

На правах рукописи

Мамонтова Анастасия Вячеславовна

**Увеличение фотостабильности зеленых
флуоресцентных белков в живой клетке путем
блокирования фотоиндуцированного переноса
электрона**

специальность 03.01.03 (молекулярная биология)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2019

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

Научный руководитель:

Богданов Алексей Михайлович, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Шеваль Евгений Валерьевич, доктор биологических наук, старший научный сотрудник Отдела электронной микроскопии НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Никитин Евгений Сергеевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной нейробиологии обучения Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

Ведущая организация:

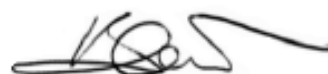
Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Защита диссертации состоится 20 февраля 2019 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

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

Автореферат разослан ____ _____ 20____ года

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



1. Общая характеристика работы

1.1. Актуальность темы исследования

В 1994 г. впервые была продемонстрирована возможность использования зеленого флуоресцентного белка (GFP) из медузы *Aequorea victoria* в качестве генетически кодируемой метки *in vivo* (M. Chalfie et al., *Science*, 1994). Этот эксперимент вызвал бурный рост как в области исследования самих флуоресцентных белков, так и их применения в биологической и медицинской науке. Низкая токсичность, возможность адресного мечения внутри живой клетки, относительная простота использования и направленного изменения свойств флуоресцентных белков методами генной инженерии позволили получить универсальный инструмент визуализации биологических процессов не только *in vitro* и *in cellulo*, но и *in vivo*.

Одной из ключевых характеристик флуоресцентных белков является фотостабильность, то есть способность молекулы многократно излучать кванты света при непрерывном возбуждении флуоресценции. Фотостабильность тесно связана с явлением фотообесцвечивания (photobleaching), т.е. выцветанием метки под действием возбуждающего света, затрудняющим изучение объекта в динамике в течение долгого времени. Так как флуоресцентные белки являются востребованными инструментами для изучения физиологии и биохимии клеток (в том числе, пригодными для длительных экспериментов), поиск способов увеличения их фотостабильности без нарушения физиологических условий исследования представляет собой важную практическую задачу.

1.2. Степень разработанности области исследования

Диссертационный проект посвящен изучению механизмов фотообесцвечивания зеленых флуоресцентных белков и разработке подходов к увеличению их фотостабильности.

Механизмы фотообесцвечивания флуоресцентных белков, в отличие от малых органических флуорофоров, изучены достаточно слабо. В общем можно сказать, что фотообесцвечивание есть следствие обратимого или необратимого нарушения структуры хромофора при его облучении. Среди светоиндуцированных процессов, вносящих свой вклад в фотообесцвечивание, можно упомянуть: *цис-транс*-изомеризацию хромофора, окисление окружающих хромофор аминокислот, опосредованное кислородом образование триплетных состояний хромофора, фотовосстановление, окислительную фотоконверсию.

В литературе описаны различные подходы к увеличению фотостабильности флуоресцентных белков, основанные на подавлении светоиндуцированных процессов в их молекулах: изменение состава растворителя (R.J. Florijin et al., *Cytometry*, 1995, G. Vock et al., *J.Fluoresc.*, 1993, K.D. Krenik et al., *J.Immunol. Methods*, 1989), способствующее снижению эффективности фотообесцвечивания, а также замена ключевых аминокислотных остатков, вовлечённых в фотоокисление (H. W. Ai et al., *Biochemistry*, 2007, M. A. Mena et al., *Nat. Biotechnol.*, 2006) и *цис-транс*-изомеризацию хромофора (T. B. McAnaney et al., *Biochemistry*, 2005), и другие реакции, следствием которых является нарушение способности флуорофора испускать свет.

1.3. Цели и задачи

Целью данной работы является увеличение фотостабильности зеленых флуоресцентных белков путем направленного блокирования светоиндуцируемого переноса электрона.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Оптимизировать применение рутин как агента, повышающего фотостабильность EGFP, с точки зрения его химической стабильности и рабочей концентрации.
- 2) Сравнить эффективность применения рутин при флуоресцентной визуализации в популярных клеточных средах (DMEM, Ham's F12, RPMI1640) и проверить его влияние на фотостабильность таких популярных зеленых флуоресцентных белков, как copGreen, copGreen2, TagGFP2, Emerald, mEmerald.
- 3) Изучить причины высокой вариабельности результатов измерения фотостабильности в похожих экспериментальных условиях, в частности, вклад условий культивирования живых клеток.
- 4) Предложить модельные механизмы первичного процесса переноса электрона с возбуждённого хромофора EGFP, выявить потенциально важные аминокислотные остатки, связанные с этим процессом, и методом сайт-направленного мутагенеза провести экспериментальную проверку ключевых аминокислотных остатков на предмет их влияния на кинетику фотообесцвечивания EGFP.
- 5) Провести комплексный анализ внесённых мутаций и их комбинаций на ключевые характеристики полученных белков (фотостабильность, яркость и время жизни флуоресценции).

1.4. Теоретическая и практическая значимость работы

Сложность строения белковой молекулы и изолированность хромофорной группировки от внешней среды затрудняет анализ фотофизических и фотохимических процессов во флуоресцентных белках. Так, сравнительно мало известно о механизмах фотодеструкции их хромофоров и структурных детерминантах фотостабильности данного класса меток. Изучение различных аспектов физико-химии возбуждённого состояния GFP представляет несомненный теоретический интерес.

В то же время понимание закономерностей протекания фотохимических процессов с участием хромофора флуоресцентных белков может служить надёжной основой для разработки подходов к направленному совершенствованию их практических характеристик. Так, в данной работе предложены методы блокирования светозависимого транспорта электрона в EGFP, позволившие добиться существенного увеличения фотостабильности этого востребованного флуоресцентного маркера.

1.5. Положения, выносимые на защиту

- 1) Рутин остается стабильным в DMSO при комнатной температуре, для сохранения активности при хранении в водном растворе рутин требует заморозки (до -20°C и ниже).
- 2) Рутин, увеличивающий фотостабильность EGFP в среде DMEM, не влияет на другие флуоресцентные белки и неэффективен в среде F12.

- 3) Повышенная фотостабильность EGFP в среде F12 по сравнению со средой DMEM определяется наличием в ее составе таких веществ, как FeSO₄, B12, тимидин, гипоксантин и липоевая кислота.
- 4) Ряд внешних факторов, таких как плотность роста клеток и концентрация сыворотки, оказывают существенное влияние на фотостабильность EGFP.
- 5) Некоторые аминокислотные остатки в белке EGFP (Thr65, Tyr145, Phe165) предположительно участвуют в светозависимом переносе электрона, и замена этих остатков приводит к повышению фотостабильности этого маркера.
- 6) Комбинирование замен по трем ключевым положениям (Thr65, Tyr145, Phe165) обеспечивает дополнительный прирост фотостабильности EGFP.
- 7) Короткое время жизни флуоресценции мутанта T65G/Y145M/F165Y обеспечивает возможность его одновременной FLIM-визуализации с другими зелеными флуоресцентными белками, обладающими большими временами жизни флуоресценции.

1.6. Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 101 странице и состоит из введения, обзора литературы, целей и задач, материалов и методов, описания полученных результатов и их обсуждения, выводов, приложений и списка цитируемой литературы, включающего 94 ссылки. Диссертация содержит 37 рисунков и 5 таблиц.

1.7. Апробация работы

Основные материалы диссертации были изложены в форме докладов на ведущих тематических международных конференциях: Super-resolution in different dimensions (Москва, Россия; 2015), XXVIII Зимней молодёжной научной школе ИБХ РАН (Москва, Россия; 2015), European Microscopy Congress (EMC) 2016 (Лион, Франция; 2016) и Microscience Microscopy Congress (MMC) 2017 (Манчестер, Великобритания; 2017).

1.8. Публикации

По материалам диссертации опубликовано четыре статьи в международных рецензируемых журналах.

2. Основное содержание работы

2.1. Объект исследования, предмет исследования

GFP – белок с молекулярной массой около 25 кДа, состоящий из ~ 240 аминокислотных остатков. GFP из медузы *A. victoria* является наиболее известным представителем семейства флуоресцентных белков (или GFP-подобных белков), найденных на сегодняшний момент в тканях многих представителей морской фауны. Третичная структура белка представляет собой β-бочонок, сформированный из 11 антипараллельных β-тяжей, окружающих искаженную α-спираль (рис. 1).

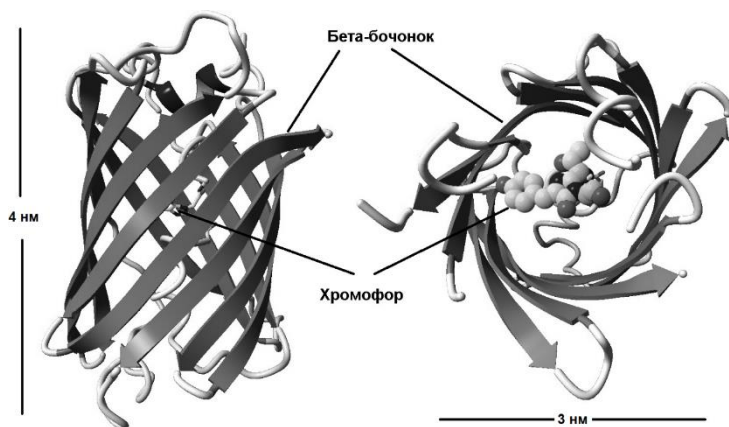


Рис. 1. Третичная структура GFP из медузы *A. victoria*. Слева – вид сбоку, справа – вид сверху. GFP представляет собой β -бочонок, внутри которого расположен хромофор (показан в виде сфер).

GFP способен флуоресцировать за счет наличия уникального хромофора, образующегося в результате автокаталитической модификации аминокислотных остатков Ser-Tyr-Gly α -спирали в позициях 65–67. Таким образом, хромофор полностью погружен внутрь β -бочонка и защищен от прямого контакта с находящимися во внешней среде молекулами (см. рис. 1). На данный момент создано большое количество флуоресцентных белков, отличающихся по основным спектральным характеристикам. Среди наиболее широко применяемых зеленых флуоресцентных белков следует отметить EGFP, отличающийся от GFP дикого типа (avGFP) четырьмя аминокислотными заменами, в том числе по первому хромофоробразующему положению (S65T).

Одной из ключевых характеристик, определяющих практическую ценность конкретного варианта флуоресцентного белка, является фотостабильность, т.е. способность молекулы многократно испускать фотоны под действием возбуждающего света. Низкая фотостабильность существенно затрудняет изучение объекта в динамике в течение долгого времени, реконструкцию трехмерных изображений, микроскопию визуализации времени жизни флуоресценции, наблюдение на уровне одиночных молекул.

Фотостабильность напрямую связана с фотообесцвечиванием хромофора. В целом, в основе фотообесцвечивания лежат фотохимические процессы, приводящие к обратимому нарушению или необратимому разрушению электронного сопряжения исходной π -электронной системы.

К основным механизмам фотообесцвечивания можно отнести цис-транс-изомеризацию хромофора (Tim B. McAnaney et al., *Biochemistry*, 2005, K. M. Dean, *J Biophys. J.*, 2011, A. Drobizhev, *Sci. Rep.*, 2012), образование триплетных состояний и влияние кислорода (P. P. Chapagain et al., *J. Chem. Phys.*, 2011, D. B. и M. F. Arijit Roy et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2010, A. Jiménez-Banzo et al., *Biophys. J.*, 2008, B. C. Ana Jimenez-Banzo et al., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2010, C. Duan et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2013), фотовосстановление (R. B. Vegh et al., *J. Phys. Chem. B*, 2014) и окислительная фотоконверсия (реддинг) (A. Bogdanov et al., *Nat. Chem. Biol.*, 2009, *Nat. Meth.*, 2009). Данная работа связана с изучением переноса электрона в возбужденном состоянии хромофора как первичного процесса окислительной фотоконверсии GFP и как важной причины фотообесцвечивания этих флуорофоров.

Было показано, что ряд зеленых флуоресцентных белков может служить в качестве светоиндуцируемых доноров электронов в присутствии электронных акцепторов. Эта фотохимическая реакция сопровождается конверсией из зеленой формы белка в красную. Указанное явление характерно для множества белков, происходящих из организмов разных таксономических групп, и получило название «реддинг».

На сегодняшний день нет точного понимания механизмов реддинга, однако ряд экспериментальных наблюдений позволяет предположить, что это двухстадийный процесс. На первой, быстрой, стадии происходит возбуждение хромофора и потеря им одного электрона. Далее возможны два варианта: возбужденный хромофор может потерять второй электрон и претерпеть конверсию в красное состояние или же может произойти необратимый переход возбужденного хромофора в состояние, не обладающее флуоресценцией, т.е. фотообесцвечивание белка. Учитывая существенный вклад реддинга в обесцвечивание большинства зелёных флуоресцентных белков, направленное блокирование этого процесса, вероятно, может служить способом увеличения фотостабильности этих маркёров. Разработке подходов к улучшению фотостабильности GFP с помощью подавления реддинга посвящена настоящая работа.

2.2. Основные результаты работы

2.2.1. Увеличение фотостабильности зеленых флуоресцентных белков путем изменения состава клеточных сред

Окислительная фотоконверсия, или реддинг представляет собой важную (если не основную) причину фотообесцвечивания зеленых флуоресцентных белков при визуализации в живых клетках. Для повышения фотостабильности представляется резонным снизить эффективность данного процесса. Первой реализацией данного подхода стало удаление из клеточной среды акцепторов электронов (A. Bogdanov et al, *Nat Meth*, 2009), а её развитием – добавление в клеточную среду рутина, антиоксиданта растительного происхождения (A. Bogdanov et al, *PLoS ONE*, 2012).

Добавление рутина является перспективным методом увеличения фотостабильности зеленых флуоресцентных белков, поскольку оно позволяет избежать клеточного стресса, связанного с длительной инкубацией в бедной среде. Однако рутину присущи некоторые особенности, ограничивающие удобство его использования. Во-первых, он обладает низкой (около 100 мг/л) растворимостью в воде, что исключает возможность приготовления концентрированного раствора. Во-вторых, в водных растворах рутина в течение нескольких дней теряет активность, что делает бессмысленным его длительное хранение в растворенной форме. Наконец, плохо изучена зависимость эффективности рутина от его концентрации в среде. В данной работе мы изучали возможности стабилизации рутина в различных условиях, концентрационную зависимость эффекта рутина на фотостабильность, его влияние на фотообесцвечивание в различных общепотребимых средах, а также влияние других внешних факторов, таких как плотность роста клеток, pH среды, концентрация сыворотки, на фотостабильность EGFP.

Стабилизация рутина в различных растворителях при различных температурах

Ранее было показано, что положительный эффект рутина на фотостабильность EGFP в клетках проявляется только в свежеприготовленных водных растворах (A. Bogdanov et al, *PloS ONE*, 2012). Чтобы найти подходящие условия хранения, мы проверили активность рутина после хранения в двух разных растворителях, воде и DMSO, и при разных температурах (22°C, 4°C, -20°C и -70°C). Через 3 недели рутин в DMSO поддерживал полную активность при каждой температуре хранения. Напротив, раствор рутина в воде полностью потерял свою активность при 22°C и 4°C; оставались активными только образцы, хранившиеся в замороженном состоянии.

Важно отметить, что рутин обладает существенно лучшей растворимостью в DMSO, чем в воде (приблизительно 3 г/л и 100 мг/л, соответственно). Таким образом, DMSO можно использовать для приготовления концентрированного исходного раствора и хранить его для удобства. В то же время низкие температуры могут быть рекомендованы для хранения водного раствора рутина в ситуациях, когда DMSO не может использоваться.

Зависимость эффективности рутина от концентрации

В предыдущих работах было показано, что действующая концентрация рутина составляет около 10 мг/л (A. Bogdanov et al, *PloS ONE*, 2012). Мы провели более детальное изучение зависимости увеличения фотостабильности EGFP в живых клетках от концентрации рутина, выбрав 5 концентрационных точек – 1 мг/л, 10 мг/л, 20 мг/л, 50 мг/л и 100 мг/л – в стандартной среде DMEM. Результаты эксперимента представлены на рис. 2

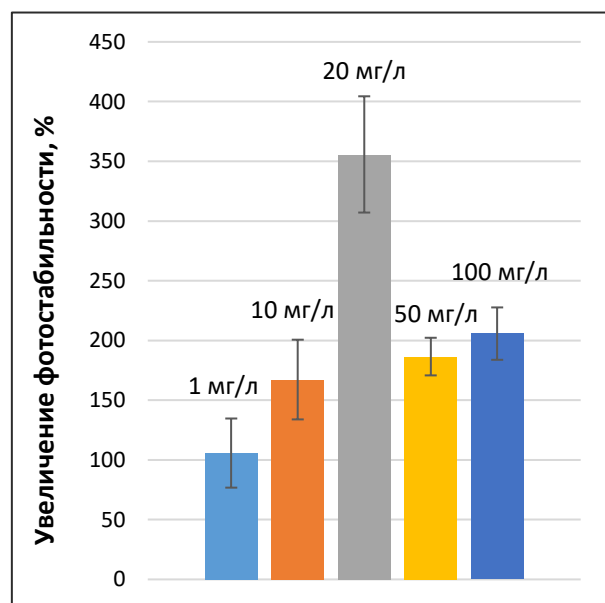


Рис. 2. Результаты экспериментов по изучению концентрационной зависимости влияния рутина на фотостабильность EGFP. Использовали свежеприготовленный водный раствор рутина. Интенсивность возбуждающего света составляла 2,5 Вт/см². Измерения проводили сначала в среде DMEM, затем последовательно повышали концентрацию рутина в среде.

Как следует из рис. 2, наибольшее увеличение фотостабильности EGFP (примерно в 3,5 раза) мы зарегистрировали при концентрации рутина 20 мг/л. Увеличение влияния рутина на фотостабильность с повышением концентрации до 20 мг/л можно объяснить его антиоксидантными свойствами и способностью блокировать переход в триплетное состояние, непосредственно связанное с окислительной фотоконверсией. Снижение же эффекта рутина при дальнейшем

увеличении концентрации, вероятно, происходит ввиду опосредованности действия флавоноида собственным метаболизмом клетки.

Проверка эффекта рутина на других популярных зеленых флуоресцентных белках

Помимо EGFP в качестве белков-маркеров при флуоресцентной микроскопии широко используются такие флуоресцентные белки, как CopGreen, copGreen2, TagGFP2, Emerald и mEmerald, характеризующиеся высокой яркостью флуоресценции и быстрым созреванием хромофора.

В нашей работе мы показали, что рутин не оказывает влияния на фотостабильность большинства из перечисленных белков. Незначительный эффект наблюдается только в случае mEmerald. Его фотостабильность под влиянием рутина увеличивается примерно в 1,5 раза (рис. 3).

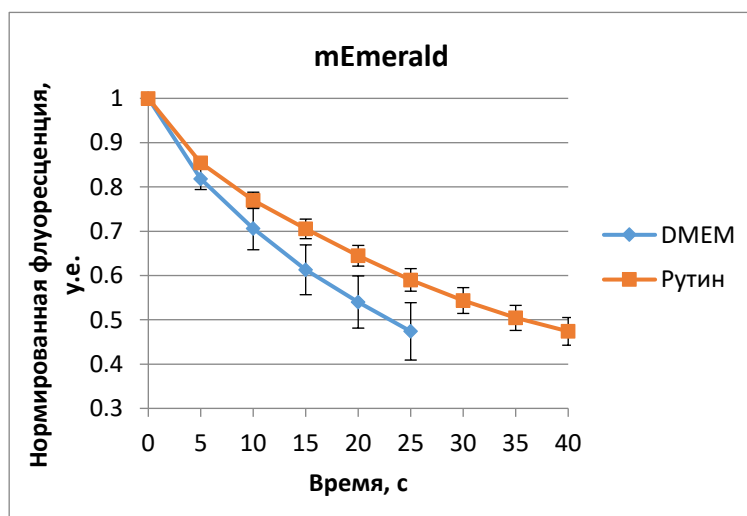


Рис. 3. Влияние рутина на фотостабильность mEmerald в клетках HEK 293T. Показаны средние кривые фотообесцвечивания белка (n = 11). Использовали свежеприготовленный водный раствор рутина (концентрация 10 мг/л, удельная мощность облучения 2 Вт/см²).

Избирательность воздействия рутина может быть обусловлена особенностями белкового микроокружения хромофоров разных флуоресцентных белков, а также доступностью флуорофоров для взаимодействия с молекулами антиоксиданта или опосредующими его активностью соединениями.

Проверка действия рутина в различных общепотребимых культуральных средах

Активность рутина была продемонстрирована в популярной среде DMEM и специализированной среде DMEM^{gfp}, разработанной для увеличения фотостабильности GFP при визуализации в живых клетках (A. Bogdanov et al., *Nat Meth*, 2009). Мы изучили его эффективность в других часто используемых средах, RPMI 1640 и F12.

Фотостабильности EGFP в DMEM и RPMI1640 оказались близкими. Добавление рутина в эти среды вызывало похожее по относительному эффекту (в 3-4 раза) увеличение фотостабильности EGFP (рис. 4). Напротив, Ham's F12 обеспечивала очень высокую начальную фотостабильность EGFP, которая практически не подвергалась воздействию рутина и почти в 2 раза опередила коммерческую DMEM^{gfp}.

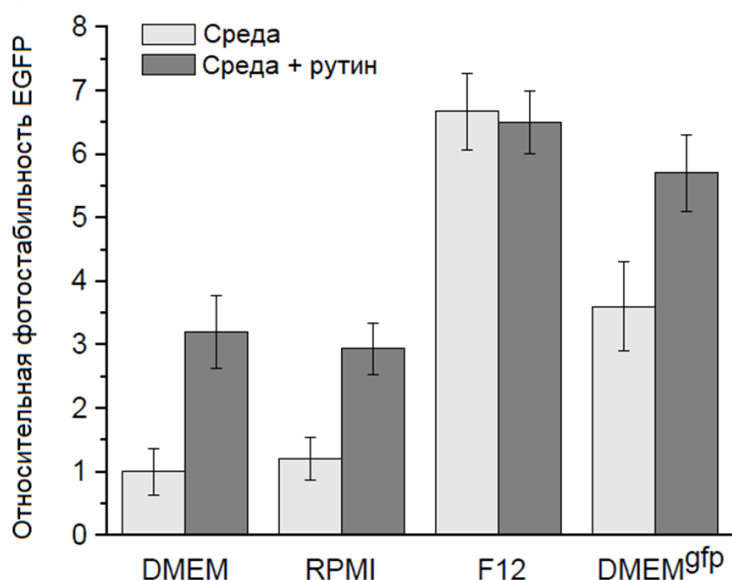


Рис. 4. Влияние различных сред и добавления рутина на фотостабильность EGFP в клетках HEK 293T. Значение для DMEM было установлено равным 1. $n=30$.

Полученные выше результаты позволяют сделать вывод, что рутин не является универсальным средством для повышения фотостабильности зеленых флуоресцентных белков. Косвенно это свидетельствует о разнообразии механизмов фотообесцвечивания и необходимости детального их изучения для поиска более универсальных подходов к увеличению фотостабильности.

Изучение влияния различных компонентов среды Ham's F12 на фотостабильность EGFP

Неожиданно низкая скорость фотообесцвечивания EGFP при использовании среды Ham's F12 подтолкнула нас к анализу её состава с целью определения конкретных компонентов, влияющих на фотостабильность. F12 заметно отличается от DMEM по составу. В частности, она содержит значительно меньшие количества рибофлавина и пиридоксаля (соответственно, в 11 и 67 раз). Эти различия, по-видимому, важны для объяснения её свойств, поскольку ранее было показано, что рибофлавин и пиридоксаль существенно уменьшают фотостабильность EGFP (A. Bogdanov et al., *Nat. Meth.*, 2009, A. Bogdanov et al., *PLOS one*, 2012). Однако очевидно, что сниженные концентрации рибофлавина и пиридоксаля не вполне объясняют антифадинговые свойства F12, поскольку та оказывает большее влияние на фотостабильность EGFP, чем DMEM^{gfp} (DMEM без витаминов) (рис. 4).

В этой связи мы проверили влияние на фотостабильность EGFP других веществ, которые отвечают за различие составов DMEM и F12: аминокислот (L-Ala, L-Arg, L-Asn, L-Asp, L-Cys, L-Glu), витаминов (биотин, B12, липоевая кислота), нуклеотидов и азотистых оснований (тимидин, гипоксантин), биогенных аминов (путресцин) и солей различных металлов (MgCl₂, Na₂HPO₄, CuSO₄, FeSO₄, ZnSO₄).

Мы обнаружили, что комбинация четырёх соединений с потенциальной антиоксидантной активностью, цианокобаламина (витамина B12), липоевой кислоты, гипоксантина и тимидина, обеспечивает приблизительно двухкратное повышение фотостабильности (рис. 5). Примечательно,

что по отдельности эти вещества не оказывали влияния на фотообесцвечивание EGFP при добавлении к DMEM.

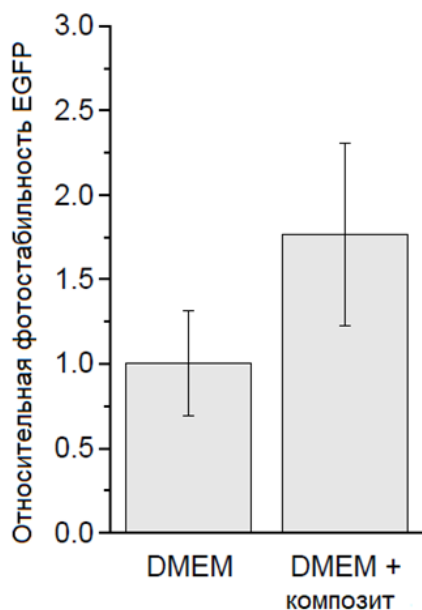


Рис. 5. Влияние компонентов среды F12 на фотостабильность EGFP в клетках HEK 293T. Фотостабильность EGFP измеряли в DMEM и DMEM, дополненной смесью цианокобаламина (1,4 мг/л), липоевой кислоты (0,21 мг/л), гипоксантина (4,1 мг/л) и тимидина (0,7 мг/л) - «DMEM + композит» Значение для DMEM было установлено равным 1.

CuSO₄ и ZnSO₄, входящие в состав F12, не оказывали существенного влияния на фотостабильность в DMEM. Напротив, FeSO₄, добавленный к DMEM, привел к двукратному увеличению фотостабильности EGFP в живых клетках (рис. 6).

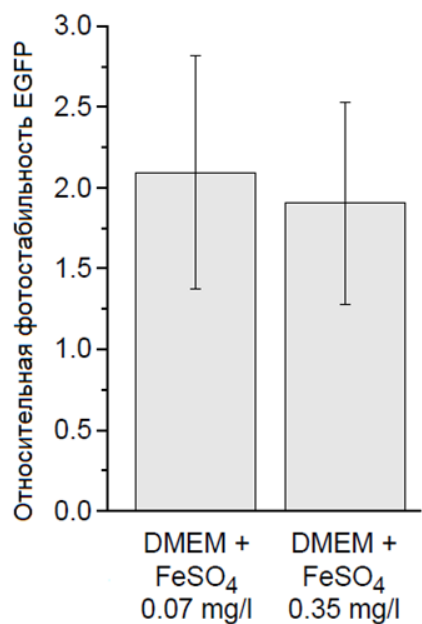


Рис. 6. Влияние компонентов среды F12 на фотостабильность EGFP в клетках HEK 293T. Фотостабильность EGFP измеряли в DMEM и DMEM, дополненной FeSO₄. Значение для DMEM было установлено равным 1.

Интересно, что пятикратный избыток этого соединения (по сравнению с базовой концентрацией, присутствующей в F12) не приводил к дальнейшему увеличению фотостабильности. Также мы не обнаружили влияния FeSO₄ на фотостабильность выделенного препарата EGFP, иммобилизованного на металло-аффинной смоле (данные не показаны). Таким образом, эффект FeSO₄, вероятно, опосредован неким биохимическим процессом в живых клетках, а не прямым взаимодействием с EGFP.

Влияние условий роста клеток (рН, концентрация сыворотки, плотность роста) на фотостабильность

Проводя множество независимых экспериментов по измерению фотостабильности EGFP в живых клетках HEK293T, мы отметили, что даже в одинаковых условиях (настройки микроскопа, состав среды визуализации и интенсивность света) в некоторых случаях наблюдается высокая вариабельность получаемых результатов с разбросом по времени полуобесцвечивания до 3-4 раз. Чтобы выяснить причины такой неоднородности, а также более строго стандартизовать дальнейшие наблюдения, мы проверили влияние ряда параметров, которые могут различаться при подготовке отдельных экспериментов в силу особенностей работы с клеточными культурами: среднего рН, плотности роста клеток и средней концентрации фетальной сыворотки.

Сначала мы протестировали среду DMEM с разными рН (от 7,0 до 8,5) и не детектировали существенных различий фотостабильности EGFP в этом диапазоне рН. Затем мы изучали фотостабильность EGFP при разной плотности роста клеток. Клетки HEK293T были трансфицированы экспрессионным вектором и культивировались до достижения 10-20%, 50-60% и 90%-100% плотности (конфлюентности) к дню эксперимента. В DMEM наблюдалось явное увеличение фотостабильности EGFP по мере увеличения плотности клеток (рис. 7 А).

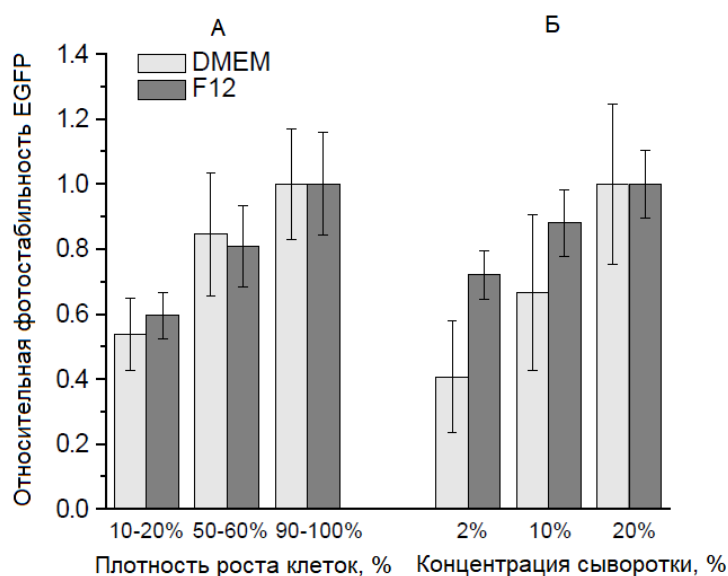


Рис. 7. Сравнение фотостабильности EGFP в живых клетках HEK293T в разных условиях. Нормированное время полуобесцвечивания использовали в качестве меры фотостабильности EGFP (за 100% принимали максимальное значение фотостабильности для каждой из сред). (А) Влияние плотности роста клеток. (Б) Влияние концентрации сыворотки.

Аналогичная зависимость наблюдалась для клеток в среде F12. Наконец, мы проверили влияние концентрации сыворотки, служащей источником питательных веществ для клеток. Клетки выращивали в среде, дополненной 2%, 10% или 20% FBS. Мы обнаружили существенные различия в фотостабильности EGFP как для DMEM, так и для F12. Самая низкая фотостабильность была обнаружена при 2% FBS и самая высокая – при 20%. Различия между максимальными и минимальными временами полуобесцвечивания составляли 2,5-3 раза для DMEM и 1,3-1,5 раза для F12 (рис. 7 Б).

Тот факт, что физиологическое состояние живых клеток может оказывать сильное влияние на фотостабильность флуоресцентных белков и представляет собой важный источник изменчивости (экспериментальной погрешности) для значений, полученных в разное время или в разных

лабораториях, заставляет с большей осторожностью относиться к сравнению публикуемых значений фотостабильности. Сравнение фотостабильности флуоресцентных белков должно выполняться в максимально стандартизованных условиях, а сравнение данных из разных источников может быть очень неточным.

По результатам проведённых экспериментов с рутином можно сделать вывод, что при существенном влиянии на фотостабильность EGFP в средах DMEM, RPMI1640 и DMEM^{gfp} это вещество не может рассматриваться как универсальный антифадинговый агент. Так, его эффективность в отношении ряда популярных флуоресцентных белков либо незначительна, либо отсутствует, а применение при визуализации среды F12 (по крайней мере, в случае совместимых с ней клеточных линий) вполне способно заменить добавление этого флавоноида. Поскольку действие рутина опосредовано собственным метаболизмом клетки, то достоверно объяснить причину его избирательности затруднительно.

Наличие в среде большого количества веществ, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях (витаминов, нуклеотидов, азотистых оснований и ионов металлов), вносит значительный вклад в блокирование фотообесцвечивания, причем, во всей видимости, влияние данных веществ зачастую опосредовано клеточным метаболизмом.

Наша работа также показывает, что важными детерминантами скорости фотообесцвечивания EGFP являются не только состав среды визуализации, но и условия роста клеток. Более ранние работы показывают, что клетки в условиях низкой концентрации сыворотки или низкой плотности роста клеток испытывают значительный окислительный сдвиг и увеличение количества эндогенных активных форм кислорода (M. Gutscher et al., *Nat. Meth.*, 2008). Можно предположить, что окислительная среда является причиной снижения фотостабильности EGFP, наблюдаемой в наших экспериментах в этих условиях (см. рис. 4).

2.2.2. Увеличение фотостабильности зеленых флуоресцентных белков путем удаления внутренних акцепторов электронов

Возбужденный хромофор EGFP восприимчив к наличию электронных акцепторов в своем окружении, способен обесцвечиваться в результате фотоокисления. Как результат, число квантов, в среднем испускаемых одной молекулой флуорофора, существенно снижается, а значит длительность облучения и/или его дозовая нагрузка на образец в эксперименте заметно ограничены. Изучение молекулярных механизмов фотоиндуцированного окисления является не только важной практической, но и фундаментальной задачей, решение которой, мы полагаем, может пролить свет на природу процессов, в которые вовлечены хромофор и его окружение. В рамках данной работы мы предлагаем два принципиально разных подхода к фотостабилизации хромофора: блокирование светозависимого транспорта электронов путем изменения состава внешней для белка среды (см. выше), и воздействие на фотообесцвечивание с помощью модификации структуры самого белка. Второй подход, предполагающий идентификацию и замену ключевых аминокислотных остатков,

которые могли бы выступать в роли промежуточных акцепторов при фотоокислении хромофора EGFP, описан в данном разделе.

Результаты молекулярного моделирования переноса электрона в EGFP

Сотрудники лаборатории профессора Анны Крыловой (Университет Южной Калифорнии, Лос-Анджелес) провели молекулярное моделирование переноса электрона в EGFP. Были предложены две основных модели механизма переноса электрона от хромофора: туннелирование и «скачкообразный» механизм («hopping» mechanism). Согласно первой модели перенос электрона осуществляется в одну стадию непосредственно на внешний акцептор. Согласно второй модели перенос электрона осуществляется в несколько этапов с образованием окисленных и восстановленных интермедиатов. Исходя из литературных величин сродства к электрону, триптофан и тирозин были определены в качестве наиболее вероятных акцепторов. Наши коллеги выполнили полуэмпирические расчеты используя модель Pathways, которая позволяет сравнить вероятности туннелирования (T_{DA}) между различными сайтами и идентифицировать остатки, которые опосредуют ET (electron transfer – перенос электрона). Эти расчеты позволили определить Tyr145 как наиболее вероятный акцептор электронов в EGFP ($T_{DA} = 1,9 \times 10^{-2}$). Таким образом, молекулярное моделирование показывает, что основная роль в фотозависимом переносе электрона принадлежит остатку Tyr145. Мы предположили, что в мутантах с заменой этого остатка на остаток химически инертной аминокислоты основной канал фотоокисления может оказаться заблокированным, что положительно скажется на фотостабильности флуоресцентного белка.

Мутант EGFP-Y145L

В качестве замен мы выбрали две аминокислоты: лейцин и фенилаланин. Лейцин не способен к переносу электрона и является неароматической аминокислотой, достаточно близкой по размеру к тирозину, а фенилаланин – ароматическая аминокислота с более низкой (относительно тирозина) способностью к переносу электрона. Методом сайт-направленного мутагенеза были получены мутанты EGFP с заменами ключевого остатка Tyr145 на Leu и Phe.

Мутант Y145L показал существенно (до 80 раз) повышенную фотостабильность по сравнению с исходным белком в присутствии окислителя (феррицианид калия 500 мкМ) *in vitro*, т.е. в условиях, способствующих интенсивному переносу электрона от возбужденного хромофора к молекуле внешнего акцептора, что хорошо согласуется с нашей гипотезой о блокировании основного пути внутримолекулярного переноса электрона. В то же время Y145F продемонстрировал менее выраженный прирост фотостабильности, вероятно, за счет, пусть и сниженной по сравнению с тирозином, способности фенилаланина служить акцептором электрона. Поскольку эффект увеличения фотостабильности для этого мутанта значительно уступает таковому для Y145L, в дальнейшем проводили исследования только мутанта Y145L.

Для того, чтобы проверить, сохраняет ли мутант Y145L повышенную фотостабильность в условиях, близких к обычным для флуоресцентной визуализации, мы также провели эксперименты в условиях *in cellulo*, без добавления внешних окислителей (рис. 8). EGFP-Y145L неизменно показывал увеличенную фотостабильность (8-13 раз) в сравнении с «родительским» белком как в условиях широкопольной, так и конфокальной флуоресцентной микроскопии.

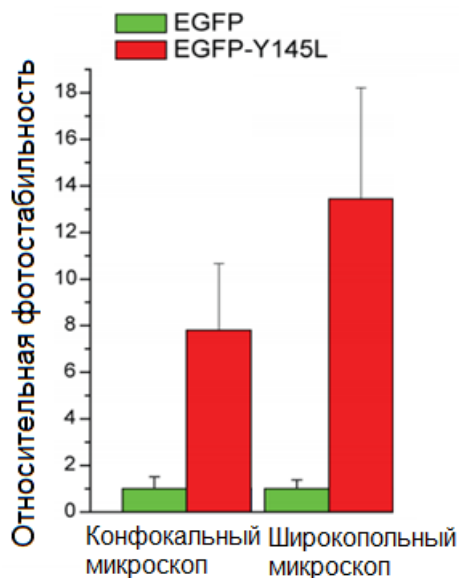


Рис. 8. Увеличение фотостабильности (времени полубесцвечивания) мутантов EGFP-Y145L и Y145F по сравнению с EGFP при конфокальной и широкопольной микроскопии живых клеток HEK293T. Фотостабильность EGFP принята за 1. Показаны значения стандартного отклонения для 50-60 клеток в трех независимых экспериментах.

Таким образом, нам, вероятно, удалось заблокировать один из важных «каналов» фотообесцвечивания GFP.

Однако замена Y145L привела к существенному смещению рН-равновесия в окружении хромофорной группы, доминированию нефлуоресцирующей нейтральной формы хромофора (максимум поглощения – около 400 нм) и, как следствие, – снижению яркости мутанта по сравнению с исходным EGFP (рис. 9). Более того, EGFP-Y145L способен к фотоактивации (по-видимому, за счёт светозависимого депротонирования хромофора). Эти факторы снижают его ценность как фотостабильного маркера.

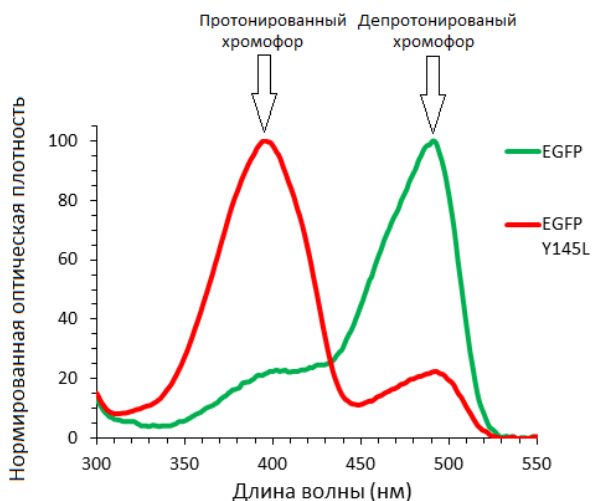


Рис. 9. Спектры поглощения белков EGFP и EGFP-Y145L. Стрелками показаны максимумы поглощения протонированной и депротонированной формы хромофора.

Одним из подходов к повышению яркости мутанта Y145L является снижение эффективности протонирования хромофора, которое, вероятно, может быть достигнуто введением дополнительных аминокислотных замен, описанных ранее как влияющих на кислотность хромофора GFP. Согласно данным литературы, в GFP существует несколько таких аминокислотных остатков.

Борьба с протонированием хромофора мутанта EGFP-Y145L

Из литературных данных (Bizzarri R. et al., *Biochem.*, 2007) следует, что замена E222G блокирует протонирование GFP-хромофора. Другим интересным с точки зрения кислотности хромофора аминокислотным положением является серин-205. Была показана его ключевая роль в светоиндуцируемом переносе протона (ESPT) и протонировании хромофора (Zhong S. et al., *PLoS ONE*, 2014). Более того, в случае хлоридного сенсора mCIY, разработанного на базе желтого флуоресцентного белка YFP (также несущего хромофор типа GFP), введение замены Ser205Val приводит к существенному увеличению фотостабильности белка.

Мы предположили, что создание мутантов по этим остаткам (E222G и S205V) в комбинации с заменой Y145L, введённой ранее в EGFP, может привести к получению белков с существенно увеличенной фотостабильностью и одновременно высокой яркостью флуоресценции. Для проверки данного предположения были получены и протестированы следующие мутанты: EGFP-Y145L/E222G, EGFP-Y145L/S205V и EGFP-Y145L/S205V/E222G. Форма спектра поглощения EGFP-Y145L/E222G свидетельствует о смещении рН-равновесия в сторону анионной формы хромофора по сравнению с EGFP-Y145L (рис. 10). Его яркость оказалась сравнимой (около 70% яркости EGFP, см. таблицу 1) с таковой для EGFP, а фотостабильность *in vitro* (в присутствии 500 мкМ феррицианида калия) – заметно выше EGFP.

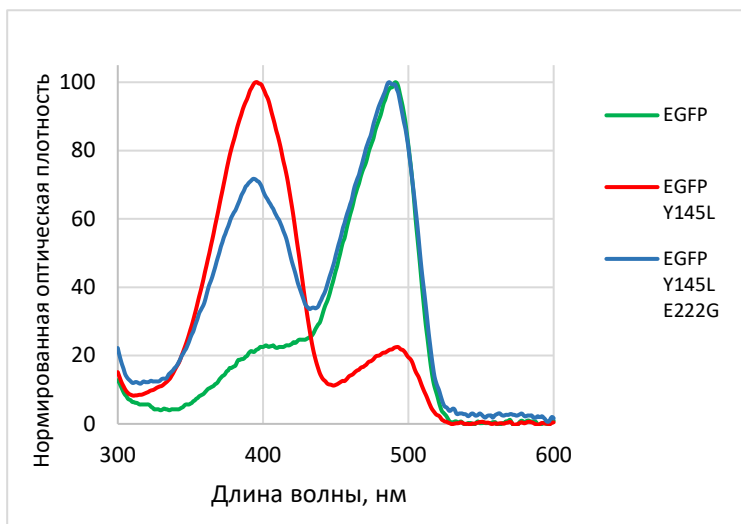


Рис. 10. Спектры поглощения белков EGFP, EGFP-Y145L и EGFP-Y145L/E222G. Максимумы поглощения для протонированной формы хромофора составляли 395 нм, максимумы поглощения для депротонированной (анионной) формы хромофора составляли 488 нм

Далее мы сравнили фотостабильности EGFP и EGFP-Y145L/E222G в условиях эпифлуоресцентной микроскопии *in cellulo*, более подходящие для оценки практического потенциала нового мутанта (рис. 11).

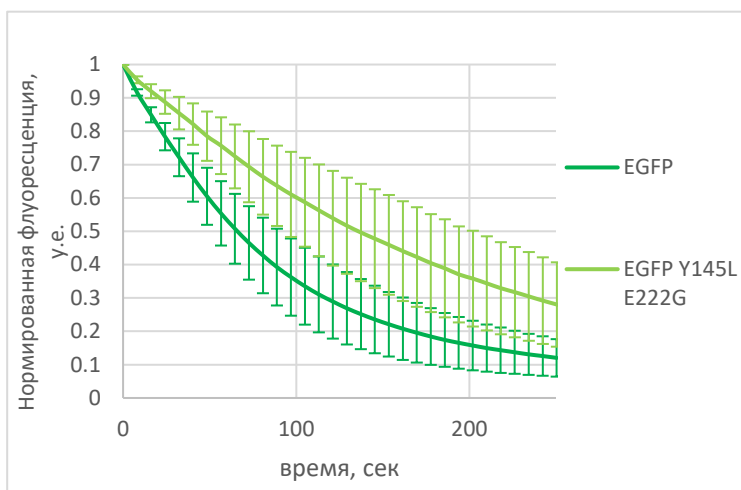


Рис. 11. Фотообесцвечивание EGFP и его мутанта Y145L/E222G в клетках НЕК 293Т в условиях широкопольной микроскопии. $N = 30$.

При введении же мутации S205V в белки EGFP-Y145L и Y145L/E222G мы наблюдали в спектрах поглощения доминирование пика при 400 нм: у мутантов, содержащих замену S205V, практически отсутствует пик поглощения при 488 нм. Мы ожидали, что вследствие внесённой замены рН-равновесие хромофорной группы будет смещено в сторону депротонирования, но получили прямо противоположный результат.

Нами были определены коэффициенты молярной экстинкции мутантов EGFP при 488 нм, а также относительные квантовые выходы их флуоресценции при 510 нм. Полученные значения приведены в таблице 1. Измерение коэффициентов экстинкции и квантовых выходов позволило рассчитать относительную яркость (RV) белков. Видно, что при введении замены S205V в EGFP за счет снижения квантового выхода и коэффициента экстинкции рассчитанная RV мутантных вариантов снижается на два порядка величины (в 50 – 100 раз).

Таблица 1. Некоторые свойства полученных мутантов EGFP. ϵ_{ap} – коэффициент экстинкции анионной формы хромофора белка. QY – квантовый выход флуоресценции. RB – относительная яркость белка*.

белок	$\lambda_{возб}$, НМ	$\lambda_{эмиссии}$, НМ	ϵ_{ap} , M ⁻¹ cm ⁻¹	QY	RB
EGFP	488	509	55000	0,60	1
EGFP-Y145L	397/489	509	10400	0,52	0,16
EGFP-Y145L/E222G	483	509	65000	0,36	0,69
EGFP-Y145L/S205V	400/501	516	2400	0,20	0,01
EGFP-Y145L/S205V/E222G	394/496	515	2100	0,30	0,02

* Для EGFP показан абсолютный квантовый выход, для мутантов показаны квантовые выходы, измеренные относительно EGFP с тем же поглощением (см. Материалы и методы). Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP.

Таким образом, попытка устранить протонирование хромофора была успешной лишь частично. В этой связи мы решили применить метод насыщающего мутагенеза по 145 положению с целью поиска новых вариантов белка, перспективных с точки зрения яркости флуоресценции и фотостабильности, а также провести ряд дополнительных замен по другим потенциально значимым положениям.

Мутанты EGFP по 145 положению

При помощи сайт-направленного мутагенеза мы провели замены тирозина-145 в EGFP на все генетически кодируемые аминокислоты. Первичный отбор мутаций мы осуществляли по яркости бактериальных колоний на следующий день после трансформации плазмидной ДНК. В результате из 18 мутантов мы отобрали 10. Остальные 8 замен приводили к существенному снижению яркости и скорости “созревания” хромофора, поэтому были исключены из дальнейшего исследования.

Мы измерили коэффициенты экстинкции и квантовые выходы флуоресценции полученных мутантов, а также рассчитали их относительную яркость. После чего были проведены эксперименты по изучению фотостабильности *in vitro* на иммобилизованных белках без окислителя и с одноэлектронным окислителем (феррицианом калия), а также в клеточной среде DMEM, где преобладают двухэлектронные окислители. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2. Параметры полученных мутантов EGFP. EC - коэффициент экстинкции, QY - квантовый выход, RB - относительная яркость, RP - относительная фотостабильность.*

Белок	EC, M ⁻¹ cm ⁻¹	QY	RB	RP в PBS, <i>in vitro</i>	RP в PBS с окислителем (500 мкМ K ₃ [Fe(CN) ₆]), <i>in vitro</i>	RP в DMEM, <i>in vitro</i>
EGFP	55000	0,6	1	1	1	1
Y145Q	53100	0.60	0.97	0.54	1.01	1.08
Y145H	45600	0.73	1.01	0.42	4.42	0.67
Y145M	46100	0.65	0.91	0.64	2.63	1.67
Y145S	55100	0.59	0.99	0.24	0.42	0.92
Y145C	35500	0.62	0.67	0.4	3.68	2.25
Y145A	52900	0.61	0.98	0.27	0.42	0.75
Y145T	52700	0.54	0.86	0.38	0.94	1.27
Y145G	45300	0.36	0.50	0.24	1	0.62
Y145K	36500	0.54	0.6	0.3	0.63	0.65
Y145N	48400	0.68	0.99	0.2	0.33	0.82

* Для EGFP показан абсолютный квантовый выход, для мутантов показаны квантовые выходы, измеренные относительно EGFP с тем же поглощением. Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP. Относительная фотостабильность - это время полубесцвечивания интересующего флуоресцентного белка по сравнению с EGFP, облученном при тех же условиях.

Руководствуясь критерием сочетания высокой относительной яркости и фотостабильности в присутствии одно- и двухэлектронных окислителей, мы отобрали два интересных мутанта EGFP: Y145M, Y145C.

Мутанты EGFP по 65 и 165 положению

Теоретические расчеты путей переноса электрона внутри белковой глобулы EGFP, проведенные в лаборатории проф. А. Крыловой (США), показали, что остаток Phe165 может играть роль второстепенного акцептора при светоиндуцированном переносе электрона. Кроме того, ранее полученные в нашей лаборатории результаты экспериментов указывают на существенное влияние хромофоробразующего остатка Thr65 на фотостабильность EGFP.

При помощи сайт-направленного мутагенеза мы провели замены треонина-65 на глицин и фенилаланина-165 на лизин, гистидин, изолейцин и тирозин. Первичный отбор мутантов мы осуществляли по яркости бактериальных колоний на следующий день после трансформации плазмидной ДНК. Мутант с заменой F165K был чрезвычайно тусклым и с существенно сниженной скоростью «созревания» хромофора и был исключен из дальнейшего исследования. Мы измерили коэффициенты экстинкции и квантовые выходы флуоресценции полученных мутантов, а также рассчитали их относительную яркость. После чего были проведены эксперименты по изучению фотостабильности *in vitro* на иммобилизованных белках без окислителя и с одноэлектронным окислителем, а также в клеточной среде DMEM, где преобладают двухэлектронные окислители. Результаты представлены в таблице 3. По результатам всех проведенных экспериментов мы выбрали мутанты F165Y и T65G как наиболее яркие и/или фотостабильные, для дальнейшего перекрестного мутагенеза с мутантами по 145 положению.

Таблица 3. Параметры полученных мутантов EGFP. EC - коэффициент экстинкции, QY - квантовый выход, RB - относительная яркость, RP - относительная фотостабильность.*

Белок	EC, M ⁻¹ cm ⁻¹	QY	RB	RP в PBS, <i>in vitro</i>	RP в PBS с окислителем (500 мкМ K ₃ [Fe(CN) ₆], <i>in vitro</i>)	RP в DMEM, <i>in vitro</i>
EGFP	55000	0.6	1	1	1	1
F165H	40600	0.68	0.84	0.13	0.41	0.58
F165I	55100	0.46	0.77	0.62	0.31	1
F165Y	55600	0.57	0.96	0.37	0.69	2.53
T65G	70000	0.06	0.13	1.8	1.87	2.44

*Для EGFP показан абсолютный квантовый выход, для мутантов показаны квантовые выходы, измеренные относительно EGFP с тем же поглощением. Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP. Относительная фотостабильность - это время полубесцвечивания интересующего флуоресцентного белка по сравнению с EGFP, облученном при тех же условиях.

Двойные и тройные мутанты EGFP по положениям 65, 145, 165

Мы скомбинировали полученные замены F165Y и T65G с заменами Y145M и Y145C, рассчитывая, что некоторые двойные или тройные мутанты будут обладать улучшенными характеристиками. Результаты изучения спектральных свойств и фотостабильности в различных условиях при широкопольной микроскопии представлены в таблице 4. Первый полученный мутант, содержащий замену Y145C (Y145C/F165Y), при исследовании фотостабильности продемонстрировал фотоактивацию (увеличение яркости флуоресценции). Эта особенность затрудняет анализ его свойств и применение как традиционного флуоресцентного маркера, поэтому данная комбинация замен была исключена из дальнейших исследований.

Таблица 4. Параметры полученных мутантов EGFP. EC - коэффициент экстинкции, QY - квантовый выход, RB - относительная яркость, RP - относительная фотостабильность.*

Белок	EC, М ⁻¹ см ⁻¹	QY	RB	RP в PBS, <i>in vitro</i>	RP в PBS с окислителем (500 мкМ K ₃ [Fe(CN) ₆]), <i>in vitro</i>	RP в DMEM, <i>in vitro</i>
EGFP	55000	0.6	1	1	1	1
Y145M/F165Y	56300	0.72	1.23	0.31	1.3	1.19
Y145C/F165Y	61200	0.33	0.62	0.81	6.7	1.69
T65G/Y145M	84500	0.08	0.20	1.75	15.6	4.06
T65G/F165Y	84000	0.20	0.51	0.81	1.04	2.25
T65G/Y145M/F165Y	86000	0.30	0.78	1.77	7.6	1.92

* Для EGFP показан абсолютный квантовый выход, для мутантов показаны квантовые выходы, измеренные относительно EGFP с тем же поглощением. Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP. Относительная фотостабильность - это время полубесцвечивания интересующего флуоресцентного белка по сравнению с EGFP, облученном при тех же условиях.

Как следует из полученных результатов (табл. 4), наибольшей фотостабильностью во всех тестовых условиях обладал мутант T65G/Y145M, однако снижение квантового выхода его флуоресценции почти на порядок величины приводит к существенной потере яркости. По всей видимости, за уменьшение квантового выхода ответственна замена T65G. Стоит также отметить высокие значения коэффициентов экстинкции мутантов, содержащих эту замену. Замена же F165Y, по-видимому, компенсирует снижение квантового выхода, обусловленное мутацией T65G.

Мы провели изучение фотостабильности мутантов, содержащих замены T65G, Y145M, F165Y в клетках НЕК293Т, результаты представлены на рис. 12.

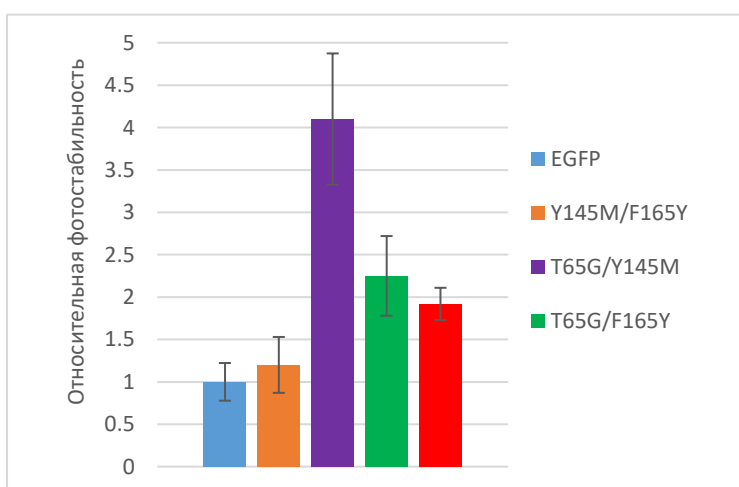


Рис. 12. Увеличение фотостабильности (времени полубесцвечивания) мутантов EGFP по сравнению с EGFP (его фотостабильность принята за 1) при широкопольной микроскопии живых клеток НЕК293Т. Показаны значения стандартного отклонения для 30-40 клеток в трех независимых экспериментах.

Наиболее фотостабильным из полученных является мутант EGFP-T65G/Y145M, однако сравнительно низкий квантовый выход флуоресценции этого белка ограничивает его использование в микроскопии. По совокупности яркости и фотостабильности наибольший интерес представляет тройной мутант T65G/Y145M/F165Y.

Комбинируя замены по двум и трем положениям, нам удалось получить перспективные новые мутанты, в том числе сочетающие высокую яркость и фотостабильность. Кислотное равновесие хромофора у полученных мутантов сдвинуто в сторону депротонирования, а фотостабильность в некоторых случаях до 15 раз выше, чем у EGFP.

2.2.3. Тройной мутант EGFP как метка для FLIM-микроскопии

У некоторых полученных нами мутантов наблюдался заметно сниженный квантовый выход флуоресценции при быстром «созревании» хромофора и высоком коэффициенте молярной экстинкции. В частности, относительно низкий квантовый выход и высокий коэффициент экстинкции мутантов EGFP, содержащих замену T65G, позволили нам сделать предположение о том, что время жизни флуоресценции данных белков может быть короче, чем у исходного EGFP. Контраст по времени жизни флуоресценции открывает перспективы использования этих мутантов в качестве меток для микроскопии времён жизни флуоресценции (FLIM). Для того, чтобы проверить предположение о природе снижения квантовых выходов, мы провели измерения времени жизни флуоресценции ряда полученных нами мутантов как *in vitro*, так и *in cellulo*.

Мы начали с измерения времён жизни флуоресценции очищенных препаратов EGFP, EGFP-T65G, T65G/Y145M и T65G/Y145M/F165Y при возбуждении двухфотонным лазером ($\lambda=900$ нм; измерения проводились в капле раствора белка, нанесённой на предметное стекло). Все три мутанта продемонстрировали более короткие времена жизни флуоресценции (таблица 5). Тройной же мутант T65G/Y145M/F165Y отличается одновременно высокой яркостью (~80% от EGFP, $QY = 0,3$, $ES = 86000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и коротким временем жизни флуоресценции (табл. 5). Такое сочетание флуоресцентных характеристик с одной стороны делает этот мутант потенциально привлекательной меткой для FLIM-визуализации, с другой – является уникальным среди описанных флуоресцентных белков (ФБ).

Таблица 5. Спектральные свойства и времена жизни флуоресценции EGFP и его мутантов. *

ФБ	λex/λem, нм	Коэффициент экстинкции, M ⁻¹ см ⁻¹	Квантовый выход	Относительная яркость, %	Время жизни флуоресценции, пс	Относительная фотостабильность, %	
						<i>in vitro</i>	<i>in cellulo</i>
EGFP	489/509	55000	0.60	100	2800±70	100±8	100±20
T65G	488/508	70000±1500	0.06±0.01	13±2	1320±30	180±25	240±63
T65G/Y145M	484/508	84500±1400	0.08±0.01	20±3	820±8	175±12	700±280
T65G/Y145M /F165Y	487/509	86000±1200	0.30±0.04	78±12	820±5	190±4	230±45

* Для EGFP показан абсолютный квантовый выход, для мутантов показаны квантовые выходы, измеренные относительно EGFP с тем же поглощением. Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP. Относительная фотостабильность – это время полубесцвечивания интересующего ФБ по сравнению с EGFP, облученного в тех же условиях. Левый столбец соответствует фотостабильности *in vitro* очищенного белка в PBS, правый – фотостабильности в клетках HEK293T, экспрессирующих интересующий флуоресцентный белок.

Итак, мутант EGFP-T65G/Y145M/F165Y характеризуется субнаносекундным временем жизни при сравнительно высокой яркости флуоресценции. Чтобы проверить его практическую ценность для многопараметрического FLIM в зеленом канале, были выбраны три белка с близкими спектрами эмиссии и разными временами жизни флуоресценции: EGFP (2,8 нс), EGFP-T65G (1,3 нс) и, собственно, T65G/Y145M/F165Y (0,8 нс). На основе кодирующих последовательностей их генов были созданы химерные генетические конструкции, обеспечивающие экспрессию трёх указанных маркёров в разных компартментах эукариотической клетки: EGFP-актин – в цитоплазме, T65G-гистон H2B – в ядре и T65G/Y145M/F165Y – в митохондриях (рис. 13). Обладая практически одинаковыми спектрами эмиссии флуоресценции, выбранные флуоресцентные белки не могут быть надёжно различимы с помощью обычной флуоресцентной микроскопии, однако в FLIM они были визуализированы как независимые метки (рис. 13).

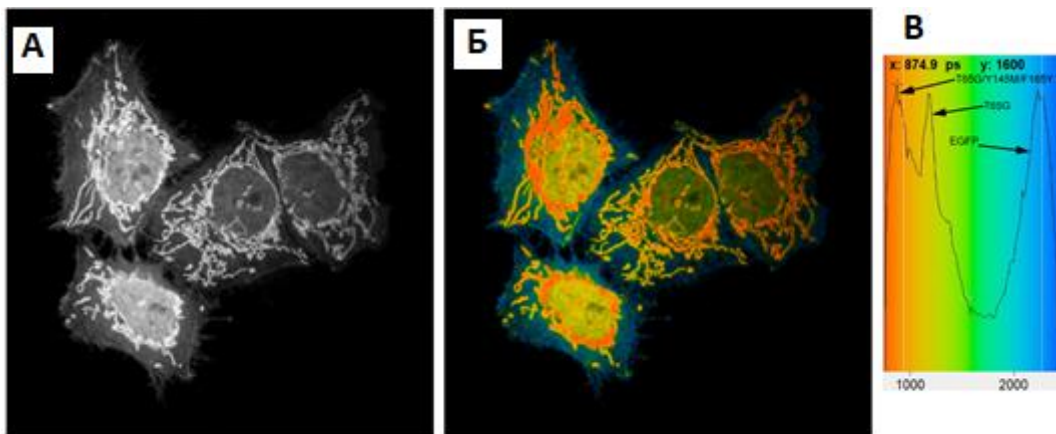


Рис. 13. Флуоресцентная микроскопия и FLIM-визуализация живых клеток HeLa, экспрессирующих EGFP-актин (цитоплазма, $T_m \sim 2,3$ нс), EGFP-T65G-гистон 2B (ядро, $T_m \sim 1,3$ нс), EGFP-T65G/Y145M/F165Y-mito (митохондрии, $T_m \sim 0,8$ нс). (A) Изображение интенсивности флуоресценции в оттенках серого, (B) комбинированная интенсивность + время жизни флуоресценции, где яркость представляет собой количество фотонов, а цвет – среднее время жизни флуоресценции, (C) гистограмма распределения средних времён жизни флуоресценции (диапазон составляет 780-2350 пс) с цветовой легендой.

3. Выводы

- 1) Рутин сохраняет активность при длительном хранении в растворе DMSO на комнатной температуре и в водном растворе при глубокой заморозке. Оптимальная концентрация рутина при флуоресцентной микроскопии – около 20 мг/л.
- 2) а) Рутин не оказывает влияние на фотостабильность ряда зеленых флуоресцентных белков (copGreen, copGreen2, TagGFP2 и Emerald) и в 1,5 раза увеличивает фотостабильность белка mEmerald.
б) Рутин увеличивает фотостабильность EGFP в среде RPMI1640 в 2,5 раза, но не влияет на фотообесцвечивание в среде F12, которая обеспечивает восьмикратный прирост фотостабильности EGFP (по сравнению с DMEM).
- 3) Тестирование различных веществ, входящих в F12 показало, что композит из цианокобаламина, липоевой кислоты, тимидина и гипоксантина способен увеличивать фотостабильность EGFP в среде DMEM в 2 раза. Также выявлена роль FeSO₄, который увеличивает фотостабильность EGFP в 2 раза, причем его эффект наблюдается только в экспериментах с живыми клетками.
- 4) Условия культивирования клеток НЕК293 существенно влияют на результаты экспериментов по измерению фотостабильности EGFP. Так, наблюдается положительная корреляция увеличения фотостабильности с ростом плотности культуры клеток и концентрации в культуральной среде фетальной сыворотки.
- 5) Предложены модельные механизмы первичного процесса переноса электрона с возбуждённого хромофора EGFP: туннелирование и «скачкообразный» механизм. Для более вероятного «скачкообразного» механизма предсказаны промежуточные акцепторы электронов – Tyr145 и Phe165. Экспериментальная проверка подтвердила ключевую роль остатка Tyr145: мутант EGFP-Y145L обладал повышенной (до 80 раз) фотостабильностью.
- 6) Комбинирование мутаций по теоретически предсказанным положениям (145, 165), а также по хромофоробразующему треонину-65 позволило получить ряд перспективных мутантов EGFP с высокими коэффициентами экстинкции и увеличенной фотостабильностью (до 15 раз *in vitro*, до 7 раз *in cellulo*). Среди них мутант T65G/Y145M/F165Y, в котором сочетается высокая яркость и короткое время жизни флуоресценции, является перспективной меткой для FLIM-микроскопии.

4. Список работ, опубликованных по теме исследования

4.1. Статьи

- 1) Mamontova A., Bogdanov A., Lukyanov K., Influence of cell growth conditions and medium composition on EGFP photostability in live cells, *BioTechniques*, 2015, May, 58 (5), doi: 10.2144/000114289
- 2) Bogdanov A., Acharya A., Titelmayer A., Mamontova A., Bravaya K., Kolomeisky A., Lukyanov K., Krylov A., Turning on and off photoinduced electron transfer in fluorescent proteins by π -stacking, halide binding, and Tyr145 mutations, *J. Am. Chem. Soc.*, 2016, Apr 13;138(14):4807-17, doi: 10.1021/jacs.6b00092.3.
- 3) Мамонтова А., Григорьев А., Царькова А., Лукьянов К., Богданов А., Борьба за фотостабильность: механизмы обесцвечивания флуоресцентных белков, *Биоорганическая химия*, 2017, том 43 № 6, 598-607, doi: 10.7868/S0132342317060021
- 4) Mamontova A., Solovyev I., Savitsky A., Shakhov A., Lukyanov K. & Bogdanov A., Bright GFP with subnanosecond fluorescence lifetime, *Sci Rep.*, 2018 Sep 5;8(1):13224. doi: 10.1038/s41598-018-31687-w

4.2. Тезисы конференций

- 1) Super-resolution in different dimensions, 02.06-05.06, 2015, Moscow, Russia, Mamontova A., Bogdanov A., Mishin A., Klementieva N., Lukyanov K., Increasing the photostability for super-resolution microscopy
- 2) XXVIII Winter scientific school "Promising areas of Physical and Chemical Biology and Biotechnology", 07.02-11.02, 2015, Moscow, Russia, Mamontova A., Bogdanov A., Mishin A., Klementieva N., Lukyanov K., Increasing the photostability of green fluorescent proteins for super-resolution microscopy
- 3) European Microscopy Congress 28.08 - 02.09, 2016, Lyon, France, Mamontova A., Bogdanov. A., Mishin A., Klementieva N., Lukyanov K., Turning Off Photoinduced Electron Transfer In Green Fluorescent Proteins For Super-Resolution Microscopy
- 4) Microscience Microscopy Congress, 03.07-06.07, 2017, Manchester, UK, Mamontova A., Bogdanov. A., Lukyanov K., The fight for the photostability against photoinduced electron transfer in green fluorescent proteins