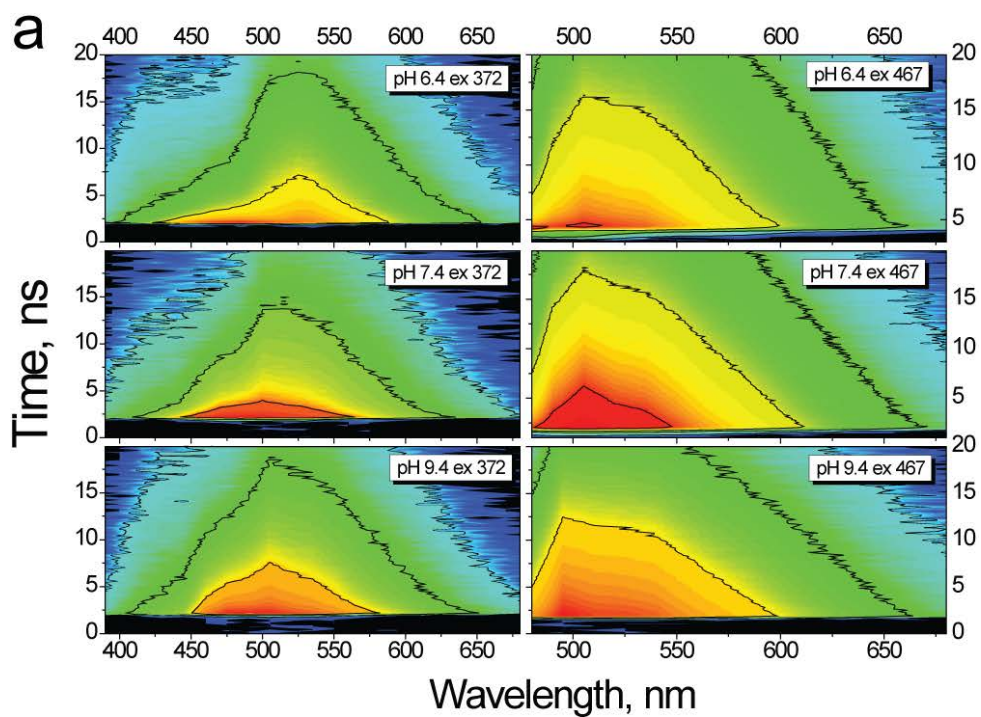
**Рис. 4.5:** Отсутствие фрагментации полипептидной цепи WasCFP.

Очищенный препарат WasCFP анализировали градиентным 10-20% полиакриламидным гель-электрофорезом. Образцы белка инкубировали при указанных pH в течение часа перед пятиминутным кипячением в буфере для нанесения. Гель окрашивали с помощью Coomassie Blue. Единственная видимая полоса в области 28 kDa соответствует полноразмерному белку. EGFP показан для сравнения.



**Рис. 4.6:** Обратимость индуцируемых pH и температурой спектральных изменений в WasCFP.

Обратимость изменений в спектрах поглощения WasCFP при закислении (a) и защелачивании (b), при циклическом изменении температуры (c и d).



**Рис. 4.7:** Спектры флуоресценции WasCFP, снятые с разрешением по времени.

(а) Контурный график изменения спектров эмиссии WasCFP при различных pH. Цвет отражает интенсивность флуоресценции, красный цвет соответствует большим интенсивностям.

(б) Кривые затухания флуоресценции WasCFP при 510 нм, возбужденной светом 372 и 467 нм в растворах с разными значениями pH.

#### 4.1.7. Зависимость спектров поглощения WasCFP от температуры

Мы обнаружили, что спектры поглощения WasCFP зависят от температуры. При низких температурах (0°C) более выраженным оказывался длинноволновый пик, при повышении температуры равновесие сдвигалось в сторону коротковолнового (Рисунок 4.4, b). На спектре поглощения существовала изобестическая точка (455 нм), в которой оптическая плотность не зависела от температуры.

#### 4.1.8. Зависимость спектров поглощения WasCFP от pH

Как и при повышении температуры, при снижении pH от 9.5 до 5.5 мы наблюдали «перетекание» длинноволнового пика поглощения в коротковолновый (Рисунок 4.8). На спектрах также обнаруживалась изобестическая точка при 444 нм. Так же как в случае с температурой, изменения спектров при изменении pH происходят быстро и обратимо (за исключением крайних значений pH, при которых белок постепенно денатурирует).

Интересно, что при повышении pH выше 9.5 доля длинноволновой формы также начинает уменьшаться, а коротковолновой – возрастать, за чем (при дальнейшем повышении pH) следует денатурация белка. Для спектров, снятых при pH более 9.5, изобестическая точка отсутствует.

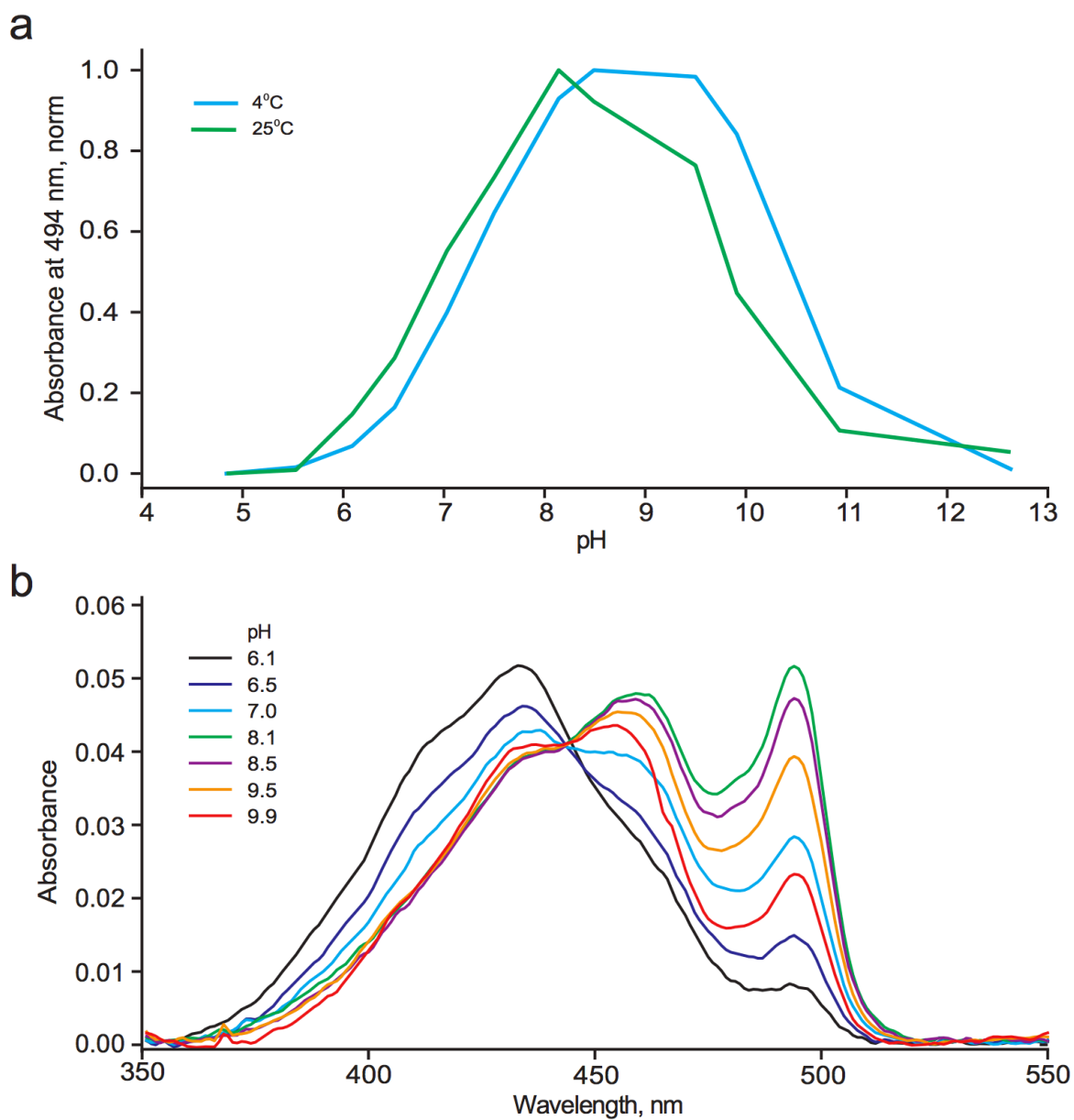
При понижении pH ниже 6.5 становится заметным изменение спектра коротковолновой формы белка. Это изменение выглядит как перетекание пика в области 455 нм в пик при 415 нм и свидетельствует о появлении новой спектральной формы. При значениях pH *ниже* 4.6, вероятно, происходит денатурация белка, приводящая к тому, что на спектре остается один «недвугорбый» пик с максимумом при 415 нм, сходный со спектром протонированного синтетического хромофора (Рисунок 4.9).

#### 4.1.9. Зависимость спектров флуоресценции от pH

Как и спектры поглощения, спектры флуоресценции WasCFP также зависят от pH. При изменении pH меняется как общая интенсивность флуоресценции, так и соотношение между пиками флуоресценции с максимумами при 480 и 505 нм.

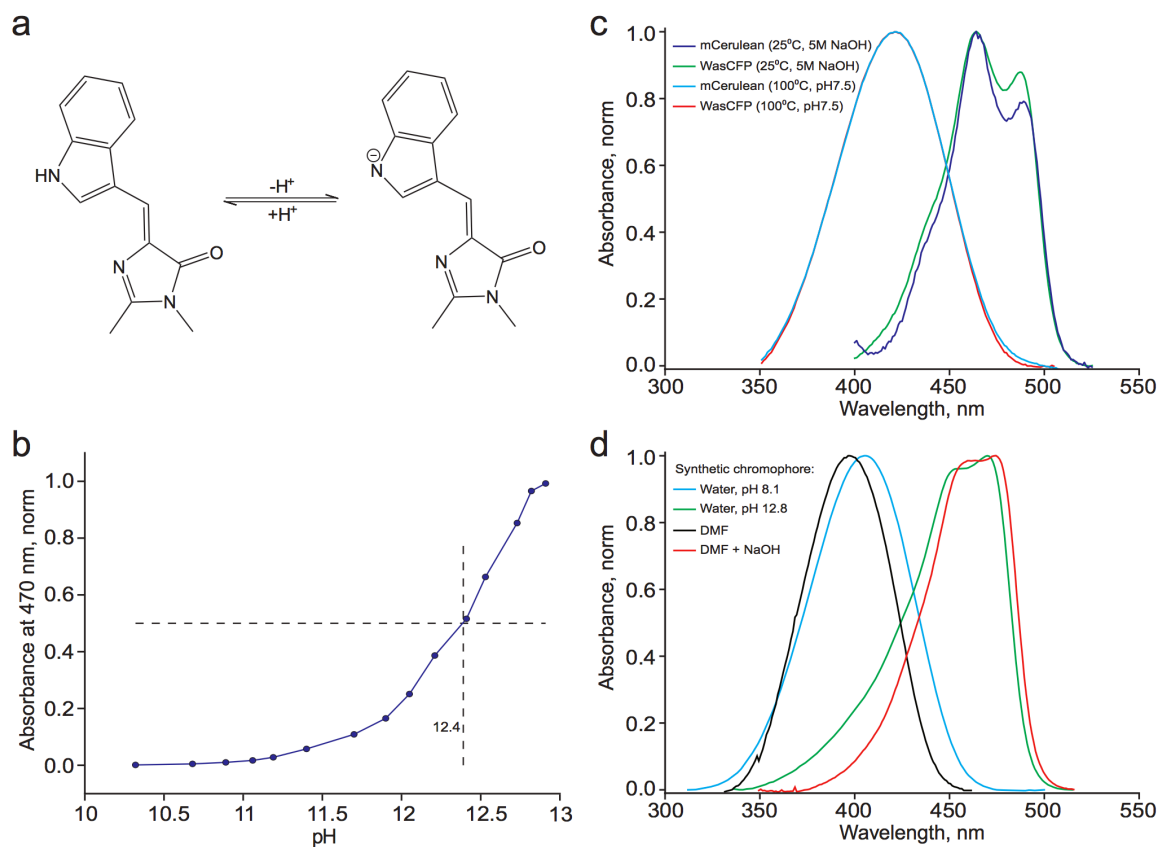
Родительский белок Cerulean обладает «двугорбым» пиком флуоресценции с максимумами 474 и 503 нм [119]. Спектры флуоресценции при возбуждении светом 485 нм (т.е. при возбуждении только длинноволновой формы) позволяют говорить о том, что длинноволновая форма WasCFP испускает свет с максимумом 505 нм и дополнительным плечом около 540 нм. Такой же вывод следует из совместного анализа изменения соотношения пиков на спектрах поглощения и флуоресценции.

Характер изменений на спектре флуоресценции совпадает с изменениями на спектре поглощения: при защелачивании наблюдается возрастание интенсивности зеленой флуоресценции и снижение интенсивности голубой. Таким образом, новая длинноволновая форма обладает зеле-



**Рис. 4.8:** Спектры поглощения WasCFP в растворах с разными значениями кислотности.

(a) Изменение оптической плотности при 494 нм при различных температурах. (b) Спектры поглощения WasCFP при температуре 25°C.



**Рис. 4.9:** Ионизация синтетического CFP-хромофора, а также CFP-хромофора во флуоресцентном белке. **(a)** Структуры синтетического CFP-хромофора в нейтральной и анионном состояниях. **(b)** pH-титрование синтетического CFP-хромофора. **(c)** Нормализованные спектры поглощения WasCFP и mCerulean, денатурированных в нейтральных (pH 7.5, 100°C), и щелочных условиях (5M NaOH, 25°C). **(d)** Нормализованные спектры поглощения синтетического CFP-хромофора при pH 8.1 и 12.8.

ной флуоресценцией, в то время как исходная коротковолновая — циановой. В дальнейшем мы будем называть коротковолновую форму циановой, а длинноволновую — зеленой.

#### 4.1.10. Зависимость спектров поглощения WasCFP от концентрации мочевины

Флуоресцентные белки отличаются устойчивостью к высоким концентрациям мочевины [120, 121], поэтому для нас стала неожиданностью зависимость спектров поглощения WasCFP от сравнительно низких концентраций мочевины (Рисунок 4.10). При повышении концентрации мочевины от 0 до 2М мы наблюдали возрастание пиков с максимумами при 494 и 458 нм (рН и температуру в этих экспериментах поддерживали постоянными). В то же время, не было обнаружено изменений (в частности, уменьшения) оптической плотности в других частях спектра.

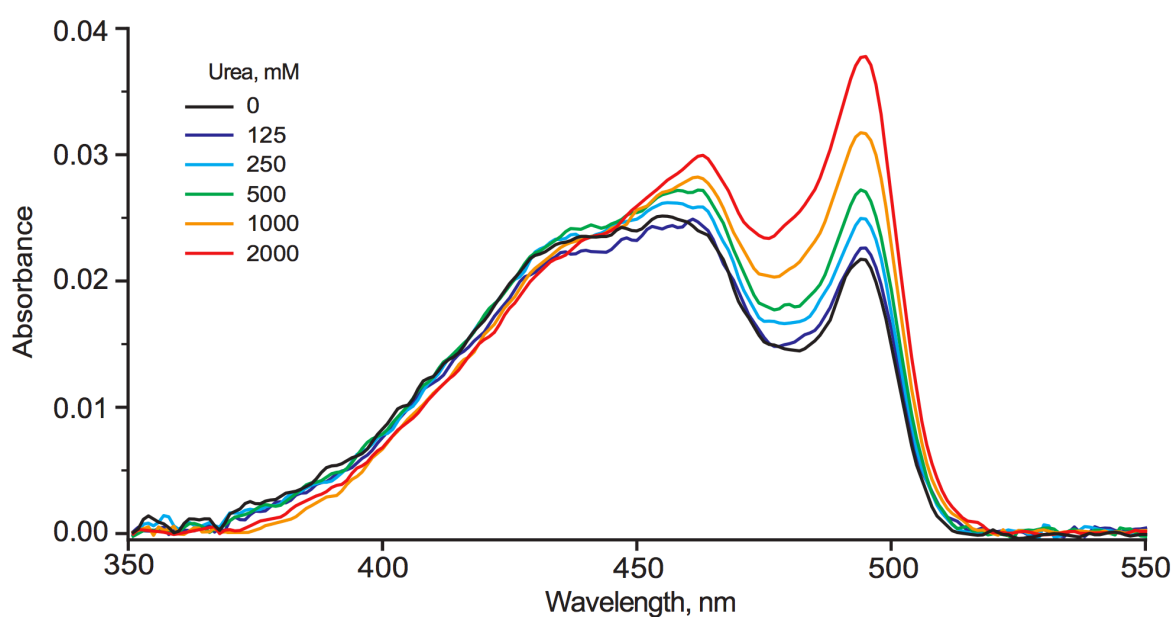


Рис. 4.10: Спектры поглощения WasCFP при различных концентрациях мочевины.

## 4.2. Интерпретация спектральных свойств WasCFP

Для ответа на вопрос о природе длинноволновой формы WasCFP следует предварительно ответить на несколько вопросов.

### 4.2.1. Являются ли пики на 495 нм и 458 нм пиками поглощения одной формы белка?

Да, являются. Во всех зарегистрированных изменениях спектра поведение пика на 458 нм повторяет поведение пика на 495 нм (что особенно хорошо иллюстрирует зависимость спектра поглощения WasCFP от концентрации мочевины — см. Рисунок 4.10). В то же время, по-видимому, полоса поглощения около 458 нм формируется в результате частичной суперпозиции пика поглощения коротковолновой формы с максимумом при 453 нм (см, например, спектр поглощения WasCFP при температуре 50°C на Рисунке 4.4) и пика поглощения длинноволновой формы (458 нм).

### 4.2.2. Что происходит с белком при значениях pH ниже 6?

Как было сказано выше, при значениях pH меньше шести происходит изменение спектра коротковолновой формы белка, что выглядит как перетекание пика с максимумом при 453 нм в пик с максимумом при 415 нм (Рисунок 4.6, А). Более детальный анализ происходящих изменений, однако, показывает, что их следует интерпретировать как гипсохромный сдвиг «двугорбого» пика, существующего при нейтральных pH, примерно на 15-20 нм. В результате такого сдвига полоса с максимумом около 453 нм перемещается на место полосы с максимумом около 434 нм, из-за чего кажется, что последняя изменяется незначительно.

Благодаря кристаллической структуре, полученной Мало с коллегами для белка Cerulean [116], мы знаем, что при низких значениях pH происходит изомеризация хромофора вокруг  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -связи остатка триптофана, сопровождающаяся схожим изменением спектров [114, 116]. Поэтому мы считаем наиболее вероятным, что и в WasCFP происходит такая изомеризация.

### 4.2.3. Почему положения изобестических точек для температурной и pH-зависимостей спектров поглощения отличаются?

Скорее всего, это отличие связано с тем, что температурная зависимость снималась при pH 7.4. Возможно, если провести аналогичные измерения при pH 9, положения изобестических точек совпадут.

#### **4.2.4. Почему увеличивается оптическая плотность в области поглощения длинноволновой формы при увеличении концентрации мочевины?**

Так как в других областях спектра не происходит уменьшения оптической плотности, мы считаем, что появление в растворе мочевины приводит к увеличению коэффициента экстинкции длинноволновой формы белка.

#### **4.2.5. Почему длинноволновая форма белка исчезает при высоких pH ( $pK = 10.5$ )?**

Сдвинутый в длинноволновую область пик возбуждения флуоресценции возник в белке, содержащем замену V61K по сравнению с белком mCerulean. Мы предполагаем, что лизин, помещенный на место валина, благодаря основным свойствам своей боковой группы взаимодействует с индольным фрагментом хромофора и приводит к его ионизации.  $pK_a$  аминогруппы боковой цепи лизина составляет 10.48 — точно совпадая с  $pK$  исчезновения длинноволновой формы при высоких pH.

Таким образом, можно предположить, что при высоких pH происходит вытитрование лизина, что приводит к нарушению его взаимодействий с хромофором и протонированию последнего.

#### **4.2.6. Чем объясняется зависимость спектров поглощения от pH?**

Мы предполагаем, что наблюдаемые спектральные изменения связаны с изменением степени протонирования хромофора. Если это так, зависимость спектров от pH вполне ожидаема при условии возможности доступа ионов водорода к хромофору. Отметим, что в близком по структуре белке avGFP доступ протонов растворителя к хромофору не только существует, но и детально изучен [122].

#### **4.2.7. Чем объясняется зависимость спектров поглощения от температуры?**

Увеличение температуры приводит к увеличению внутримолекулярных движений и общей дестабилизации белковой глобулы. Мы предполагаем, что возможность ионизации хромофора напрямую связана с расстоянием между аминогруппой лизина и атомом азота индола. С ростом температуры появляется возможность дополнительных конформационных движений, и уменьшается среднее время, которое аминогруппа лизина проводит в контакте с хромофором. В результате, падает доля молекул белка с хромофором в ионизованном состоянии.

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

Ионизацию хромофора сложно зарегистрировать напрямую. Для того, чтобы получить данные, которые бы помогли разобраться с природой длинноволновой формы, мы провели дополнительный



эксперимент. В этом эксперименте мы измеряли спектры поглощения аликвот белка, денатурированных кипячением в буфере с нейтральным значением pH и концентрированным раствором щелочи. В результате, освободив хромофор от специфических внутрибелковых взаимодействий, мы рассчитывали зарегистрировать его спектры в соответственно нейтральном и отрицательно заряженном состояниях. Полученные спектры представлены на Рисунке 4.9.

Из Рисунка 4.9 также видно, что, подобно с синтетическому хромофору, спектры отрицательно заряженной формы хромофора WasCFP сдвинуты в длинноволновую область по сравнению со спектром нейтральной. Спектр отрицательно заряженной формы имеет трехгорбую форму с максимумами поглощения около 440, 463 и 489 нм. Для сравнения, спектр поглощения белка WasCFP, снятый при низких температурах и нейтральных значениях pH, имеет максимумы около 434, 458 и 494 нм.

Рассмотрим известные причины батохромных сдвигов на спектрах флуоресцентных белков.

Так как в белке WasCFP батохромный сдвиг составляет более 40 нм по сравнению с mCerulean, кажется маловероятным, чтобы этот сдвиг возник в результате изменения общей полярности аминокислотного окружения (известно, что изменения полярности аминокислотного окружения оказывают наименьшее влияние на спектры флуоресцентных белков по сравнению с другими типами воздействий). Отметим, что сдвиг спектров синтетического хромофора в полярном и неполярном растворителях (вода и диметилформамид) не превышает 20 нм (Рисунок 4.9).

Также представляется сомнительным, что причиной батохромного сдвига может быть расширение ароматической системы хромофора за счет образования новых ковалентных связей, так как спектры денатурированных тем или иным способом белков mCerulean и WasCFP практически идентичны, а вызванные изменением pH и температуры изменения на спектрах быстры и обратимы.

Вероятными для объяснения наблюдаемых спектральных свойств кажутся две причины — стеккинг-взаимодействия хромофора и ионизация ароматической системы.

Например, можно предположить, что появление батохромного сдвига изомеризацией хромофора, в результате которой возникают его стеккинг-взаимодействия с ароматическими аминокислотами, например, с Phe165 (Рисунок 4.11). В таком случае, мы действительно могли бы наблюдать равновесие между двумя спектрально различными изомерными формами белка.

Для хромофора в WasCFP возможны две различных изомеризации - вокруг  $C_\beta$ - $C_\gamma$ -связи и вокруг  $C_\alpha$ - $C_\beta$ -связи.

Изомеризация вокруг  $C_\beta$ - $C_\gamma$ -связи вряд ли может привести к стеккинг-взаимодействиям. Такая

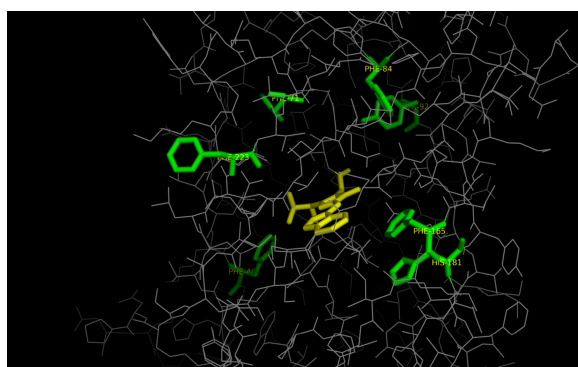


Рис. 4.11: Ароматические аминокислоты, окружающие хромофор в белке Cerulean.

изомеризация описана для хромофора Cerulean при низких значениях pH [114], а длинноволновый пик поглощения WasCFP наиболее выражен в щелочных pH. Кроме того, в белке WasCFP и так наблюдается гипсохромный сдвиг спектров поглощения в кислых pH, предположительно связанный с изомеризацией вокруг  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -связи.

Также изомеризация вокруг  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -связи происходит внутри объема, занимаемого хромофором [114]. Так как ближайшая (и, вероятнее всего, единственная подходящая для стеккинг-взаимодействий) аминокислота Phe165 находится на расстоянии около 4 ангстрем от индольного фрагмента хромофора, для обеспечения контакта с ней, скорее всего, необходима изомеризация вокруг  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ -связи.

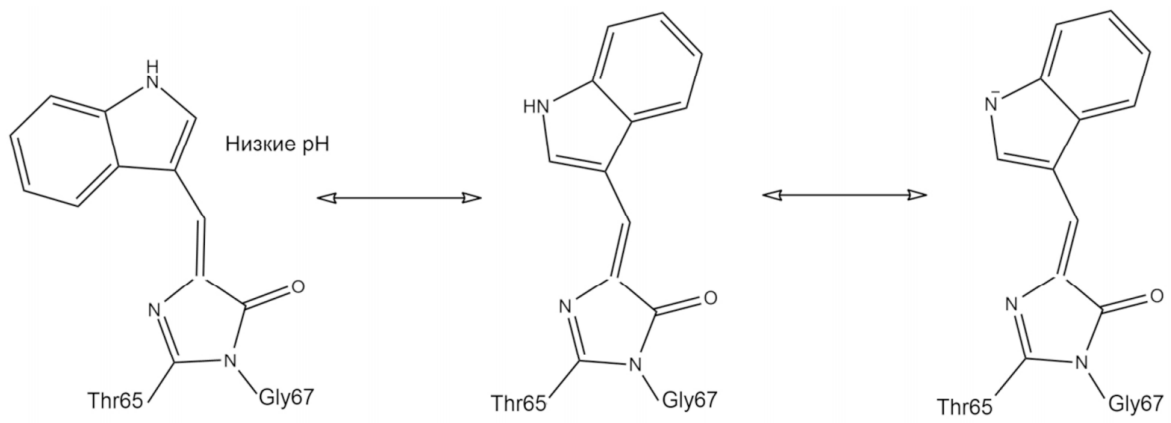
Однако и изомеризация вокруг  $C_{\alpha}$ - $C_{\beta}$ -связи едва ли может объяснить наблюдаемое спектральное поведение WasCFP. Если причиной батохромного сдвига является изомеризация, не ясно, как объяснить сложную pH-зависимость спектров WasCFP, а также их зависимость от температуры. Кроме того, длинноволновая форма не имеет характерного для триптофановых хромофоров двугорбого пика на спектре поглощения, что можно было бы ожидать, если бы причиной ее появления была изомеризация хромофора. Наконец, близкий к mCerulean флуоресцентный белок ECFP, в котором триптофановый хромофор вовлечен в стеккинг-взаимодействия с Tyr203, обладает характерными двугорбыми спектрами с батохромным сдвигом лишь на 20 нм, а также крайне pH-стабилен [105].

Мы склонны считать, что длинноволновый пик на спектрах белка WasCFP формируется в результате поглощения света молекулами белка с отрицательно заряженным хромофором. В пользу этого свидетельствуют следующие наблюдения:

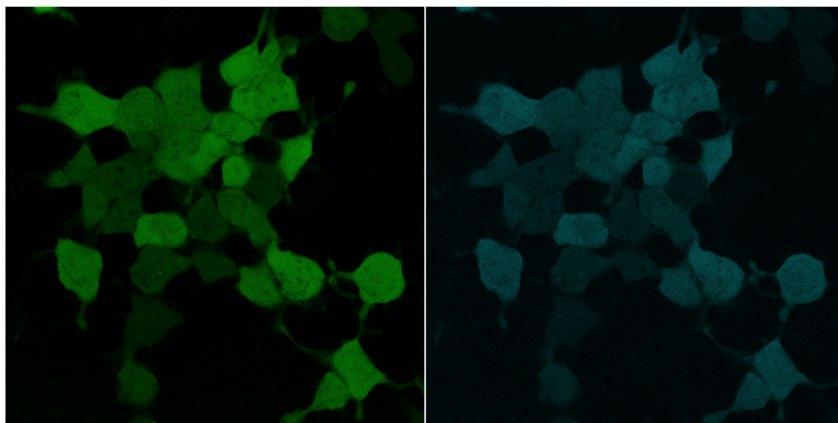
- Длинноволновый пик возник в результате замены гидрофобной аминокислоты на аминокислоту с основной группой;
- Длинноволновый пик поглощения выражен в щелочных условиях;
- Длинноволновый пик поглощения исчезает при повышении температуры, когда влияние окружающих хромофор аминокислотных взаимодействий 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.

#### 4.2.9. 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 (вокруг  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -связи остатка триптофана), нейтральном Z-изомеризованном и анионном Z-изомеризованном (Рисунок 4.12).



**Рис. 4.12:** Предполагаемые состояния хромофора в белке WasCFP.



**Рис. 4.13:** Экспрессия WasCFP в клетках линии эмбриональной почки человека (HEK 293T). Детекция флуоресценции в циановой (справа) и зеленой (слева) областях спектра.

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, дополнительные пики с максимумами при 460 и 434 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).

### 4.3. 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 HEK 293T плазмидой, содержащей ген WasCFP под контролем цитомегаловирусного промотора.

Общая морфология клеток, экспрессирующих WasCFP не отличалась от морфологии нетрансфицированных клеток вплоть до пятых суток после трансфекции. Кроме того, WasCFP не формировал в клетке видимых белковых агрегатов. Таким образом, внесенные в WasCFP замены не привели к увеличению цитотоксичности белка по сравнению с нетоксичным mCerulean.

Для белка WasCFP возможна детекция флуоресцентного сигнала как в циановой, так и в зеленой областях спектра (Рисунок 4.13). Однако мы обнаружили, что клетки, экспрессирующие WasCFP, выглядят в циановом флуоресцентном канале значительно менее яркими, чем клетки, экспрессирующие mCerulean, а в зеленом канале – значительно менее яркими, чем клетки, экспрессирующие EGFP.

Таким образом, хотя использование WasCFP в качестве метки для флуоресцентной микроско-

пии и возможно, этот белок не является оптимальным, так как яркость экспрессирующих его клеток и соотношение сигнал/шум остаются низкими. Кроме того, 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.

## 4.4. Получение белка со стабильной анионной формой хромофора

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

Так как предыдущая попытка направленной эволюции WasCFP оказалась неудачной (см. раздел 4.1.5), в этот раз мы изменили методику скринингования. 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 4.14). 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.

### 4.4.2. Спектральные характеристики NowGFP

Максимумы поглощения и возбуждения флуоресценции NowGFP совпадают и приходятся на 494 нм (Рисунок 4.15, 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 9</sup>.

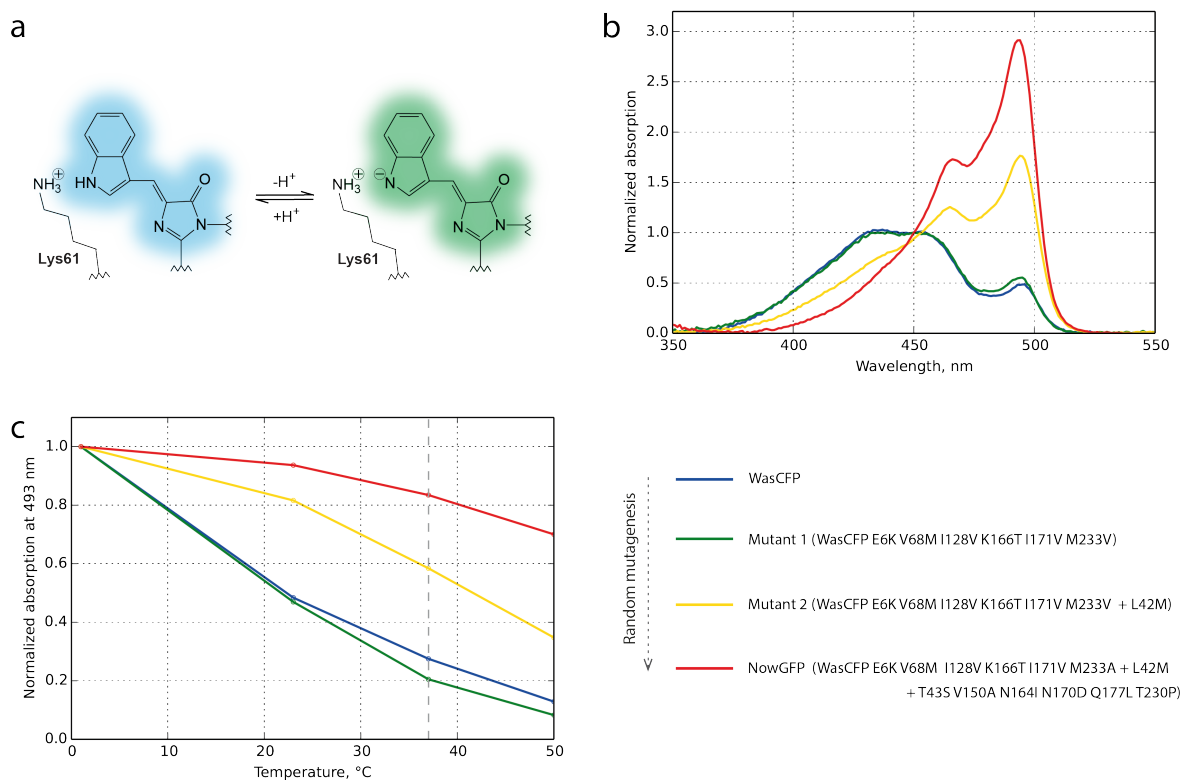
Так же, как и в WasCFP, равновесие между нейтральной и анионной формами хромофора в NowGFP зависят от pH и температуры. В NowGFP, однако, анионная форма доминирует при 37°C, 50°C и даже более высоких температурах и в более широком диапазоне pH (Рисунок 4.15, b и c).  $pK_a$  NowGFP<sup>10</sup> составляет 6.2.

NowGFP унаследовал необычно долгое время жизни флуоресценции зеленой формы WasCFP: флуоресценция NowGFP также затухает моноэкспоненциально с временем жизни 5.1 нс (Рисунок 4.15, d). Кроме того, мы обнаружили, что время жизни флуоресценции не зависит от pH (Рисунок 4.15, b).

---

<sup>9</sup>Измерения при комнатной температуре и pH 7.4

<sup>10</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. 4.14:** Направленная эволюция с отбором на стабилизацию анионной формы.

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

(б) 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.

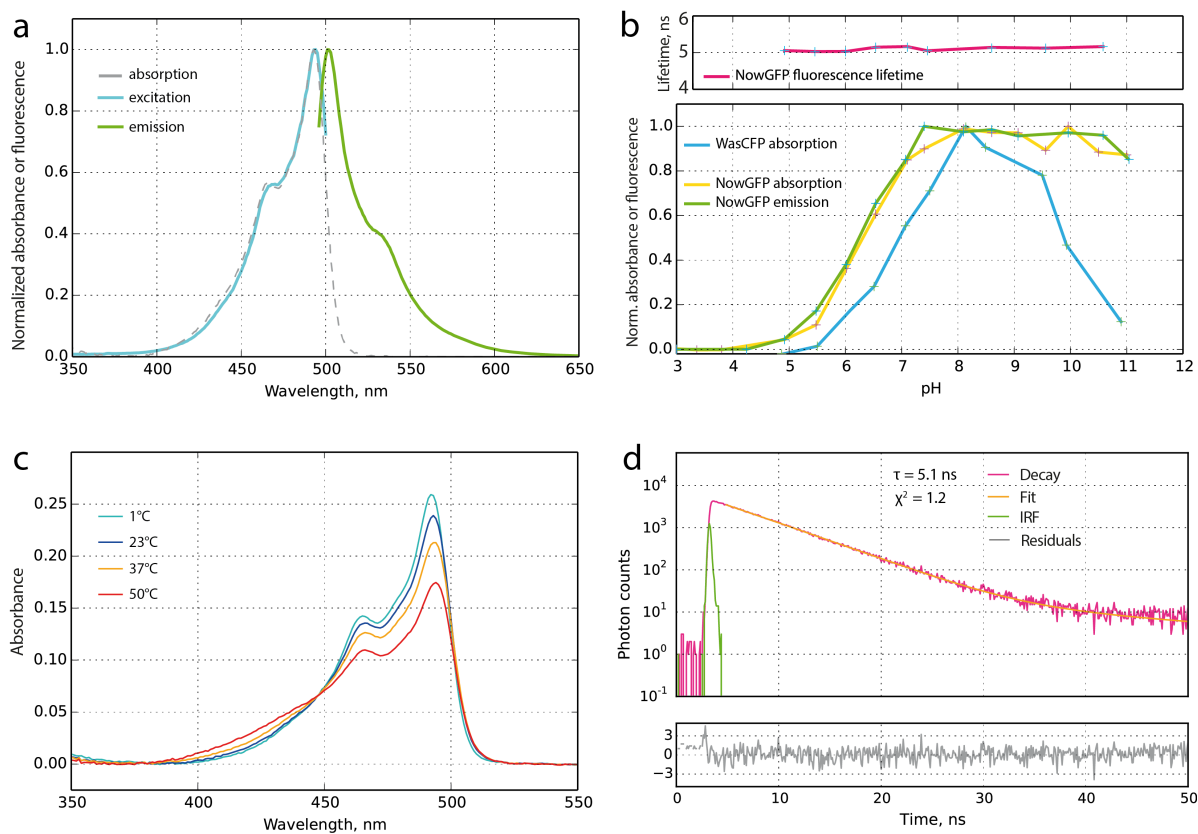
(с) Нормализованные значения оптической плотности при 493 нм растворов некоторых из отобранных нами мутантных белков при различных температурах.

В лаборатории Михаила Дробышева (Department of Cell Biology and Neuroscience, Montana State University, Bozeman, MT 59717, США) были определены спектры двухфотонного возбуждения флуоресценции NowGFP (Рисунок 4.16). Эти спектры 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 приходится на 920 нм (и составляет  $17 \text{ GM}^{11}$ ). Для родительского белка mCerulean пик двухфотонного возбуждения практически совпадает с удвоенным значением пика однофотонного возбуждения.

Из литературы известно, что подобные гипсохромные<sup>12</sup> сдвиги двухфотонных спектров 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

<sup>11</sup>Сечение двухфотонного возбуждения измеряется в единицах Гепперт-Майер (ГМ);  $1 \text{ GM} = 10^{-50} \cdot \text{см}^4 \cdot \text{с} \cdot \text{фот}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$



**Рис. 4.15:** 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.

66) максимумы двухфотонного и однофотонного возбуждения совпадают или отличаются незначительно.

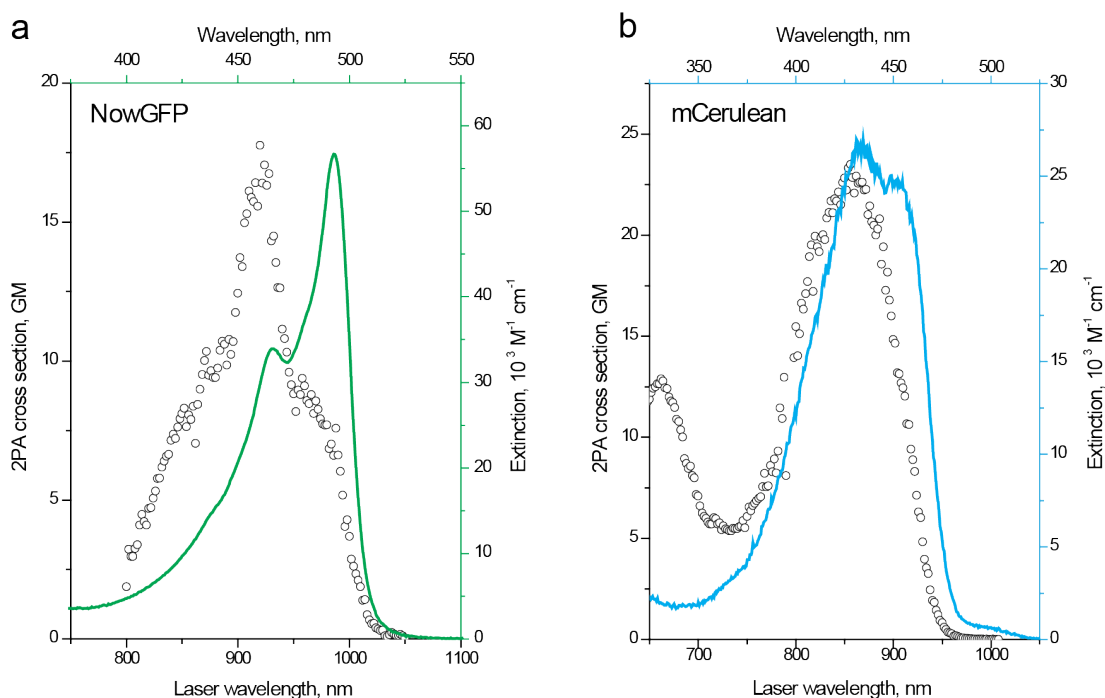
Наблюдаемый коротковолновый сдвиг спектров двухфотонного поглощения был недавно объяснен вибронным (электронно-колебательным) сопряжением Херберга-Теллера, наблюдаемым только для двухфотонных переходов хромофоров, чьи пи-системы способны резонировать между двумя состояниями — что более вероятно в случае анионных хромофоров [123]. В рамках предложенной модели наши коллеги смогли количественно описать спектр двухфотонного поглощения NowGFP, как сумму двух сдвинутых и нормализованных спектров однофотонного поглощения (Рисунок 4.17).

#### 4.4.3. Фотопереключения NowGFP

Мы обнаружили, что NowGFP проявляет свойства фотопереключаемого белка. Короткое облучение NowGFP синим светом обратимо фотопереключает NowGFP в нефлуоресцентное состояние, из которого белок возвращается в течение нескольких секунд.

<sup>12</sup>Гипсохромные — смещенные в коротковолновую область.





**Рис. 4.16:** Спектры двухфотонного поглощения NowGFP и mCerulean.

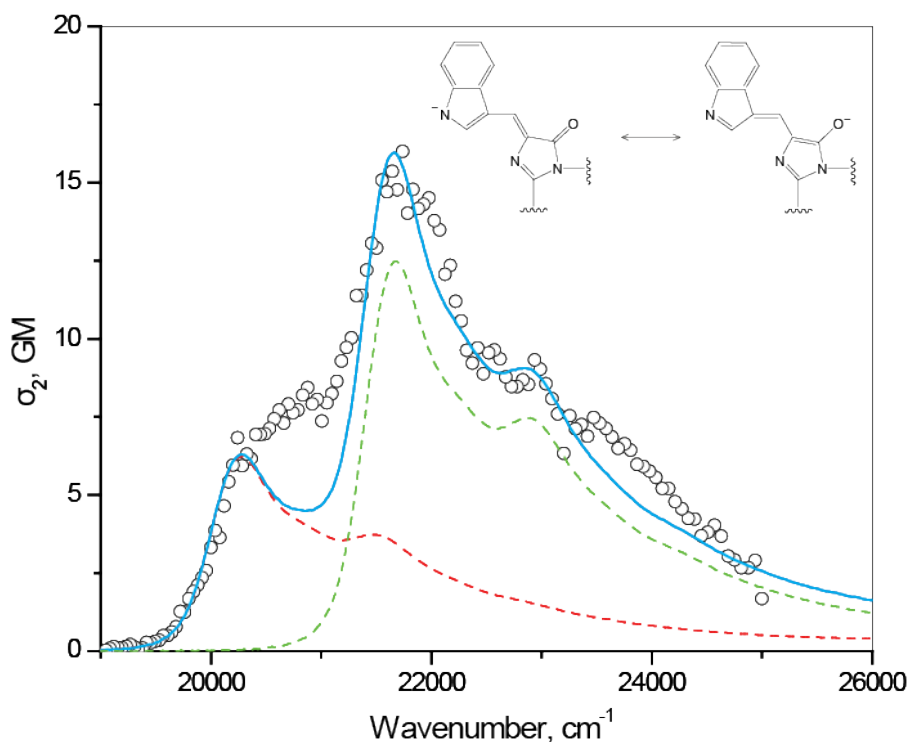
Спектры двухфотонного поглощения (показаны кружками) NowGFP (a) и mCerulean (b) представлены в абсолютных значениях сечения двухфотонного поглощения. Для сравнения, спектры однофотонного поглощения (зеленая и голубая линии) представлены в значениях коэффициентов экстинкции.

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).

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 в результате светонезависимого превращения, похожи на спектры mCerulean в нейтральных pH.

На основании этих наблюдений мы предлагаем следующее структурное объяснение наблюдаемых спектральных форм. 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, при-



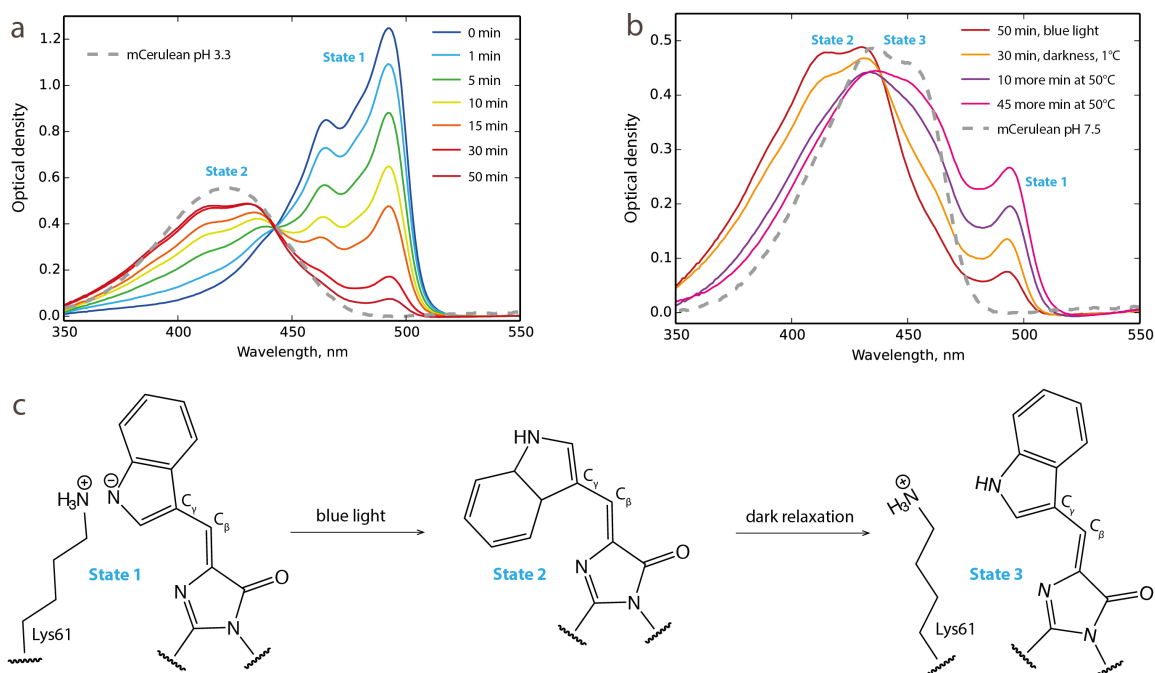
**Рис. 4.17:** Анализ спектров двухфотонного поглощения NowGFP в рамках модели вибронного сопряжения Херберга-Теллера. Спектр двухфотонного поглощения показан незакрашенными кружками. Голубой линией показаны результаты моделирования спектра двухфотонного поглощения с использованием двух реплик спектров однофотонного возбуждения: (1) спектра однофотонного поглощения NowGFP, нормализованного так, чтобы совпадать с низкочастотной частью спектра двухфотонного поглощения (красная пунктирная линия), (2) спектра однофотонного поглощения NowGFP, сдвинутого на  $1400\text{ cm}^{-1}$  в область высоких частот и нормализованного так, чтобы его сумма с первой репликой наиболее хорошо описывала спектр двухфотонного возбуждения (зеленая пунктирная линия). Вставка показывает две предполагаемые резонансные структуры хромофора NowGFP.

водящую 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 в результате фотоконверсии.

#### 4.5. 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 [124].

В этой работе обнаружено, что Lys61 в NowGFP существует в двух конформациях, заселенность которых зависит от pH (Рисунки 4.19 и 4.20). 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



**Рис. 4.18:** 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).

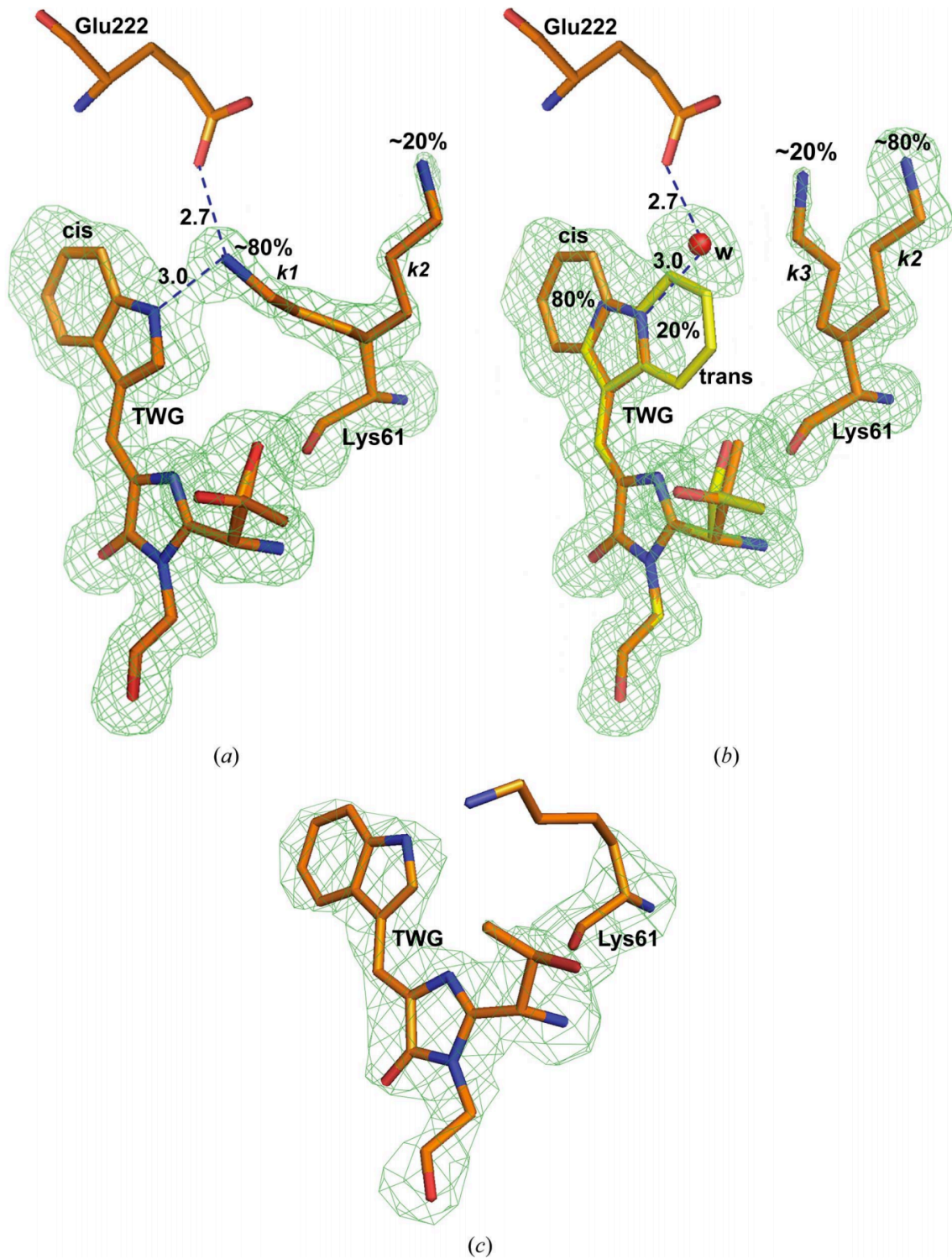
(в) Предлагаемая модель структурных причин фотоконверсии. Анионный хромофор на основе триптофана (состояние 1) под действием синего света превращается в  $C_{\beta}$ - $C_{\gamma}$ -изомеризованный нейтральный хромофор (состояние 2), который затем релаксирует в «нормальную» конформацию нейтрального хромофора,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

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  $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH-}$  при облучении и свидетельствует в пользу разрушения боковой группы Lys61 по связи  $C_{\gamma}\text{-}C_{\delta}$ .

#### 4.6. 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 4.21).



**Рис. 4.19:** 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.

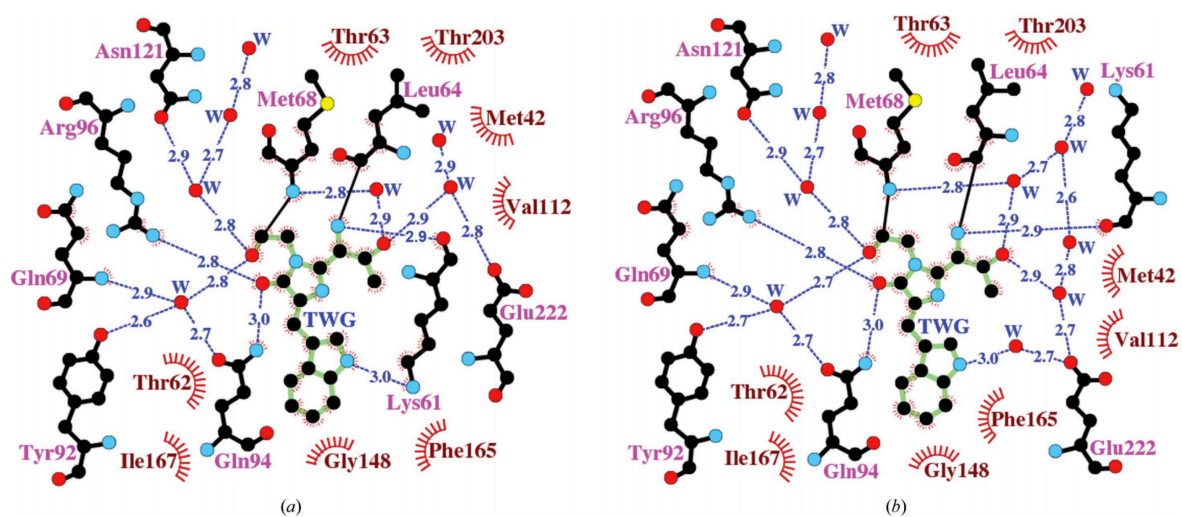
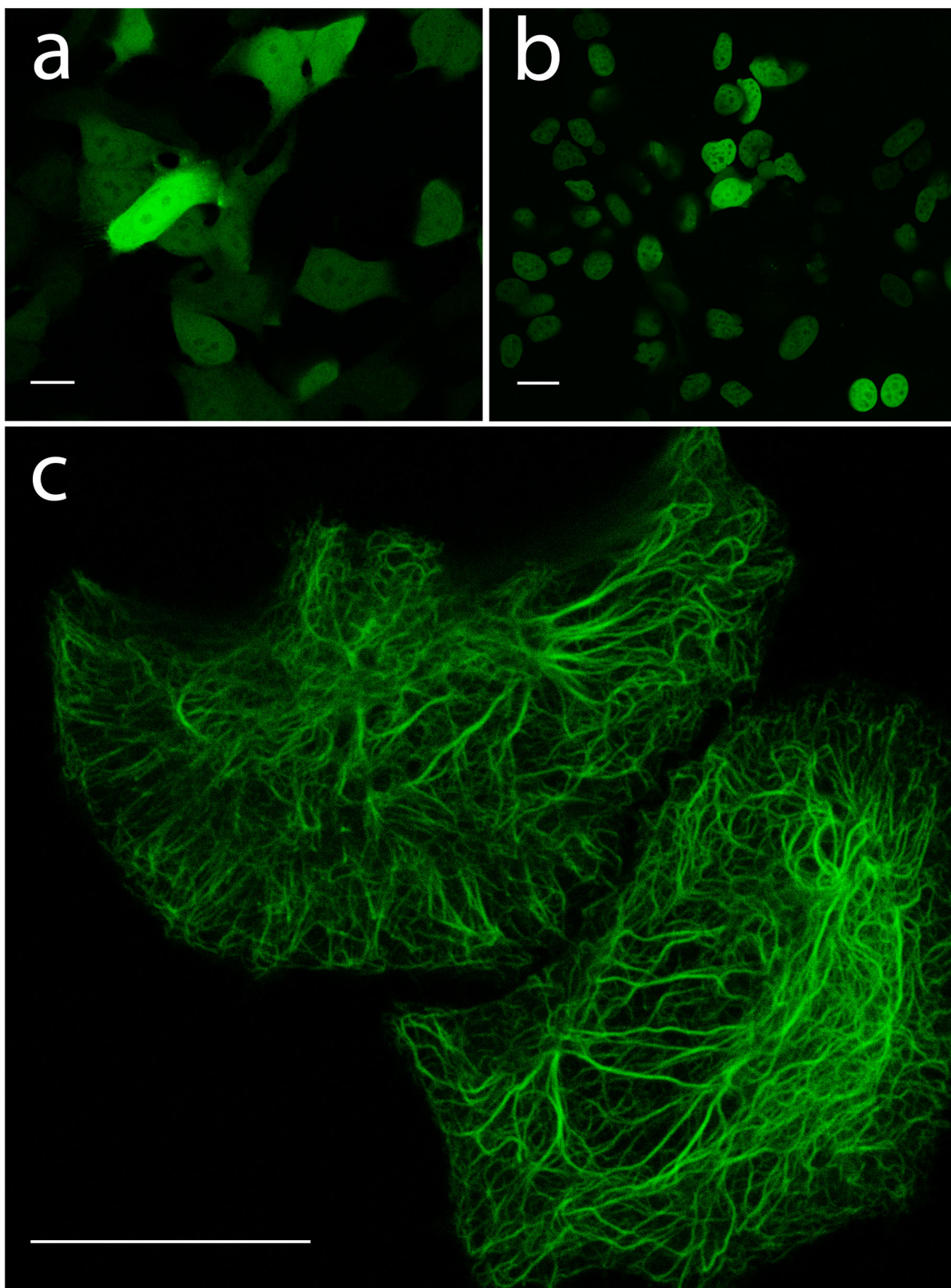


Рис. 4.20: Ближайшее микроокружение хромофора в структурах NowGFP при pH 4.8 (а) и pH 9.0 (б).



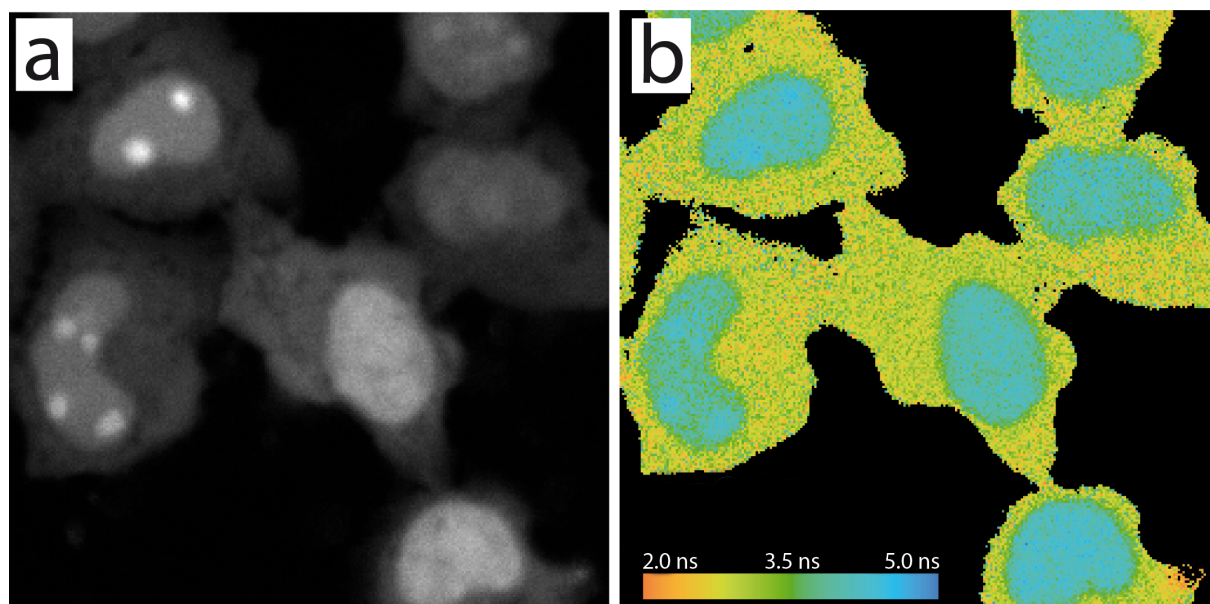


**Рис. 4.21:** Конфокальная микроскопия с использованием NowGFP в качестве метки. Изображения клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих NowGFP в цитоплазме (a), во фьюзе с гистоном H2B (b) и с цитокератином-18 (c). Белый отрезок соответствует расстоянию в 15 мкм.

## 4.7. 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 гистонем H2B и EGFP-NES<sup>13</sup> в клетках HeLa. Мы обнаружили укорочение времени жизни флуоресценции NowGFP до 4.5 нс — эффект, описанный для других флуоресцентных белков *in vivo* [125]. Несмотря на сокращение времени жизни, флуоресцентные сигналы NowGFP и EGFP разрешаются с очень высоким временным контрастом, превышающим 2 наносекунды.



**Рис. 4.22:** Разрешение сигналов EGFP и NowGFP в клетках HeLa Kyoto по времени жизни.

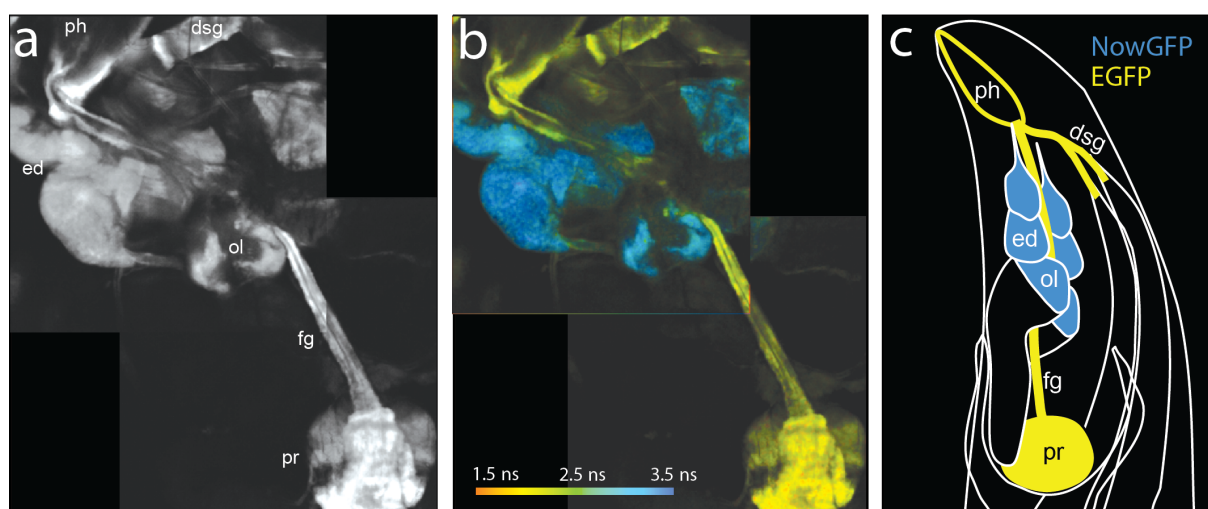
Представлены изображения клеток, коэкспрессирующих EGFP с сигналом экспорта из ядра (NES) и фьюз NowGFP с гистонем H2B. На изображении **a** цвет кодирует интенсивность флуоресценции, на изображении **b** — среднее время жизни флуоресценции.

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>14</sup> был помещен под контроль регуляторной последовательности UAS. NowGFP

<sup>13</sup>NES, Nuclear Export Signal — последовательность из 4 гидрофобных аминокислот белка, узнаваемая экспортинами и обеспечивающая транспорт белка из ядра в цитоплазму через ядерные поры.

экспрессировался в оптических долях мозга и глазных дисках. Взрослые мухи не имели нарушений развития глаз, что говорит о низкой токсичности NowGFP.

Скрещивание полученных трансгенов с трансгеном, экспрессирующим фьюз EGFP с актином-5С 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 времен жизни обоих белков из-за фиксации образцов в глицероле<sup>15</sup>.



**Рис. 4.23:** Разрешение сигналов NowGFP и EGFP в тканях трансгенной дрозофилы. EGFP и NowGFP экспрессировались в различных органах личинки дрозофилы третьей возрастной стадии.

(а) Интенсивность зеленой флуоресценции препарированных тканей. Органы отмечены следующими символами: ph — глотка, dsg — протоки слюнных желез, ed — имагинальные диски глаза, ol — зрительные доли, fg — передняя кишка, pr — преджелудок.

(б) Паттерны пространственного распределения времен жизни флуоресценции различных органов соответствуют ожидаемым.

(с) Схема расположения меченых флуоресцентными белками органов в личинке. Органы подписаны так же, как и в изображении (а).

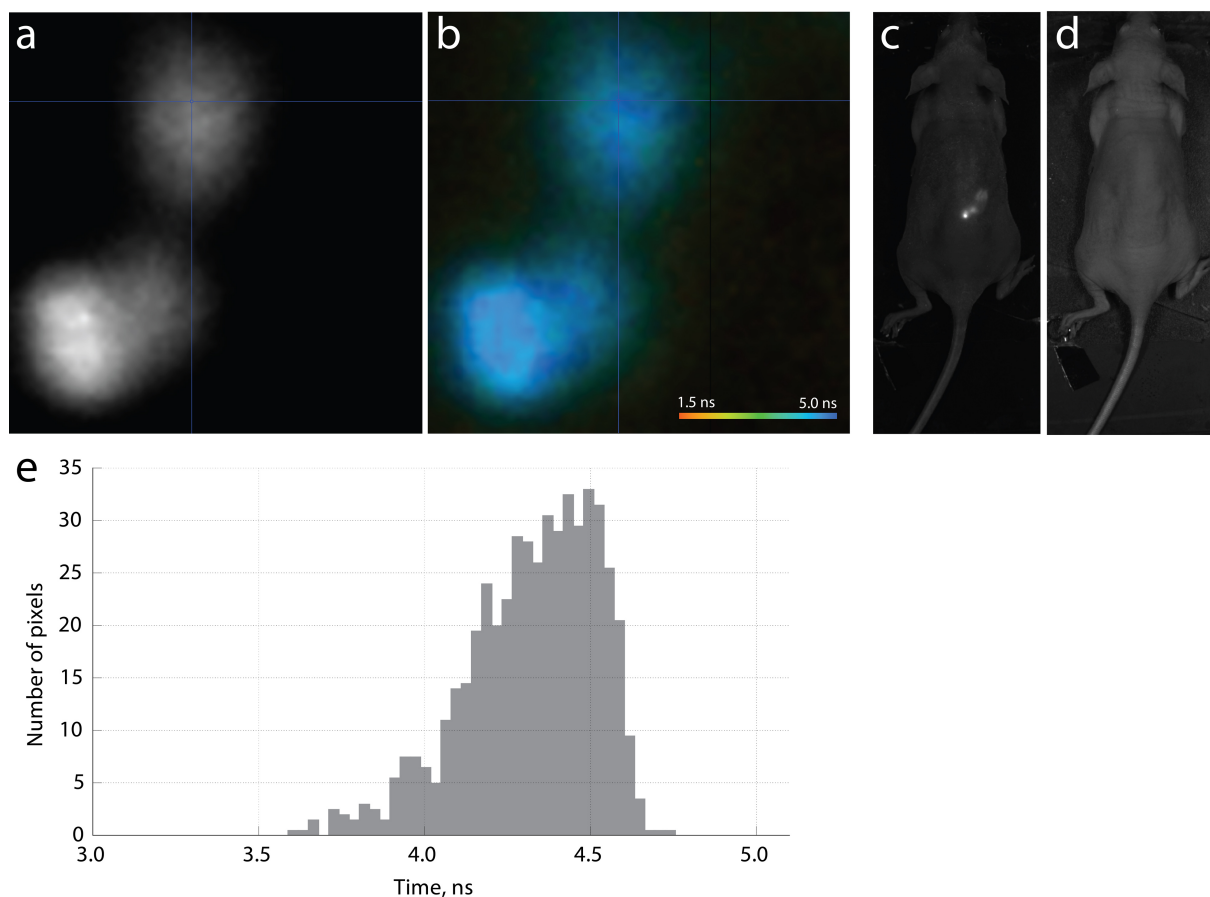
Мы также проверили возможность визуализации NowGFP в теплокровных организмах. Нами была создана стабильная линия клеток HeLa, экспрессирующая NowGFP в цитоплазме. Мы использовали клетки этой линии для заражения голых мышей и снимали выросшие опухоли с помощью FLIM-микроскопии. Флуоресценция NowGFP легко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

<sup>14</sup>NLS, Nuclear Localisation Signal — последовательность из нескольких положительно заряженных аминокислот, экспонируемых на поверхности белка, узнаваемая импортинами и обеспечивающая транспорт белка в ядро.

<sup>15</sup>Время жизни флуоресценции обратно зависит от локального показателя преломления: чем больше показатель преломления, тем короче регистрируемое время жизни флуорофора. Подробнее см., например, [126].



Отметим, что время жизни EGFP в похожих моделях составляет 2.8 нс.



**Рис. 4.24:** Микроскопия времени жизни флуоресценции опухолей, экспрессирующих NowGFP в голой мыши. Показаны изображения интенсивности флуоресценции опухоли (a), среднего времени жизни флуоресценции опухоли (b), а также флуоресцентная фотографии (c) мыши и фотографии мыши в проходящем свете (d). На графике (e) показано распределение среднего времени жизни флуоресценции в изображении (b).

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.

#### 4.8. 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 отсутствие 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 [127]. 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.

## 5. Заключение

Флуоресцентные белки WasCFP и NowGFP опубликованы нами в работах [128, 129], кристаллическая структура NowGFP — в работе [124], а сенсоры на основе NowGFP — в работе [127]. 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 ионизируемого участка и подвижностью  $\beta$ -бочонка. Полученные данные являются первым свидетельством того, что переходные конформационные состояния могут контролировать оптические свойства флуоресцентных белков [130].

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.

## 6. 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.

## 7. Сокращения, научный жаргон и переводные термины

Автор диссертации разделяет мнение, что использование аббревиатур в научной литературе усложняет восприятие текста [131]. В связи с этим, в тексте диссертации без непосредственной расшифровки встречаются лишь три аббревиатуры: ПЦР (Полимеразная Цепная Реакция), GFP (Green Fluorescent Protein) и ДНК (Дезоксирибонуклеиновая кислота). В диссертации также используются стандартные обозначения аминокислот (однобуквенный и трехбуквенный коды). Их расшифровка приведена на следующей странице в таблице 7.1.

Также, поскольку этот вопрос регулярно поднимается на защитах диссертаций, автор хотел бы выразить сложившееся у него мнение об использовании переводной терминологии и научного жаргона в русскоязычной научной литературе.

Автор считает, что в условиях, когда новые научные термины возникают все быстрее и почти всегда — на английском языке, эффект от их дословного перевода на русский язык сводится лишь к удвоению количества новых слов, которую читающему необходимо выучить. Часто, также, этот перевод приводит к возникновению нехарактерных для русского языка тяжело воспринимаемых и склоняемых последовательностей из двух существительных. На вкус автора, в таких ситуациях использование устоявшихся в научном жаргоне ассимилированных английских слов облегчает восприятие текста и делает его живее.

В частности, автор считает, что вместо словосочетания «белки слияния» стоит использовать принятое в разговорном научном языке русское слово «фьюзы» или, в крайнем случае, «химерные белки», вместо слов «эндонуклеазы рестрикции» — русское слово «рестриктазы» и т.п. Автор считает, что использование слов «фолдинг», «сиквенс», «праймеры», «имаджинг», «риды» и других не делает научный текст менее конкретным и допускающим неоднозначные трактовки. Напротив, использование таких терминов делает научный язык богаче и легче для понимания.

Таблица 7.1: Однобуквенный и трехбуквенный коды аминокислот

Однобуквенный код	Название аминокислоты	Трехбуквенный код
<b>G</b>	Глицин	<b>Gly</b>
<b>P</b>	Пролин	<b>Pro</b>
<b>A</b>	Аланин	<b>Ala</b>
<b>V</b>	Валин	<b>Val</b>
<b>L</b>	Лейцин	<b>Leu</b>
<b>I</b>	Изолейцин	<b>Ile</b>
<b>M</b>	Метионин	<b>Met</b>
<b>C</b>	Цистеин	<b>Cys</b>
<b>F</b>	Фенилаланин	<b>Phe</b>
<b>Y</b>	Тирозин	<b>Tyr</b>
<b>W</b>	Триптофан	<b>Trp</b>
<b>H</b>	Гистидин	<b>His</b>
<b>K</b>	Лизин	<b>Lys</b>
<b>R</b>	Аргинин	<b>Arg</b>
<b>Q</b>	Глутамин	<b>Gln</b>
<b>N</b>	Аспарагин	<b>Asn</b>
<b>E</b>	Глутаминовая кислота	<b>Glu</b>
<b>D</b>	Аспарагиновая кислота	<b>Asp</b>
<b>S</b>	Серин	<b>Ser</b>
<b>T</b>	Треонин	<b>Thr</b>

## Литература

- [1] Thomas K Harris and George J Turner. «Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites.» In: *IUBMB Life* 53.2 (Feb. 2002), pp. 85–98. ISSN: 1521-6543. DOI: 10.1080/15216540211468. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049200>.
- [2] Daniel G Isom *et al.* «Large shifts in pKa values of lysine residues buried inside a protein.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108.13 (Mar. 2011), pp. 5260–5. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1010750108. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3069169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [3] Gail J Bartlett *et al.* «Analysis of catalytic residues in enzyme active sites.» In: *J. Mol. Biol.* 324.1 (Nov. 2002), pp. 105–21. ISSN: 0022-2836. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12421562>.
- [4] Alex Gutteridge and Janet M Thornton. «Understanding nature's catalytic toolkit.» In: *Trends Biochem. Sci.* 30.11 (Nov. 2005), pp. 622–9. ISSN: 0968-0004. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.09.006. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16214343>.
- [5] S Száraz, D Oesterhelt, and P Ormos. «pH-induced structural changes in bacteriorhodopsin studied by Fourier transform infrared spectroscopy.» In: *Biophys. J.* 67.4 (Oct. 1994), pp. 1706–12. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1016/S0006-3495(94)80644-7. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1225532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [6] A. Warshel. «Energetics of enzyme catalysis.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 75.11 (Nov. 1978), pp. 5250–5254. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.75.11.5250. URL: <http://www.pnas.org/content/75/11/5250.abstract>.
- [7] J P Abrahams *et al.* «Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria.» In: *Nature* 370.6491 (Aug. 1994), pp. 621–8. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/370621a0. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8065448>.
- [8] S Iwata *et al.* «Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*.» In: *Nature* 376.6542 (Aug. 1995), pp. 660–9. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/376660a0. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7651515>.
- [9] Youxing Jiang *et al.* «X-ray structure of a voltage-dependent K<sup>+</sup> channel.» In: *Nature* 423.6935 (May 2003), pp. 33–41. ISSN: 0028-0836. DOI: 10.1038/nature01580. URL: <http://dx.doi.org/10.1038/nature01580>.

- [10] D A Doyle *et al.* «The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity.» In: *Science* 280.5360 (Apr. 1998), pp. 69–77. ISSN: 0036-8075. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9525859>.
- [11] H Luecke, H T Richter, and J K Lanyi. «Proton transfer pathways in bacteriorhodopsin at 2.3 angstrom resolution.» In: *Science* 280.5371 (June 1998), pp. 1934–7. ISSN: 0036-8075. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9632391>.
- [12] E Pebay-Peyroula *et al.* «X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases.» In: *Science* 277.5332 (Sept. 1997), pp. 1676–81. ISSN: 0036-8075. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9287223>.
- [13] Société française de physique. *Collection de mémoires relatifs à la physique*. Collection de mémoires relatifs à la physique v. 1. Gauthier-Villars, 1884. URL: <http://books.google.ru/books?id=LBZWAAAAMAAJ>.
- [14] L P McIntosh *et al.* «The pKa of the general acid/base carboxyl group of a glycosidase cycles during catalysis: a <sup>13</sup>C-NMR study of bacillus circulans xylanase.» In: *Biochemistry* 35.31 (Aug. 1996), pp. 9958–66. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi9613234. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8756457>.
- [15] Y Oda *et al.* «Individual ionization constants of all the carboxyl groups in ribonuclease HI from Escherichia coli determined by NMR.» In: *Biochemistry* 33.17 (May 1994), pp. 5275–84. ISSN: 0006-2960. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7909691>.
- [16] Meng-Chiao Ho *et al.* «The origin of the electrostatic perturbation in acetoacetate decarboxylase.» In: *Nature* 459.7245 (May 2009), pp. 393–7. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature07938. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19458715>.
- [17] S Pinitglang *et al.* «A classical enzyme active center motif lacks catalytic competence until modulated electrostatically.» In: *Biochemistry* 36.33 (Aug. 1997), pp. 9968–82. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi9705974. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9254592>.
- [18] H J Schirra *et al.* «Structure of reduced DsbA from Escherichia coli in solution.» In: *Biochemistry* 37.18 (May 1998), pp. 6263–76. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi980136y. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9572841>.
- [19] S Sun and M D Toney. «Evidence for a two-base mechanism involving tyrosine-265 from arginine-219 mutants of alanine racemase.» In: *Biochemistry* 38.13 (Mar. 1999), pp. 4058–65. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi982924t. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10194319>.
- [20] P F Wang *et al.* «An unusually low pK(a) for Cys282 in the active site of human muscle creatine kinase.» In: *Biochemistry* 40.39 (Oct. 2001), pp. 11698–705. ISSN: 0006-2960. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11570870>.
- [21] Y Liu *et al.* «Mechanistic roles of tyrosine 149 and serine 124 in UDP-galactose 4-epimerase from Escherichia coli.» In: *Biochemistry* 36.35 (Sept. 1997), pp. 10675–84. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi970430a. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9271498>.



- [22] H Mizuguchi *et al.* «Strain is more important than electrostatic interaction in controlling the pKa of the catalytic group in aspartate aminotransferase.» In: *Biochemistry* 40.2 (Jan. 2001), pp. 353–60. ISSN: 0006-2960. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11148029>.
- [23] C S Cassidy, J Lin, and P A Frey. «A new concept for the mechanism of action of chymotrypsin: the role of the low-barrier hydrogen bond.» In: *Biochemistry* 36.15 (Apr. 1997), pp. 4576–84. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi962013o. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9109667>.
- [24] W. Cleland and M. Kreevoy. «Low-barrier hydrogen bonds and enzymic catalysis». In: *Science* (80- . ). 264.5167 (June 1994), pp. 1887–1890. ISSN: 0036-8075. DOI: 10.1126/science.8009219. URL: <http://www.sciencemag.org/content/264/5167/1887.short7>.
- [25] Perry A. Frey and W. Wallace Cleland. «Are There Strong Hydrogen Bonds in Aqueous Solutions?» In: *Bioorg. Chem.* 26.4 (Oct. 1998), pp. 175–192. ISSN: 00452068. DOI: 10.1006/bioo.1998.1097. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004520689810975>.
- [26] Sathyapriya Rajagopal and Saraswathi Vishveshwara. «Short hydrogen bonds in proteins.» In: *FEBS J.* 272.8 (Apr. 2005), pp. 1819–32. ISSN: 1742-464X. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04604.x. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15819878>.
- [27] Keisuke Saito and Hiroshi Ishikita. «Energetics of short hydrogen bonds in photoactive yellow protein.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109.1 (Jan. 2012), pp. 167–72. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1113599108. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3252934&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [28] Keisuke Saito and Hiroshi Ishikita. «Formation of an unusually short hydrogen bond in photoactive yellow protein.» In: *Biochim. Biophys. Acta* 1827.3 (Mar. 2013), pp. 387–94. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbabi.2012.11.009. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272812010845>.
- [29] Patricia J. Lodi and Jeremy R. Knowles. «Neutral imidazole is the electrophile in the reaction catalyzed by triosephosphate isomerase: structural origins and catalytic implications». In: *Biochemistry* 30.28 (July 1991), pp. 6948–6956. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi00242a020. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00242a020>.
- [30] R C Davenport *et al.* «Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway.» In: *Biochemistry* 30.24 (June 1991), pp. 5821–6. ISSN: 0006-2960. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2043623>.
- [31] P T Chivers *et al.* «Microscopic pKa values of Escherichia coli thioredoxin.» In: *Biochemistry* 36.48 (Dec. 1997), pp. 14985–91. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi970071j. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9398223>.
- [32] Z Y Zhang and J E Dixon. «Active site labeling of the Yersinia protein tyrosine phosphatase: the determination of the pKa of the active site cysteine and the function of the conserved histidine 402.» In: *Biochemistry* 32.36 (Sept. 1993), pp. 9340–5. ISSN: 0006-2960. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8369304>.

- [33] Doree Sitkoff, Kim A. Sharp, and Barry Honig. «Accurate Calculation of Hydration Free Energies Using Macroscopic Solvent Models». In: *J. Phys. Chem.* 98.7 (Feb. 1994), pp. 1978–1988. ISSN: 0022-3654. DOI: 10.1021/j100058a043. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/j100058a043>.
- [34] Daniel A Karp *et al.* «High apparent dielectric constant inside a protein reflects structural reorganization coupled to the ionization of an internal Asp.» English. In: *Biophys. J.* 92.6 (Mar. 2007), pp. 2041–53. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1529/biophysj.106.090266. URL: <http://www.cell.com/article/S000634950771010X/fulltext>.
- [35] Saul R Trevino *et al.* «Asp79 makes a large, unfavorable contribution to the stability of RNase Sa.» In: *J. Mol. Biol.* 354.4 (Dec. 2005), pp. 967–78. ISSN: 0022-2836. DOI: 10.1016/j.jmb.2005.09.091. URL: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283605012064>.
- [36] Michael J Harms *et al.* «A buried lysine that titrates with a normal pKa: role of conformational flexibility at the protein-water interface as a determinant of pKa values.» In: *Protein Sci.* 17.5 (May 2008), pp. 833–45. ISSN: 1469-896X. DOI: 10.1110/ps.073397708. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2327280&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [37] B Lee and F M Richards. «The interpretation of protein structures: estimation of static accessibility.» In: *J. Mol. Biol.* 55.3 (Feb. 1971), pp. 379–400. ISSN: 0022-2836. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5551392>.
- [38] Jeffrey Bush and George I Makhatadze. «Statistical analysis of protein structures suggests that buried ionizable residues in proteins are hydrogen bonded or form salt bridges.» In: *Proteins* 79.7 (July 2011), pp. 2027–32. ISSN: 1097-0134. DOI: 10.1002/prot.23067. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21560169>.
- [39] W. Clark Still *et al.* «Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics». In: *J. Am. Chem. Soc.* 112.16 (Aug. 1990), pp. 6127–6129. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja00172a038. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/ja00172a038>.
- [40] Q Zhao *et al.* «NMR evidence for the participation of a low-barrier hydrogen bond in the mechanism of delta 5-3-ketosteroid isomerase.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93.16 (Aug. 1996), pp. 8220–4. ISSN: 0027-8424. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=38650&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [41] R M Czerwinski *et al.* «The structural basis for the perturbed pKa of the catalytic base in 4-oxalocrotonate tautomerase: kinetic and structural effects of mutations of Phe-50.» In: *Biochemistry* 40.7 (Feb. 2001), pp. 1984–95. ISSN: 0006-2960. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11329265>.
- [42] C F Barbas *et al.* «Immune versus natural selection: antibody aldolases with enzymic rates but broader scope.» In: *Science* 278.5346 (Dec. 1997), pp. 2085–92. ISSN: 0036-8075. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9405338>.

- [43] Lynell C Martinez *et al.* «Subdomains in the F and G helices of bacteriorhodopsin regulate the conformational transitions of the reprotonation mechanism.» In: *Proteins* 48.2 (Aug. 2002), pp. 269–82. ISSN: 1097-0134. DOI: 10.1002/prot.10158. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112695>.
- [44] S Druckmann *et al.* «Acid-base equilibrium of the Schiff base in bacteriorhodopsin.» In: *Biochemistry* 21.20 (Sept. 1982), pp. 4953–9. ISSN: 0006-2960. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7138840>.
- [45] L S Brown and J K Lanyi. «Determination of the transiently lowered pKa of the retinal Schiff base during the photocycle of bacteriorhodopsin.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93.4 (Feb. 1996), pp. 1731–4. ISSN: 0027-8424. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=40011&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [46] Carolyn A Fitch *et al.* «Experimental pK(a) values of buried residues: analysis with continuum methods and role of water penetration.» In: *Biophys. J.* 82.6 (June 2002), pp. 3289–304. ISSN: 0006-3495. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1302117&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [47] Daniel G Isom *et al.* «Charges in the hydrophobic interior of proteins.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107.37 (Sept. 2010), pp. 16096–100. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1004213107. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2941338&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [48] Sheh-Yi Sheu *et al.* «Energetics of hydrogen bonds in peptides.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100.22 (Oct. 2003), pp. 12683–7. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.2133366100. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=240678&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [49] Michael J Harms *et al.* «Arginine residues at internal positions in a protein are always charged.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108.47 (Nov. 2011), pp. 18954–9. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.1104808108. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3223443&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [50] María Isabel Niemeyer *et al.* «Neutralization of a single arginine residue gates open a two-pore domain, alkali-activated K<sup>+</sup> channel.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104.2 (Jan. 2007), pp. 666–71. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0606173104. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1766441&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [51] Gisela D Cymes, Ying Ni, and Claudio Grosman. «Probing ion-channel pores one proton at a time.» In: *Nature* 438.7070 (Dec. 2005), pp. 975–80. ISSN: 1476-4687. DOI: 10.1038/nature04293. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1384014&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [52] P. Raja Rathnam silpa, Ramesh Dhani, A. Avinash, S. K. Salenaagina, M. V. Saicharan Teja, P. Masthanaiah and V.Chandana. *Indole: The molecule of diverse pharmacological activities*. URL: <http://jocpr.com/vol3-iss5-2011/JCPR-2011-3-5-519-523.pdf> (visited on 07/11/2015).

- [53] Frederick G. Bordwell, George E. Drucker, and Herbert E. Fried. «Acidities of carbon and nitrogen acids: the aromaticity of the cyclopentadienyl anion». In: *J. Org. Chem.* 46.3 (Jan. 1981), pp. 632–635. ISSN: 0022-3263. DOI: 10.1021/jo00316a032. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/jo00316a032>.
- [54] Walter F. Boron and Emile L. Boulpaep. *Medical physiology: a cellular and molecular approach*. 2nd ed., I. Philadelphia, PA : Saunders/Elsevier, 2009. ISBN: 9780808923602. URL: <http://books.google.com/books?id=HLMJRW08ihgC&printsec=frontcover>.
- [55] Jaime Santo-Domingo and Nicolas Demaurex. «Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the renaissance of mitochondrial pH.» In: *J. Gen. Physiol.* 139.6 (June 2012), pp. 415–23. ISSN: 1540-7748. DOI: 10.1085/jgp.201110767. URL: <http://jgp.rupress.org/content/139/6/415.full>.
- [56] Anna Maria Porcelli *et al.* «pH difference across the outer mitochondrial membrane measured with a green fluorescent protein mutant». In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326.4 (Jan. 2005), pp. 799–804. ISSN: 0006291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.105. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15607740>.
- [57] Joseph R. Lakowicz. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 2006, pp. 1–954. ISBN: 0387312781. DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4.
- [58] Dennis A Dougherty. «The cation- $\pi$  interaction.» In: *Acc. Chem. Res.* 46.4 (Apr. 2013), pp. 885–93. ISSN: 1520-4898. DOI: 10.1021/ar300265y. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3957424&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [59] J P Gallivan and D A Dougherty. «Cation- $\pi$  interactions in structural biology.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96.17 (Aug. 1999), pp. 9459–64. ISSN: 0027-8424. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=22230&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [60] M J Davies and R J Truscott. «Photo-oxidation of proteins and its role in cataractogenesis.» In: *J. Photochem. Photobiol. B.* 63.1-3 (Oct. 2001), pp. 114–25. ISSN: 1011-1344. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684458>.
- [61] P S Sherin *et al.* «Competition between ultrafast relaxation and photoionization in excited prefluorescent states of tryptophan and indole.» In: *J. Chem. Phys.* 125.14 (Oct. 2006), p. 144511. ISSN: 0021-9606. DOI: 10.1063/1.2348868. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17042613>.
- [62] K. Aflatooni *et al.* «Temporary anion states of selected amino acids». In: *J. Chem. Phys.* 115.14 (Oct. 2001), p. 6489. ISSN: 00219606. DOI: 10.1063/1.1404147. URL: <http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jcp/115/14/10.1063/1.1404147>.
- [63] O Shimomura, F H Johnson, and Y Saiga. «Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*.» In: *J. Cell. Comp. Physiol.* 59 (June 1962), pp. 223–39. ISSN: 0095-9898. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13911999>.
- [64] D C Prasher *et al.* «Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein.» In: *Gene* 111.2 (Mar. 1992), pp. 229–33. ISSN: 0378-1119. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1347277>.

- [65] M Chalfie *et al.* «Green fluorescent protein as a marker for gene expression.» In: *Science* 263.5148 (Feb. 1994), pp. 802–5. ISSN: 0036-8075. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8303295>.
- [66] S Inouye and F I Tsuji. «Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein.» In: *FEBS Lett.* 341.2-3 (Mar. 1994), pp. 277–80. ISSN: 0014-5793. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8137953>.
- [67] F Yang, L G Moss, and G N Phillips. «The molecular structure of green fluorescent protein.» In: *Nat. Biotechnol.* 14.10 (Oct. 1996), pp. 1246–51. ISSN: 1087-0156. DOI: 10.1038/nbt1096-1246. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9631087>.
- [68] M Ormö *et al.* «Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein.» In: *Science* 273.5280 (Sept. 1996), pp. 1392–5. ISSN: 0036-8075. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8703075>.
- [69] R Heim, D C Prasher, and R Y Tsien. «Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91.26 (Dec. 1994), pp. 12501–4. ISSN: 0027-8424. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=45466&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [70] R Y Tsien. «The green fluorescent protein.» In: *Annu. Rev. Biochem.* 67 (Jan. 1998), pp. 509–44. ISSN: 0066-4154. DOI: 10.1146/annurev.biochem.67.1.509. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759496>.
- [71] M V Matz *et al.* «Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species.» In: *Nat. Biotechnol.* 17.10 (Oct. 1999), pp. 969–73. ISSN: 1087-0156. DOI: 10.1038/13657. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10504696>.
- [72] Dmitriy M Chudakov *et al.* «Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues.» In: *Physiol. Rev.* 90.3 (July 2010), pp. 1103–63. ISSN: 1522-1210. DOI: 10.1152/physrev.00038.2009. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664080>.
- [73] Jie-rong Huang *et al.* «Stable intermediate states and high energy barriers in the unfolding of GFP.» In: *J. Mol. Biol.* 370.2 (July 2007), pp. 356–71. ISSN: 0022-2836. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.04.039. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512539>.
- [74] Benjamin T Andrews *et al.* «The dual-basin landscape in GFP folding.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105.34 (Aug. 2008), pp. 12283–8. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.0804039105. URL: <http://www.pnas.org/content/105/34/12283.abstract>.
- [75] Angel Orte *et al.* «Evidence of an intermediate and parallel pathways in protein unfolding from single-molecule fluorescence.» In: *J. Am. Chem. Soc.* 130.25 (June 2008), pp. 7898–907. ISSN: 1520-5126. DOI: 10.1021/ja709973m. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18507381>.
- [76] Benjamin T Andrews *et al.* «The rough energy landscape of superfolder GFP is linked to the chromophore.» In: *J. Mol. Biol.* 373.2 (Oct. 2007), pp. 476–90. ISSN: 0022-2836. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.07.071. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2695656&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- [77] Sawako Enoki *et al.* «Acid denaturation and refolding of green fluorescent protein.» In: *Biochemistry* 43.44 (Nov. 2004), pp. 14238–48. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi048733+. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15518574>.
- [78] Sawako Enoki *et al.* «The equilibrium unfolding intermediate observed at pH 4 and its relationship with the kinetic folding intermediates in green fluorescent protein.» In: *J. Mol. Biol.* 361.5 (Sept. 2006), pp. 969–82. ISSN: 0022-2836. DOI: 10.1016/j.jmb.2006.07.009. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16889795>.
- [79] Hendrik Dietz and Matthias Rief. «Exploring the energy landscape of GFP by single-molecule mechanical experiments.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101.46 (Nov. 2004), pp. 16192–7. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.0404549101. URL: <http://www.pnas.org/content/101/46/16192.abstract>.
- [80] Moritz Mickler *et al.* «Revealing the bifurcation in the unfolding pathways of GFP by using single-molecule experiments and simulations.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104.51 (Dec. 2007), pp. 20268–73. ISSN: 1091-6490. DOI: 10.1073/pnas.0705458104. URL: <http://www.pnas.org/content/104/51/20268>.
- [81] Changbong Hyeon, Ruxandra I Dima, and D Thirumalai. «Pathways and kinetic barriers in mechanical unfolding and refolding of RNA and proteins.» English. In: *Structure* 14.11 (Nov. 2006), pp. 1633–45. ISSN: 0969-2126. DOI: 10.1016/j.str.2006.09.002. URL: <http://www.cell.com/article/S0969212606003881/fulltext>.
- [82] Tatiana N Melnik *et al.* «Sequential melting of two hydrophobic clusters within the green fluorescent protein GFP-cycle3.» In: *Biochemistry* 50.36 (Sept. 2011), pp. 7735–44. ISSN: 1520-4995. DOI: 10.1021/bi2006674. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21823681>.
- [83] Morten Bertz, Andrea Kunfermann, and Matthias Rief. «Navigating the folding energy landscape of green fluorescent protein.» In: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47.43 (Jan. 2008), pp. 8192–5. ISSN: 1521-3773. DOI: 10.1002/anie.200802987. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18785668>.
- [84] G. Reddy, Z. Liu, and D. Thirumalai. *Denaturant-dependent folding of GFP.* 2012. DOI: 10.1073/pnas.1201808109.
- [85] M Karplus and D L Weaver. «Protein folding dynamics: the diffusion-collision model and experimental data». In: *Protein Sci.* 3 (1994), pp. 650–668. ISSN: 0961-8368. DOI: 10.1002/pro.5560030413.
- [86] Jan Kubelka, James Hofrichter, and William A Eaton. «The protein folding 'speed limit'». In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14.1 (Feb. 2004), pp. 76–88. ISSN: 0959-440X. DOI: 10.1016/j.sbi.2004.01.013. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15102453>.
- [87] Wayne J-H Ong *et al.* «Function and structure of GFP-like proteins in the protein data bank». In: *Mol. Biosyst.* 7 (2011), pp. 984–992. ISSN: 1742-206X. DOI: 10.1039/c1mb05012e.
- [88] Matthew H. Marc Zimmer *et al.* «Structural consequences of chromophore formation and exploration of conserved lid residues amongst naturally occurring fluorescent proteins». In: *Chem. Phys.* 429 (2014), pp. 5–11. ISSN: 03010104. DOI: 10.1016/j.chemphys.2013.11.015.

- [89] Nathan P. Lemay *et al.* «The role of the tight-turn, broken hydrogen bonding, Glu222 and Arg96 in the post-translational green fluorescent protein chromophore formation». In: *Chem. Phys.* 348 (2008), pp. 152–160. ISSN: 03010104. DOI: 10.1016/j.chemphys.2008.02.055.
- [90] Jennifer A. Sniegowski, Marlene E. Phail, and Rebekka M. Wachter. «Maturation efficiency, trypsin sensitivity, and optical properties of Arg96, Glu222, and Gly67 variants of green fluorescent protein». In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332 (2005), pp. 657–663. ISSN: 0006291X. DOI: 10.1016/j.bbrc.2005.04.166.
- [91] Nadya G Gurskaya *et al.* «A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants.» In: *Biochem. J.* 373.Pt 2 (July 2003), pp. 403–8. ISSN: 0264-6021. DOI: 10.1042/BJ20021966. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1223499&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [92] Nadya V Pletneva *et al.* «Structural evidence for a dehydrated intermediate in green fluorescent protein chromophore biosynthesis.» In: *J. Biol. Chem.* 285.21 (May 2010), pp. 15978–84. ISSN: 1083-351X. DOI: 10.1074/jbc.M109.092320. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2871466&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [93] L A Gross *et al.* «The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral.» In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97.22 (Oct. 2000), pp. 11990–5. ISSN: 0027-8424. DOI: 10.1073/pnas.97.22.11990. URL: <http://www.pnas.org/content/97/22/11990.abstract>.
- [94] Hideaki Mizuno *et al.* «Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein.» In: *Mol. Cell* 12.4 (Oct. 2003), pp. 1051–8. ISSN: 1097-2765. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580354>.
- [95] S James Remington *et al.* «zFP538, a yellow-fluorescent protein from *Zoanthus*, contains a novel three-ring chromophore.» In: *Biochemistry* 44.1 (Jan. 2005), pp. 202–12. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi048383r. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15628861>.
- [96] N V Pletneva *et al.* «[Three-dimensional structure of yellow fluorescent protein zYFP538 from *Zoanthus* sp. at the resolution 1.8 angstrom].» In: *Bioorg. Khim.* 33.4 (2007), pp. 421–30. ISSN: 0132-3423. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17886433>.
- [97] Satoshi Karasawa *et al.* «Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer.» In: *Biochem. J.* 381.Pt 1 (July 2004), pp. 307–12. ISSN: 1470-8728. DOI: 10.1042/BJ20040321. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1133789&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [98] Michael L Quillin *et al.* «Kindling fluorescent protein from *Anemonia sulcata*: dark-state structure at 1.38 Å resolution.» In: *Biochemistry* 44.15 (Apr. 2005), pp. 5774–87. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi047644u. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15823036>.
- [99] Yulia A Tretyakova, Alexey A Pakhomov, and Vladimir I Martynov. «Chromophore structure of the kindling fluorescent protein asFP595 from *Anemonia sulcata*.» In: *J. Am. Chem. Soc.* 129.25 (June 2007), pp. 7748–9. ISSN: 0002-7863. DOI: 10.1021/ja071992c. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/ja071992c>.

- [100] Ilia V Yampolsky *et al.* «Synthesis and properties of the chromophore of the asFP595 chromoprotein from *Anemonia sulcata*.» In: *Biochemistry* 44.15 (Apr. 2005), pp. 5788–93. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi0476432. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15823037>.
- [101] Alexey M Bogdanov *et al.* «Green fluorescent proteins are light-induced electron donors.» In: *Nat. Chem. Biol.* 5.7 (July 2009), pp. 459–61. ISSN: 1552-4469. DOI: 10.1038/nchembio.174. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2784199&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [102] Nathan C Shaner *et al.* «Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein.» In: *Nat. Biotechnol.* 22.12 (Dec. 2004), pp. 1567–72. ISSN: 1087-0156. DOI: 10.1038/nbt1037. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15558047>.
- [103] Hui Wang Ai *et al.* «Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins.» In: *Biochemistry* 46 (2007), pp. 5904–5910. ISSN: 00062960. DOI: 10.1021/bi700199g.
- [104] Dmitry A Shagin *et al.* «GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity.» In: *Mol. Biol. Evol.* 21.5 (May 2004), pp. 841–50. ISSN: 0737-4038. DOI: 10.1093/molbev/msh079. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14963095>.
- [105] A Sawano and A Miyawaki. «Directed evolution of green fluorescent protein by a new versatile PCR strategy for site-directed and semi-random mutagenesis.» In: *Nucleic Acids Res.* 28.16 (Aug. 2000), E78. ISSN: 1362-4962. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=108465&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [106] Brett L Mellor *et al.* «Method for estimating the internal permittivity of proteins using dielectric spectroscopy.» In: *J. Phys. Chem. B* 115.10 (Mar. 2011), pp. 2205–13. ISSN: 1520-5207. DOI: 10.1021/jp1111873. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21344910>.
- [107] B P Cormack, R H Valdivia, and S Falkow. «FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).» In: *Gene* 173.1 Spec No (Jan. 1996), pp. 33–8. ISSN: 0378-1119. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8707053>.
- [108] Barbara Campanini *et al.* «Role of histidine 148 in stability and dynamics of a highly fluorescent GFP variant.» In: *Biochim. Biophys. Acta* 1834.4 (Apr. 2013), pp. 770–9. ISSN: 0006-3002. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.01.014. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357652>.
- [109] Alexander S Mishin *et al.* «The first mutant of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein that forms a red chromophore.» In: *Biochemistry* 47.16 (Apr. 2008), pp. 4666–73. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi702130s. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2900791&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [110] J P Vartanian, M Henry, and S Wain-Hobson. «Hypermutagenic PCR involving all four transitions and a sizeable proportion of transversions.» In: *Nucleic Acids Res.* 24.14 (July 1996), pp. 2627–31. ISSN: 0305-1048. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=145995&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.



- [111] R Higuchi, B Krummel, and R K Saiki. «A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions.» In: *Nucleic Acids Res.* 16.15 (Aug. 1988), pp. 7351–67. ISSN: 0305-1048. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=338413&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [112] Akira Matsumoto and Taichi Q Itoh. «Self-assembly cloning: a rapid construction method for recombinant molecules from multiple fragments.» In: *Biotechniques* 51.1 (July 2011), pp. 55–6. ISSN: 1940-9818. DOI: 10.2144/000113705. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21781054>.
- [113] Konstantin Okonechnikov, Olga Golosova, and Mikhail Fursov. «Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit.» In: *Bioinformatics* 28.8 (Apr. 2012), pp. 1166–7. ISSN: 1367-4811. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22368248>.
- [114] Mickaël Lelimosin *et al.* «Intrinsic dynamics in ECFP and Cerulean control fluorescence quantum yield.» In: *Biochemistry* 48.42 (Oct. 2009), pp. 10038–46. ISSN: 1520-4995. DOI: 10.1021/bi901093w. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19754158>.
- [115] LLC Schrodinger. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3r1*. 2010.
- [116] Gabrielle D Malo *et al.* «X-ray structure of Cerulean GFP: a tryptophan-based chromophore useful for fluorescence lifetime imaging.» In: *Biochemistry* 46.35 (Sept. 2007), pp. 9865–73. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi602664c. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17685554>.
- [117] David von Stetten *et al.* «Alteration of fluorescent protein spectroscopic properties upon cryoprotection.» In: *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 68.Pt 11 (Nov. 2012), pp. 1578–83. ISSN: 1399-0047. DOI: 10.1107/S0907444912037900. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23090407>.
- [118] Jennifer L Watkins *et al.* «The 1.6 Å resolution structure of a FRET-optimized Cerulean fluorescent protein.» In: *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69.Pt 5 (May 2013), pp. 767–73. ISSN: 1399-0047. DOI: 10.1107/S0907444913001546. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3640468&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [119] Mark A Rizzo *et al.* «An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET.» In: *Nat. Biotechnol.* 22.4 (Apr. 2004), pp. 445–9. ISSN: 1087-0156. DOI: 10.1038/nbt945. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14990965>.
- [120] William W Ward. «Biochemical and physical properties of green fluorescent protein.» In: *Methods Biochem. Anal.* 47 (Jan. 2006), pp. 39–65. ISSN: 0076-6941. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16335709>.
- [121] Vladislav V Verkhusha *et al.* «High stability of Discosoma DsRed as compared to Aequorea EGFP.» In: *Biochemistry* 42.26 (July 2003), pp. 7879–84. ISSN: 0006-2960. DOI: 10.1021/bi034555t. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12834339>.
- [122] Ai Shinobu *et al.* «Visualizing proton antenna in a high-resolution green fluorescent protein structure.» In: *J. Am. Chem. Soc.* 132.32 (Aug. 2010), pp. 11093–102. ISSN: 1520-5126. DOI: 10.1021/ja1010652. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20698675>.

- [123] M Drobizhev *et al.* «Describing two-photon absorptivity of fluorescent proteins with a new vibronic coupling mechanism.» In: *J. Phys. Chem. B* 116.5 (Feb. 2012), pp. 1736–44. ISSN: 1520-5207. DOI: 10.1021/jp211020k. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/jp211020k>.
- [124] Vladimir Z Pletnev *et al.* «Structure of the green fluorescent protein NowGFP with an anionic tryptophan-based chromophore.» In: *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 71.Pt 8 (Aug. 2015), pp. 1699–707. ISSN: 1399-0047. DOI: 10.1107/S1399004715010159. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26249350>.
- [125] Klaus Suhling, Paul M W French, and David Phillips. «Time-resolved fluorescence microscopy.» In: *Photochem. Photobiol. Sci.* 4.1 (Jan. 2005), pp. 13–22. ISSN: 1474-905X. DOI: 10.1039/b412924p. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15616687>.
- [126] Klaus Suhling *et al.* «Imaging the environment of green fluorescent protein.» In: *Biophys. J.* 83.6 (Dec. 2002), pp. 3589–95. ISSN: 0006-3495. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)75359-9. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1302434&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [127] Bobin George Abraham *et al.* «Fluorescent Protein Based FRET Pairs with Improved Dynamic Range for Fluorescence Lifetime Measurements.» In: *PLoS One* 10.8 (Jan. 2015), e0134436. ISSN: 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0134436. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4523203&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [128] Karen S Sarkisyan *et al.* «Tryptophan-based chromophore in fluorescent proteins can be anionic.» In: *Sci. Rep.* 2 (Jan. 2012), p. 608. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/srep00608. URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3429880&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- [129] Karen S Sarkisyan *et al.* «Green Fluorescent Protein with Anionic Tryptophan-Based Chromophore and Long Fluorescence Lifetime.» In: *Biophys. J.* 109.2 (July 2015), pp. 380–9. ISSN: 1542-0086. DOI: 10.1016/j.bpj.2015.06.018. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26200874>.
- [130] Elena N Laricheva *et al.* «pH-dependent Transient Conformational States Control Optical Properties of Cyan Fluorescent Protein.» In: *J. Am. Chem. Soc.* (Feb. 2015). ISSN: 1520-5126. DOI: 10.1021/ja509233r. URL: <http://dx.doi.org/10.1021/ja509233r>.
- [131] S Nielsen. «The Effect of Lexicographical Information Costs on Dictionary Making». en. In: *Lexikos* 18.1 (Oct. 2008). ISSN: 1684-4904. DOI: 10.4314/lex.v18i1.47251. URL: <http://www.ajol.info/index.php/lex/article/view/47251>.