

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

Шемякина Ирина Игоревна

**Красные и дальне-красные флуоресцентные белки,
оптимизированные для мечения белков слияния**

специальность – 03.01.03. – молекулярная биология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Доктор биологических наук

Чудаков Дмитрий Михайлович

Москва 2015

Содержание

| | |
|--|----|
| Содержание | 2 |
| Введение | 5 |
| Список сокращений. | 7 |
| 1. Обзор литературы..... | 8 |
| 1.1. История открытия флуоресцентных белков | 8 |
| 1.2. Характеристика GFP: структура и свойства..... | 9 |
| 1.3 Биологическая функция флуоресцентных белков | 12 |
| 1.4 Применение флуоресцентных белков | 13 |
| 1.5 Проблема олигомеризации флуоресцентных белков..... | 18 |
| 1.6 Мономерные флуоресцентные белки | 20 |
| 1.7 Заключение | 35 |
| 2. Материалы и методы | 37 |
| 2.1 Оборудование и реактивы..... | 37 |
| 2.1.1 Оборудование..... | 37 |
| 2.1.2 Реактивы..... | 38 |
| 2.1.3 Буферные растворы..... | 39 |
| 2.1.4 Микробиологические среды..... | 39 |
| 2.1.5 Бактериальные штаммы и клеточные линии | 40 |
| 2.2 Методы исследования и анализа результатов | 40 |
| 2.2.1 Амплификация фрагментов ДНК..... | 40 |
| 2.2.2. Случайный (Random) мутагенез..... | 41 |
| 2.2.3. Сайт-специфический мутагенез | 42 |
| 2.2.4. Трансформация клеток <i>E. Coli</i> | 42 |

| | |
|---|----|
| 2.2.5. Выделение плазмидной ДНК..... | 43 |
| 2.2.6. Переосаждение ДНК | 43 |
| 2.2.7. Определение нуклеотидной последовательности ДНК..... | 44 |
| 2.2.8 Выделение и очистка рекомбинантных белков..... | 44 |
| 2.2.9 Определение скорости созревания хромофора..... | 45 |
| 2.2.10 Гель-фильтрация..... | 46 |
| 2.2.11 Спектроскопические методы | 46 |
| 2.2.12. Трансфекция эукариотических клеток..... | 48 |
| 2.2.13 Микроскопия..... | 48 |
| 2.2.14 Получение рекомбинантных конструкций | 49 |
| 2.2.14.1 Получение бактериальных экспрессионных векторов | 49 |
| 2.2.14.2 Получение эукариотических экспрессионных векторов..... | 50 |
| 2.2.14.3 Получение FusionRed..... | 51 |
| 2.2.14.4 Получение mKateKFP1 и mKateKFP2..... | 53 |
| 2.2.14.5 Получение FusionRed-657 | 53 |
| 2.2.15 Трансгенные <i>Xenopus laevis</i> | 55 |
| 3. Результаты и обсуждение | 56 |
| 3.1 Красный мономерный флуоресцентный белок. | 56 |
| 3.1.1 Получение белка FusionRed | 56 |
| 3.1.2 Характеристика и сравнение FusionRed с аналогами <i>in vitro</i> | 60 |
| 3.1.3 Характеристика и сравнение белка FusionRed с аналогами <i>in vivo</i> | 64 |
| 3.2. Красные мономерные обратимо фотоактивируемые белки | 71 |
| 3.2.1 Получение белков mKateKFP1 и mKateKFP2..... | 72 |

| | |
|---|----|
| 3.2.2 Изучение фотоактивационных свойств белков mKateKFP1 и mKateKFP2 | 73 |
| 3.3. Дальне-красный мономерный белок | 77 |
| 3.3.1 Получение дальне-красного мономерного белка | 78 |
| 3.4 Заключение | 85 |
| Выводы | 87 |
| Список литературы | 88 |

Введение

Клонирование гена зеленого флуоресцентного белка GFP (Green Fluorescent protein) медузы *Aequorea victoria* в 1992 году [1] открыло широкие перспективы для фундаментальных и прикладных исследований в области молекулярной и клеточной биологии. Сегодня GFP и GFP-подобные флуоресцентные белки (ФБ) широко используются как генетически кодируемые маркеры для биологических и медицинских исследований в культурах клеток и *in vivo*. Широкому применению GFP способствуют его уникальные свойства: низкая токсичность, достаточно высокая рН-стабильность и высокая яркость флуоресцентного сигнала.

Так как ФБ являются генетически-кодируемыми флуоресцентными метками, они могут быть встроены и экспрессированы в одной рамке считывания с интересующим белком, что позволяет наблюдать за его локализацией в живых системах. Однако, необходимой характеристикой ФБ для успешного мечения исследуемых белков при максимальном сохранении их нативной функции и локализации является мономерность. Олигомеризация, характерная для большинства ФБ и для всех известных красных ФБ, ограничивает круг их применений при мечении индивидуальных белковых молекул и в качестве флуоресцентных репортеров в составе биосенсоров. Кроме того, если изучаемый белок также является олигомером, возможно возникновение агрегатов более высокого порядка, что может отрицательно сказаться на жизнеспособности клетки. Лучшим решением для этой проблемы является создание мономерных ФБ.

Первый клонированный флуоресцентный белок, avGFP, оказался естественным мономером. По данной причине, avGFP и его производные варианты с флуоресценцией в циановой, зеленой и желтой (максимумы

эмиссии от 470 до 530 нм) областях спектра (ECFP, Cerulean, EGFP, EYFP, Citrine, Venus, и другие ФБ) сегодня широко применяются в составе белков слияния. В то же время, все известные природные красные флуоресцентные белки характеризуются димерной либо тетрамерной природой.

Усилиями различных научных коллективов и, в том числе, усилиями нашей лабораторией был получен ряд мономерных красных и дальнекрасных ФБ. Однако, опыт многих исследований свидетельствует о том, что существующие мономерные красные флуоресцентные белки, такие как mCherry, TagRFP и mKate2, уступают зеленым мономерным белкам при работе в химерных конструкциях с белками слияния. Таким образом, оставалась нерешенной задача разработки оптимального красного флуоресцентного белка для мечения исследуемых белков в живых клетках, которой и была посвящена настоящая работа.

Список сокращений.

| | |
|---------------|--|
| УФ | ультрафиолетовая область спектра |
| ФАФБ | фотоактивируемые флуоресцентные белки |
| ФБ | флуоресцентные белки |
| ХБ | хромобелок |
| BFP | blue fluorescent protein (синий флуоресцентный белок) |
| CFP | cyan fluorescent protein (голубой флуоресцентный белок) |
| FLIM | fluorescence lifetime imaging microscopy (время жизни флуоресценции) |
| FRAP | fluorescence recovery after photobleaching (метод восстановления флуоресценции после фотообесцвечивания) |
| FRET | fluorescence resonance energy transfer (флуоресцентный резонансный перенос энергии); |
| GFP | green fluorescent protein (зелёный флуоресцентный белок) |
| PALM | photoactivated localization microscopy (микроскопия локализованной фотоактивации) |
| PS-CFP | photoswitchable Cyan Fluorescent Protein –(фотопереключаемый циановый флуоресцентный белок) |
| RFP | red fluorescent protein (красный флуоресцентный белок) |

1. Обзор литературы

1.1. История открытия флуоресцентных белков

Green Fluorescent Protein (GFP) – зелёный флуоресцентный белок – был впервые выделен в 1961 году О. Шимомурой и коллегами из медузы *Aequorea victoria* [2]. В 1992 году была установлена первичная структура GFP [1]. Спустя 2 года Chalfie и соавторы предложили использовать GFP в качестве генетически кодируемого флуоресцентного маркера экспрессии генов [3]. К настоящему времени различными группами исследователей найдены новые природные GFP-подобные белки и было создано большое число их мутантных вариантов. Это позволило значительно расширить диапазон применений флуоресцентных белков.

Ряд GFP-подобных белков, преимущественно характеризующихся флуоресценцией в зелёной области спектра, был обнаружен в биолюминесцентных организмах, таких как Hydrozoa и Anthozoa. Повышенный фундаментальный и прикладной интерес к флуоресцентным белкам привел к обнаружению родственных белков в небиолюминесцентных коралловых полипах и морских анемонах [4, 5]. Эти белки имеют сходную с avGFP третичную структуру и обладают большим цветовым разнообразием, которое объясняется формированием различных по химической структуре хромофорных групп а также различиями аминокислотного окружения хромофора [6, 7]. Интересно, что на сегодняшний день GFP-подобные белки обнаружены исключительно у морских организмов.

Открытие и развитие множества спектральных вариантов ФБ произвели революцию в исследовании живых систем. В 2008 году

Нобелевская премия по химии была присуждена «за открытие и развитие зеленого флуоресцентного белка, GFP».

1.2. Характеристика GFP: структура и свойства

GFP дикого типа имеет молекулярную массу 27 кДа и состоит из 238 аминокислотных остатков [1]. При кристаллизации GFP может сохранять способность к флуоресценции [8], что позволило определить трёхмерную структуру функциональной молекулы с помощью рентгеноструктурного анализа [9, 10]. Впервые кристаллическая структура белка GFP была расшифрована в 1996 году [11], и эта работа во многом прояснила механизм образования хромофора и роль окружающих аминокислот.

GFP и GFP-подобные белки формируют внутренний хромофор без внешних ферментов и субстратов, используя только молекулярный кислород.

Пространственная структура GFP представляет собой β -бочонок, образованный одиннадцатью β -слоями, внутри которого расположена α -спираль, несущая хромофор. Петли и короткие α -спиральные участки закрывают бочонок сверху и снизу (рис. 1(а)). Химически хромофор GFP является 4-(п-гидроксибензилиден)имидазол-5-оном [12].

Флуорофор (хромофор) состоит из остатков трех аминокислот: Ser65, Tyr66, Gly67. Образование функционального хромофора происходит в составе белка посттрансляционно, в результате двух последовательных процессов: реакции циклизации между этими тремя аминокислотными остатками и последующего окисления хромофора с участием молекулярного кислорода (рис. 1 (в)).

Третичная структура белка, благодаря своей компактности, создаёт оптимальные условия для защиты хромофора от внешних воздействий, чем объясняется высокая стабильность флуоресценции, устойчивость белка к действию протеаз, изменению pH и температуры [13].

Сформировавшийся хромофор avGFP существует в двух формах – протонированной, с максимумом поглощения при 395 нм, и анионной, с максимумом поглощения при 470 нм. Этим объясняется наличие двух пиков в спектре возбуждения avGFP (рис. 1 (б)). Максимум эмиссии приходится на 509 нм с плечом при 540 нм [3].

Исследования ФБ с использованием сайт-направленного и случайного мутагенеза показали, что флуоресценция зависит от трехмерной структуры аминокислотных остатков, окружающих хромофор. Денатурация белка, как и следовало ожидать, разрушает флуоресценцию [13], а мутации аминокислотных остатков, находящихся в непосредственной близости от хромофора, могут значительно изменить флуоресцентные свойства белка [14].

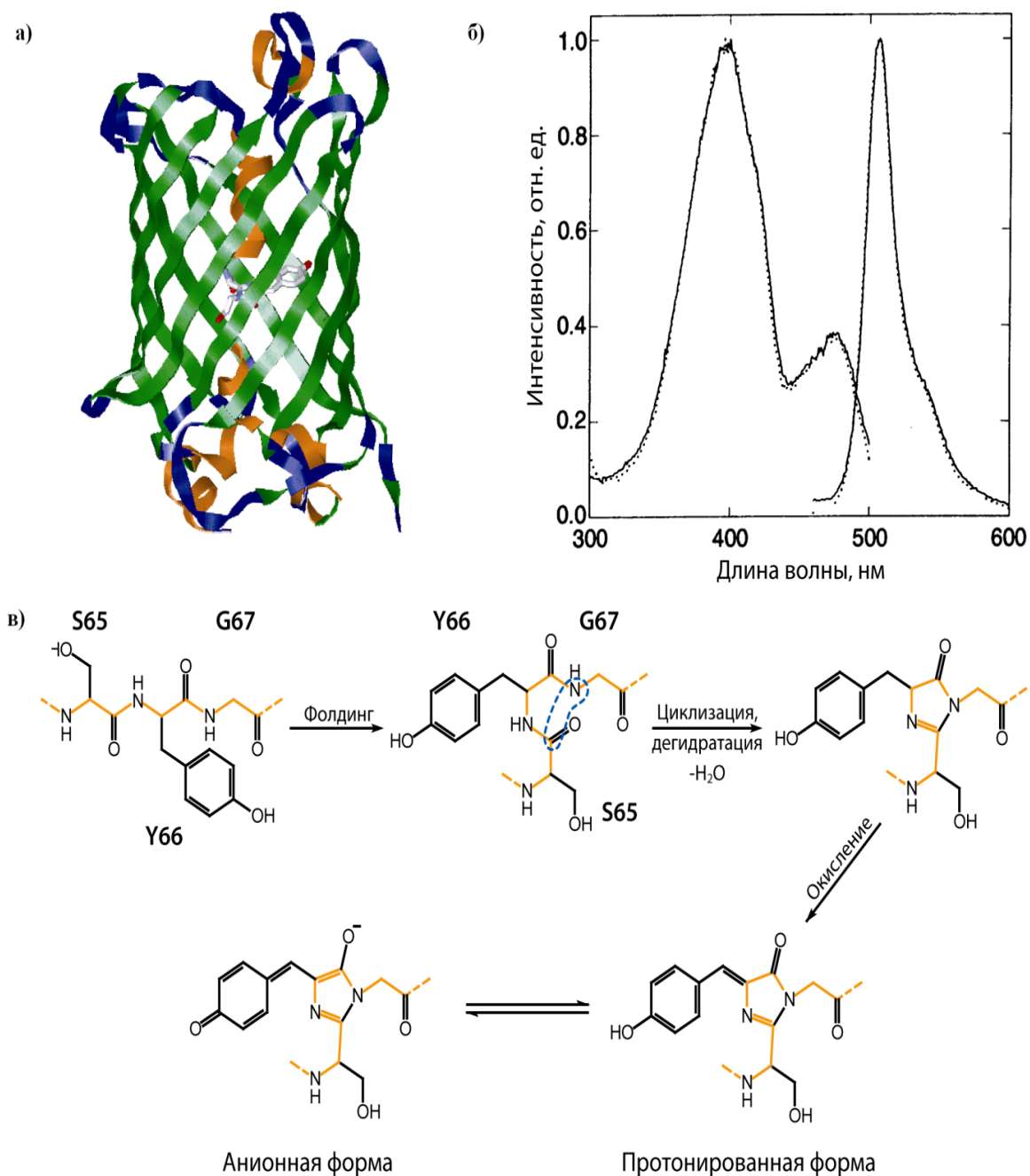


Рисунок 1. Характеристики avGFP.

а) Трёхмерная структура GFP по данным рентгеноструктурного анализа. β -слои показаны зелёным, α -спирали – оранжевым, петли – синим, в хромофоре визуализированы ковалентные связи и атомы. б) Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции GFP [3]. в) Механизм формирования хромофора GFP [15-17]. После сворачивания белка происходит нуклеофильная атака азота остатка глицина 67 на карбонильный атом углерода остатка серина 65 (отмечены синим) и последующая дегидратация с образованием имидазольного кольца. Сформировавшийся хромофор существует в протонированной и анионной формах с максимумами поглощения 395 и 470 нм соответственно.

1.3 Биологическая функция флуоресцентных белков

Несмотря на большой интерес к ФБ с биотехнологической точки зрения и на многочисленные работы, посвященные анализу структуры ФБ, анализу влияния мутаций на ФБ, их биологическая функция остается мало изученной. Было выдвинуто несколько гипотез на основании лабораторных исследований, но ни одна из них не нашла прямых подтверждений в экспериментах *in vivo*, в работе с естественными носителями GFP-подобных белков, такими как кораллы и медузы.

Предполагаемые функции флуоресценции можно сгруппировать в два класса: модуляция либо участие в фотосинтезе и визуальная коммуникация. К первому могут относиться рифообразующие кораллы, в которых часто присутствуют водоросли симбионтов. Было высказано предположение, что наличие ФБ способствует, например, рассеиванию солнечного света, и предохраняет симбионтов от избыточного освещения [18]. Данные о том, что ФБ могут выступать в качестве доноров электронов также указывают на теоретическую возможность их участия в том или ином виде фоторецепции или даже продукции восстановительных эквивалентов [19].

Функцию визуальной коммуникации чаще всего связывают с зеленым флуоресцентным белком в биолюминесцентных организмах, таких как *Aequorea victoria* или *Renilla reniformis* [20, 21]. В этих организмах зелёный ФБ сопряжён с люциферазой и преобразует синюю люминесценцию в зелёный свет посредством резонансного переноса энергии [22, 23], что может также приводить к увеличению общего квантового выхода биолюминесценции. Это обстоятельство побудило к поиску причин, по которым может быть необходимо преобразование синего цвета в зелёный. Интересно, что в прибрежных водах зелёный свет несколько лучше

проникает через воду, и может быть виден на больших расстояниях. Другое возможное объяснение заключается в том, что органы зрения потенциальных хищников более чувствительны к зеленому свету [24, 25].

Несмотря на различные гипотезы о биологической функции флуоресцентных белков, на данный момент остается не до конца ясным, связана ли основная функция ФБ с их флуоресцентными свойствами, или флуоресценция является побочным эффектом других функциональных свойств.

1.4 Применение флуоресцентных белков

В настоящее время GFP и его варианты и гомологи различных цветов используются в различных областях молекулярной и клеточной биологии. ФБ широко распространены как неинвазивные метки для изучения различных биологических моделей от отдельных молекул до клеток и целого организма. Использование ФБ позволяет проследить практически весь путь жизни исследуемого белка: его экспрессию, локализацию, движение, взаимодействие с другими белками и активность в клетке, расположение в ткани или организме. В число основных применений ФБ входят: изучение регуляции активности промотора исследуемого гена, мечение белков, обнаружение белок-белковых взаимодействий, прослеживание движения белков, а также наблюдение за изменением определенных клеточных параметров с помощью флуоресцентных сенсоров на основе ФБ.

Флуоресцентные метки широко используются для наблюдения за активностью промоторов исследуемых генов. Ген, кодирующий ФБ,

помещается под контроль промотора-мишени, благодаря чему за активностью промотора легко следить по изменению флуоресцентного сигнала. Большое число флуоресцентных белков подходит для таких исследований, что делает возможным одновременное наблюдение за несколькими промоторами с использованием 4-5 различных флуоресцентных меток [26].

Флуоресцентные белки позволяют проводить наблюдение за промоторами во времени. ФБ с коротким временем созревания хромофора обеспечивают минимальную задержку между активацией промотора и появлением флуоресцентного сигнала. Более того, существуют так называемые таймерные белки (Timer-FP), которые с течением времени меняют флуоресценцию с голубой на зеленую, а затем на красную. Их использование позволяет получить информацию о продолжительности активности промотора [26]. Также таймеры могут быть использованы для наблюдения за динамикой экспрессии генов в различных тканях [27], для наблюдения за белковым транспортом [28, 29], и для анализа распределения органелл в зависимости от времени их возникновения [30]. Первый такой белок, названный DsRed-E5, был описан в 2000 году [31, 32]. DsRed-E5 производит зеленую флуоресценцию в течение нескольких часов после синтеза, но позже преобразовывается в красную флуоресцентную форму.

Относительно недавно были получены так называемые «расщепленные» («сплит») ФБ. Они синтезируются как две отдельные части одного белка, но способны при слиянии формировать целый функционирующий флуоресцентный белок. Последовательности ДНК, кодирующие эти ФБ, могут быть помещены под контроль двух изучаемых промоторов, и в таком случае сигнал возникает только в случае одновременной активности обоих промоторов [33]. Более того, если в

половинки «сплит» белков внести точечные мутации, приводящие к появлению различий в спектральных характеристиках ФБ, то по результирующему спектру флуоресценции можно выявить определенную комбинацию или соотношение комбинаций промоторов, активных в данной системе.

Флуоресцентные белки нашли широкое применение в качестве меток клеточных компартментов, органелл и отдельных белковых молекул *in vivo*. Для направления ФБ в определённую часть клетки в последовательность белка вводятся соответствующие сигналы, а для исследования локализации и перемещения исследуемых белков создаются химерные молекулы, где С- или N-конец ФБ соединён с белком-мишенью полипептидным линкером в одной рамке считывания. Основной проблемой в таких экспериментах является тенденция большинства GFP-подобных белков к олигомеризации, что может значительно влиять на сохранение активности исследуемого белка и приводить к формированию токсичных агрегатов. В связи с этим при создании химерных белков предпочтение отдаётся мономерным ФБ. Для получения достоверных результатов также необходим нативный фолдинг как флуоресцентного белка, так и белка-мишени, поэтому важным является правильный подбор длины линкера и учёт возможных стерических взаимодействий между частями химерной молекулы [34].

Для детекции белок-белковых взаимодействий в живой клетке широко распространены методы, основанные на эффекте FRET (fluorescence resonance energy transfer) [35]. FRET – это безызлучательный перенос энергии от возбужденного донора-флуорофора к флуорофору-акцептору, который находится вблизи донора (<10 нм) и имеет спектр поглощения, перекрывающийся со спектром излучения донора. Факторами, влияющими на эффективность FRET, являются степень перекрывания спектров

эмиссии донора и поглощения акцептора, расстояние между ними (эффективность переноса зависит от расстояния между донором и акцептором как $1/R^6$), а также относительная ориентация дипольного момента обоих хромофоров. Следовательно, с помощью FRET можно регистрировать любые биохимические сигналы, изменяющие взаимную ориентацию дипольного момента хромофоров или расстояние между ними [36, 37]. FRET может быть детектирован несколькими способами, основанными на изменениях параметров флуоресценции, которые могут быть измерены методами современной флуоресцентной микроскопии [38].

Ряд методов, позволяющий оценить подвижность белковых молекул, основан на явлении фотообесцвечивания (photobleaching). Небольшой участок клетки облучают направленным лучом света высокой интенсивности и наблюдают движение необесцвеченных молекул из соседних участков клетки в обесцвеченный участок (Fluorescence Recovery After Photobleaching, FRAP) [39]. В другом подходе, участок клетки периодически облучают до полного исчезновения в ней флуоресценции (Fluorescence Loss In Photobleaching, FLIP). FLIM является одним из самых надежных методов для количественной оценки эффекта FRET [40, 41]. Изучение флуоресцирующих белковых химер с помощью этих методов позволяет вычислить коэффициент активной диффузии (D_{eff}) и определить мобильную фракцию белка (M_f) [42].

За последние несколько лет значительный прогресс был достигнут в разработке так называемых фотоактивируемых ФБ (ФАФБ). Фотоактивация может происходить различными путями: за счет увеличения квантового выхода флуоресценции или молярного коэффициента поглощения при данной длине волны, а также за счет смещения максимума длины волны возбуждения и/или эмиссии флуоресценции.

Все ФАФБ по механизму фотоактивации чётко делятся на две группы: обратимо и необратимо фотоактивируемые.

Необратимо фотоактивируемые белки изменяют флуоресценцию однократно. Первым таким белком стал мутантный вариант avGFP – RA-GFP [43]. Позже в нашей лаборатории на основе флуоресцентного белка медузы *Aequorea coerulea* был получен PS-CFP [44].

Для обратимо конвертируемых ФАФБ характерна способность к многократному повторению фотоконверсии. Первый белок такого типа – фотоактивируемый хромобелок asFP595 морского анемона *Anemonia sulcata* – был описан в 2000 г. [5]. Облучение этого белка интенсивным зеленым светом переводит его в красное флуоресцентное состояние за счет увеличения квантового выхода флуоресценции более чем в 100 раз. Белок возвращается в исходное состояние за несколько секунд в темноте или под воздействием синего света. Позже был получен мутантный вариант asFP595, названный KFP1 (Kindling Fluorescent Protein – разгорающийся флуоресцентный белок) [45]. KFP1 флуоресцирует в красной области спектра при облучении желтым или зеленым светом (525-580 нм). Кроме обратимо «разжигающихся», существуют и обратимо «гаснущие» ФАФБ, такие как зеленый флуоресцентный белок Dronpa [46], который обратимо фотоконвертируется в нефлуоресцентное состояние при облучении синим светом (белок получил свое название от японского термина для ниндзя «Dron», что означает мгновенное исчезновение тела и RA – от photoactivation). При облучении фиолетовым светом белок Dronpa быстро возвращается в исходное флуоресцентное состояние.

Молекулярный механизм обратимой фотоактивации был детально изучен для ряда таких обратимо активируемых ФАФБ. Было показано, что изменение флуоресцентных свойств связано с *цис-транс*-изомеризацией хромофора белка [47, 48].

ФАФБ активно используются для слежения за подвижностью фотопомеченных клеток, клеточных органелл, исследуемых белков [49].

Настоящий прорыв во флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения произошел за последние несколько лет с использованием фотоактивируемых красителей. Сегодня разрешение достигает 20-50 нм, что существенно превосходит фундаментальный барьер разрешения классической световой микроскопии [48, 50, 51]. За флуоресцентную микроскопию сверхвысокого разрешения, в том числе с использованием ФАФБ, в 2014 году была присуждена Нобелевская премия по химии.

1.5 Проблема олигомеризации флуоресцентных белков

Все ФБ проявляют хотя бы в малой степени склонность к образованию четвертичной структуры. Обнаружена слабая тенденция avGFP и его производных к димеризации при высоких концентрациях. Устойчивая димеризация характерна для ФБ, выделенных из морской фиалки *Renilla* [34]. Облигатными тетрамерами являются природные желтый, оранжевый и красный флуоресцентные белки из коралловых полипов и актиний [7]. По всей вероятности, тетрамерная природа необходима для обеспечения их, пока еще неизвестной, функции в коралловых полипах.

Олигомерное состояние ФБ не оказывает негативного эффекта на мониторинг активности промоторов, но может быть существенной проблемой, если флуоресцентный белок находится в составе химерного белка. Формирование димера и олигомеров более высокого порядка, индуцированные ФБ в составе химеры, может привести к нетипичной локализации, нарушению функций и агрегации химерного белка в

определенных органеллах или цитоплазме. Такой эффект, например, наблюдается, когда партнерами ФБ являются актин, тубулин или гистоны, которые сами обладают повышенной способностью к олигомеризации [34].

Возможный путь решения этой проблемы - получение так называемых «псевдомономерных» флуоресцентных белков, не способных к формированию межмолекулярных димеров и применимых для мечения в составе белков слияния. Два флуоресцентных белка собирают в тандем с помощью линкера, получив мономерную метку в два раза большей молекулярной массы [52] (см. рис.2).

Такой метод был успешно применен в нашей лаборатории для белка Katushka2. Полученная «псевдомономерная» метка была названа tdKatushka2 (тандем-Katushka2) [53]. Яркость флуоресценции (рассчитанная как произведение квантового выхода флуоресценции и молярного коэффициента экстинкции) tdKatushka2 в 1,46 раз больше яркости белка EGFP. При экспрессии в клетках млекопитающих химерных конструкций tdKatushka2 с белками слияния наблюдается правильная локализация.

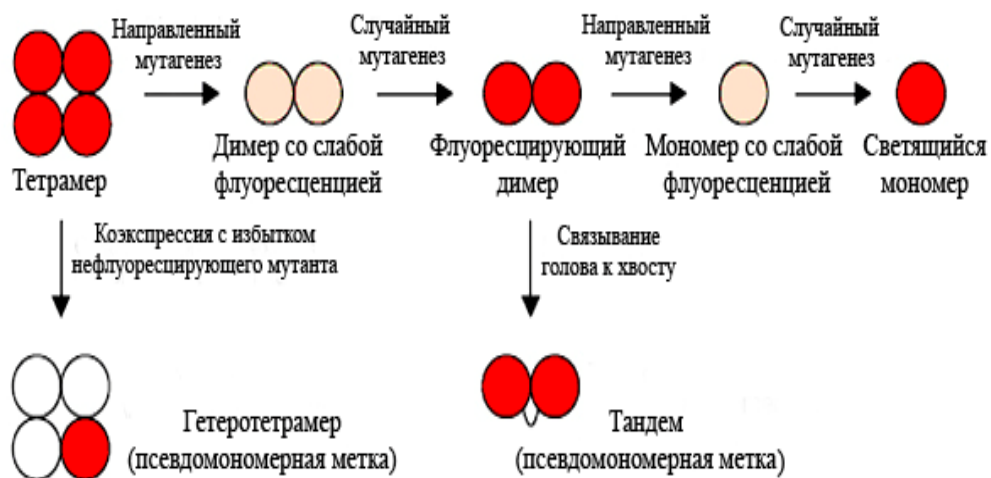


Рисунок 2. Пути преодоления олигомеризации флуоресцентных белков.

Другим любопытным решением является коэкспрессия тетрамерного ФБ с избытком его мутанта, лишённого хромофора, что приводит к образованию гетеротетрамеров, так называемых псевдомономерных меток (см. рис. 2).

Мономерные свойства ФБ определяются структурой экспонированных аминокислотных остатков [54]. Сочетание сайт-специфического и случайного мутагенеза может быть использовано для создания новых, димерных и мономерных вариантов флуоресцентных белков [55].

1.6 Мономерные флуоресцентные белки

Усилиями ряда лабораторий были найдены и разработаны варианты различных мономерных флуоресцентных белков. Ниже мы приводим данные о лучших флуоресцентных белках по спектральным характеристикам (флуоресцирующие в фиолетовой, синей, голубой, зелёной, жёлтой, красной и дальне-красной областях спектра) по состоянию на начало нашей работы (2010 год) (см. рис 3).

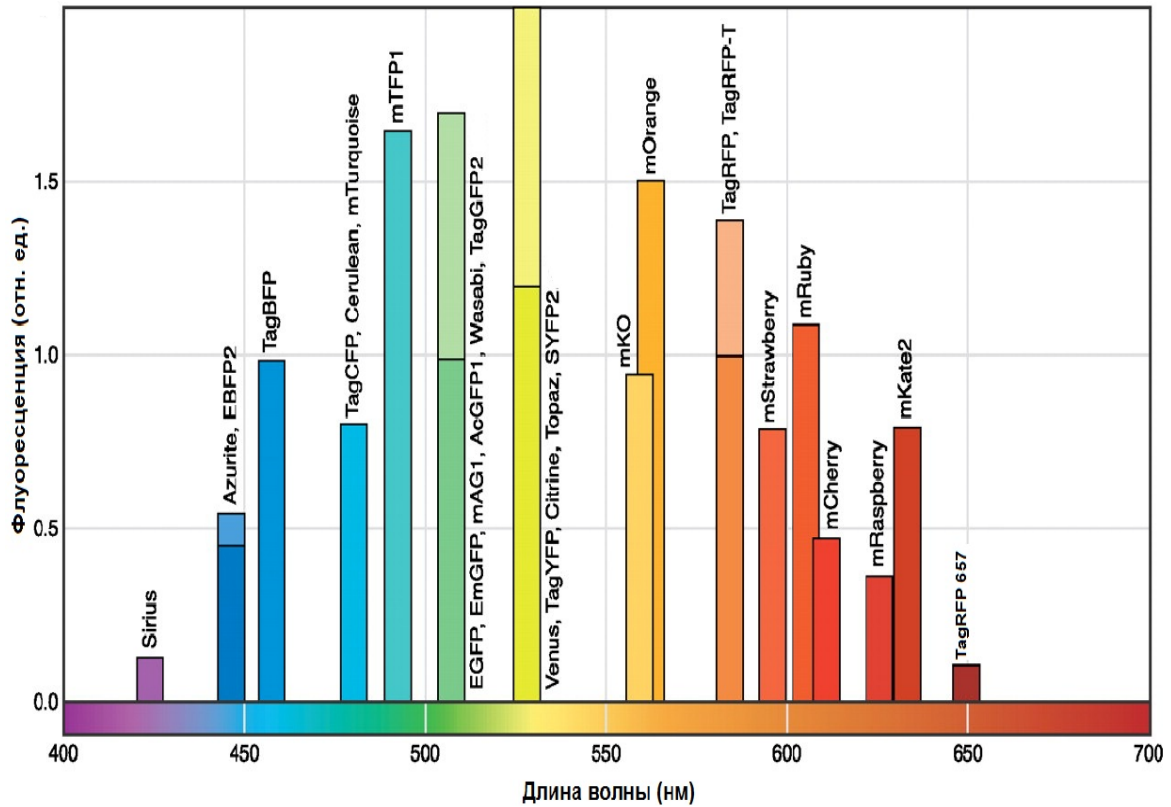


Рисунок 3. Спектральное разнообразие мономерных флуоресцентных белков.

Колонки показывают максимумы эмиссии флуоресценции и относительную яркость флуоресценции данных мономерных белков. Относительная яркость флуоресценции рассчитана как произведение квантового выхода флуоресценции и молярного коэффициента экстинкции (взяты из оригинальных публикаций для каждого белка) и дана в процентах от яркости mEGFP ($\epsilon = 56,000 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$; $QY = 0,22$).

Фиолетовые флуоресцентные белки

Слабая фиолетово-синяя эмиссия флуоресценции характеризует ФБ, несущие замену Tyr66Phe [56, 57]. В 2009 году был опубликован первый «ультрамариновый» белок такого типа, названный Sirius [58]. Флуоресценция данного белка наиболее эффективно возбуждается светом

с длиной волны 355 нм. Максимум эмиссии флуоресценции Sirius приходится на 434 нм, самая коротковолновая эмиссия из всех известных ФБ. Недостатком данного белка является низкая яркость флуоресценции (см. рис. 3) и общая токсичность фиолетового и УФ света, что делает данный белок неудобным для использования в исследованиях *in vivo* [59].

Синие флуоресцентные белки

Долгое время единственным синим ФБ был EBFP [60, 61], мутантный вариант avGFP, несущий замену Tyr66His. На основе EBFP в комбинациях с различными производными GFP были разработаны FRET-пары, позволяющие отслеживать колебания кальция [62-64] и апоптоз [63].

Однако EBFP обладал меньшей яркостью флуоресценции по сравнению с белком-предшественником. На основе EBFP были получены синие ФБ, названные Azurite [65] и EBFP2 [66] (см. рис. 3). Эти белки сохранили мономерные свойства avGFP и хорошо работают в составе химерных конструкций с белками слияния [67, 68]. Следует отметить, что синие ФБ, несущие замену Tyr66His, могут уступать синим белкам, имеющим GFP-подобный хромофор. Таким синим мономерным ФБ является TagBFP [69, 70], яркость флуоресценции которого почти в 2 раза превосходит яркость EBFP2 (см. рис. 3). Максимум эмиссии флуоресценции TagBFP приходится на 457 нм, максимум возбуждения флуоресценции - на 402 нм. Благодаря своим спектральным характеристикам, данный ФБ легко отличить от зеленых и циановых белков.

В 2011 году была опубликована улучшенная версия белка TagBFP-белок TagBFP2 [71]. При экспрессии в живых клетках TagBFP2 в 1.2 раза ярче белка-предшественника. Полученный белок обладает большей

скоростью созревания и лучшей фотостабильностью по сравнению с TagBFP.

В целом, синие ФБ, разработанные на сегодняшний день, могут быть широко применены для мультицветового мечения и при разработке биосенсоров на основе FRET.

Голубые флуоресцентные белки

Первый флуоресцентный белок, обладающий эмиссией в голубой части спектра, был обнаружен одновременно с BFP во время мутагенеза хромофора GFP [61, 72]. Единственная мутация Tug66Trp привела к получению белка, обладающего максимумом эмиссии при 485 нм. После внесения ряда замен (Phe64Leu – увеличивает скорость созревания, Ser65Thr) был получен белок, названный ECFP [73]. Успешным применением ECFP можно считать создание биосенсоров на основе FRET-пары ECFP и желтого ФБ. Недостатком данного белка является низкая яркость флуоресценции (40% от яркости EGFP). Направленная эволюция ECFP привела к появлению ряда циановых флуоресцентных белков с улучшенными характеристиками, таких как Cerulean [74], SCFPs [75], TagCFP (Evrogen), и mTurquoise [76], характеризующихся увеличением яркости флуоресценции и/или скоростью созревания. Подобно синим ФБ, палитра голубых белков была обогащена мономерным белком, обладающим GFP-подобным хромофором. Этот белок, названный mTFP1 [77, 78], является мономерным вариантом тетрамерного белка cFP484, полученного из кораллов *Clavularia sp.* Яркость флуоресценции белка mTFP1 превосходит в несколько раз яркость других голубых мономерных белков (см. рис. 3). Этот белок обладает высокой рН- и фотостабильностью,

а также высокой скоростью созревания. Однако, максимум эмиссии флуоресценции (492 нм) белка mTFP1 близок к зеленым ФБ. На практике это усложняет его спектральное разделение с желтыми ФБ.

Зеленые флуоресцентные белки

На сегодняшний день доступно большое количество зеленых мономерных белков. avGFP не является оптимальным белком для большинства практических применений, так как он обладает двумя пиками поглощения. Замена в хромофоре в 65 положении серина на треонин привела к получению зеленого белка, обладающего одним пиком поглощения (484 нм). Данный белок получил название EGFP (Enhanced GFP) [60, 79]. На основе данного белка был получен вариант, сохраняющий мономерные свойства даже при высоких концентрациях- mEGFP, несущий замену Ala206Lys [80]. Среди лучших зеленых мономерных белков стоит также отметить Emerald (EmGFP) [81]. Кроме замены Ser65Thr содержит еще 4 точечные мутации, которые улучшили скорость созревания данного белка и увеличили яркость флуоресценции. Недостатком Emerald является низкая фотостабильность в клетках млекопитающих.

Зеленый мономерный ФБ AcGFP был получен в ходе случайного ПЦР-мутагенеза бесцветного белка, выделенного из *Aequorea coerulea* [82]. Замена глутаминовой кислоты на глицин в 222 аминокислотном остатке превратила бесцветный белок дикого типа в высоко люминесцентный белок, обладающий максимумом поглощения при 480 нм и максимумом эмиссии флуоресценции при 505 нм. Яркость флуоресценции AcGFP сопоставима с яркостью EGFP (см. рис. 3).

На основе флуоресцентного белка из коралла *Galaxeidae* был создан Azami-Green (AG) [83]. Аминокислотная последовательность Azami-Green всего лишь на 6% гомологична аминокислотной последовательности EGFP. Мономерный вариант Azami-Green -mAG1 [84] (максимумы возбуждения/эмиссии флуоресценции 492/505 нм соответственно), обладает высоким квантовым выходом флуоресценции.

mWasabi [85] (максимумом эмиссии флуоресценции при 509 нм) - мономерный зеленый флуоресцентный белок, полученный на основе белка mTFP1. Яркость флуоресценции белка mWasabi в 2 раза больше яркости EGFP. При этом mWasabi обладает сходной с EGFP pH- стабильностью и фотостабильность.

Среди зеленых мономерных ФБ следует отметить разработанный в нашей лаборатории белок TagGFP2 [86] (максимумы возбуждения / эмиссии 483 и 506 нм, соответственно), обладающий высокой pH-стабильностью и высокой скоростью созревания. Данный белок обладает сходными спектральными характеристиками с EGFP.

Желтые флуоресцентные белки

Кристаллографический анализ зеленого ФБ показал, что 203 аминокислотный остаток (Thr203) расположен вблизи хромофора и потенциально способен влиять на спектральные характеристики [11]. Замена триптофана на тирозин (Thr203Tyr) привела к получению белка с батохромным сдвигом максимума эмиссии флуоресценции. Один из первых опубликованных желтых ФБ EYFP [11], несущий замену Gln69Lys, обладает низкой pH-стабильностью, обладает чувствительностью к ионам хлора и значительно уступает по фотостабильности зеленым мономерным белкам.

Стратегия направленного мутагенеза, которая привела к оптимизированию мономерных вариантов ECFP, также относилась и к EYFP. Работа была направлена на увеличение яркости флуоресценции белка и на увеличение скорости созревания белка. Эти усилия привели к получению белка, который был назван "супер" желтым флуоресцентным белком - SYFP, который значительно ярче белка предшественника как в бактериях, так и в клетках млекопитающих. Улучшенный вариант SYFP - SYFP2 в 12 раз ярче EYFP при экспрессии в бактериальных клетках. При экспрессии в клетках млекопитающих улучшения оказались менее явными. Тем не менее, SYFP2 в полтора раза ярче EYFP при экспрессии в клетках линии HeLa [87].

Дальнейшие исследования желтых ФБ показали, что замена Gln69Met существенно улучшает pH-стабильность и снижает чувствительность белка к ионам хлора. Данный вариант, получивший название Citrine [88], на 75% ярче EGFP, хотя менее фотостабилен. Максимум эмиссии флуоресценции Citrine приходится на 529 нм, максимум возбуждения флуоресценции - на 516 нм. Следует отметить, что Citrine хорошо экспрессируется в клетках млекопитающих.

В 2002 году был описан желтый белок Venus [89, 90], несущий замену Phe46Leu. Эта замена, которая была получена в ходе случайного ПЦР-мутагеназа, значительно ускоряет окисление хромофора. Для увеличения pH-стабильности были внесены дополнительные мутации. Максимумы возбуждения и эмиссии флуоресценции (515 нм и 528 нм, соответственно) Venus сдвинуты в более длинноволновую часть спектра по сравнению с EYFP, но уровень яркости флуоресценции данных белков сопоставим. Однако по фотостабильности Venus значительно уступает EYFP.

Вариант avGFP, флуоресцирующий в жёлтой области спектра, белок YPet обладает высокой яркостью флуоресценции (в 2,5 раза ярче EGFP) [91].

Среди желтых мономерных ФБ следует также отметить белок Тораз [73](Ser65Gly, Ser72Ala, Lys79Arg, Thr203Tyr), яркость флуоресценции которого в полтора раза превосходит яркость белка EGFP, и белок TagYFP [92]. Максимум эмиссии флуоресценции TagYFP приходится на 524 нм. Данный ФБ обладает высокой фото- и рН-стабильностью. Желтые мономерные белки активно используются в многоцветном мечении вместе с синими, циановыми, зелеными и красными ФБ.

Оранжевые флуоресцентные белки

Список оранжевых мономерных белков намного скромнее по сравнению с количеством мономерных ФБ, флуоресцирующих в коротковолновой части спектра. Оранжевый флуоресцентный белок КО из *Fungia concinna* был мономеризован после введения около 20 аминокислотных замен. Его мономерная версия mKO [93] (monomeric Kusabira Orange) была использована в качестве FRET-партнёра голубого флуоресцентного белка из *Acropora* sp. Благодаря высокому коэффициенту экстинкции белок mKO может быть превосходным акцептором во FRET-парах с голубыми ФБ. Недостатком mKO является низкая рН-стабильность. Другой оранжевый ФБ, mOrange [94], обладает большей яркостью флуоресценции по сравнению с mKO, но является менее фотостабильным (см. рис. 3).

Были получены улучшенные версии обоих белков. Однако, более высокая скорость созревания mKO2 сопровождается более низкой рН-стабильностью [95], а более фотостабильный mOrange2 обладает более низкой скоростью созревания по сравнению с белком-предшественником [96].

В целом, тем не менее, данные мономерные белки обладают сбалансированными характеристиками и могут быть использованы для мечения белков слияния.

Красные флуоресцентные белки

Прорыв в области получения красных ФБ произошел с открытием белка DsRed. DsRed (drFP583) является оранжево-красным белком, выделенным из *Discosoma* sp. Максимум возбуждения флуоресценции DsRed приходится на 558 нм, максимум эмиссии - на 583 нм [97]. Пространственная структура мономера DsRed очень близка к таковой для GFP. DsRed - это β -бочка из 11 β -слоев с центральной α -спиралью, несущей хромофор и заполняющей торцы цилиндра (см. рис.4) [98, 99].

Особенностью DsRed является более сложный, чем у GFP, процесс формирования хромофорной группы. На первом этапе созревания DsRed происходит образование протонированного GFP-подобного «зеленого» хромофора. Далее возможны два пути модификаций этой структуры [55]. В первом случае происходит необратимое образование анионной формы хромофора с эмиссией в зелёной области спектра. Во втором - формирование, благодаря дополнительной реакции окисления, двойной связи между α -атомом углерода и амидным азотом остатка Gln65, что приводит к возникновению «зрелого» хромофора с эмиссией в красной области спектра из-за расширения системы сопряжённых двойных связей. Химический синтез аналогов хромофора DsRed подтвердил, что добавление дополнительной двойной связи, сопряженной с GFP-подобным хромофором, приводит к значительному сдвигу спектра поглощения в длинноволновую область [100] [101]. Недостатком этого белка является

облигатная олигомеризация, характерная для всех FP из кораллов Anthozoa.

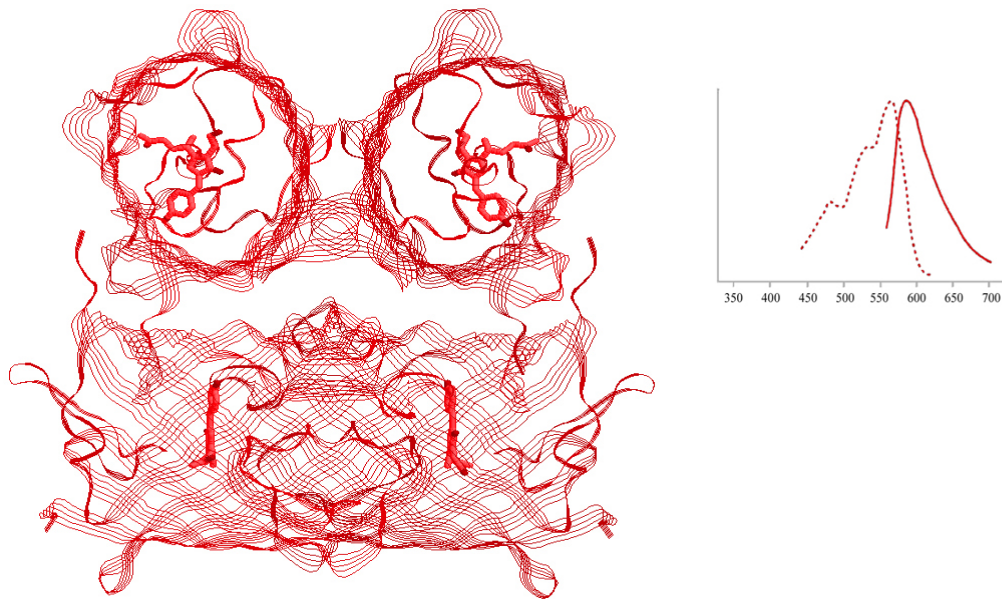


Рисунок 4. Трехмерная структура тетрамера белка DsRed и спектр возбуждения/эмиссии его флуоресценции.

Каждая из четырех β -бочек в тетрамере DsRed заметно «сплющена» с боков. Справа показаны спектры возбуждения (пунктир) и эмиссии (сплошная) флуоресценции для дикого типа DsRed.

Создание белков DsRed2 и DsRed-Express [102] с уменьшенной тенденцией к агрегации позволило преодолеть часть ограничений в применении DsRed для мониторинга активности промоторов и мечения целых клеток, в то время как попытки решения проблемы облигатной олигомеризации, не позволяющей метить индивидуальные молекулы и создавать эффективные FRET-пары, потребовали значительных усилий. Позже были получены довольно яркие и минимально токсичные для клеток варианты DsRed Express2 и DsRed -Max (на 30 % ярче DsRed Express2, но медленнее созревает и менее фотостабильный) [103].

В общей сложности потребовалось внести 33 аминокислотные замены в последовательность DsRed, чтобы получить первый мономерный красный флуоресцентный белок. Этот белок получил название mRFP1 [104]. Скорость созревания белка mRFP1 намного превосходит скорость созревания DsRed. Однако яркость флуоресценции полученного белка сильно уступает яркости белка-предшественника. К тому же mRFP1 обладает очень низкой фотостабильностью, что ограничивает практическое применение данного белка.

На основе mRFP1 путем сайт-направленного мутагенеза 66-ого и 67-ого аминокислотных остатков, формирующих хромофор, и случайного ПЦР-мутагенеза, был получен ряд красных мономерных ФБ с улучшенными характеристиками. Полученные флуоресцентные белки, обладающие максимумами эмиссии флуоресценции в диапазоне от 560 до 630 нм, были названы в честь фруктов, имеющих цвета, сходные с цветом белков: mStrawberry, mCherry, mRaspberry [105] [106] [107] (максимумы эмиссии флуоресценции приходятся на 596 нм, 610 нм и 625 нм, соответственно). Уровень яркости флуоресценции mCherry составляет 50% от яркости EGFP и уступает по яркости mStrawberry и mRaspberry. Но mCherry намного фотостабильнее, чем mStrawberry и mRaspberry, и сегодня является одним из самых используемых для практических целей красных мономерных белков.

На основе mRFP1 был также получен фотоактивируемый белок PA-mRFP1 [108], показывающий 70-кратное увеличение красной флуоресценции с (максимумы возбуждения и эмиссии флуоресценции при 578 нм и 605 нм, соответственно) после активации светом с длиной волны 380-400 нм. Недостатком данного белка является относительно низкая яркость флуоресценции и неспецифическая локализация в составе химерных конструкций с белками слияния.

Следует отметить, что проделанная работа по мономеризации DsRed значительно упростила эту процедуру, позволяя создавать мономерные версии гомологичных белков по аналогии с DsRed.

Природный красный флуоресцентный белок был также получен из морского анемона *E. quadricolor*. Этот белок обладает максимумом эмиссии флуоресценции при 611 нм и получил название eqFP611 [109]. Яркость флуоресценции данного белка сопоставима с яркостью EGFP. Несколько лет назад описан мономерный вариант красного флуоресцентного белка eqFP611, mRuby [110], который содержит 29 аминокислотных замен относительно белка-предшественника. Максимумы возбуждением и эмиссии флуоресценции приходятся на 558 нм и 605 нм, соответственно. Таким образом, mRuby объединяет красную флуоресценцию и большой сдвиг Стокса (47 нм). Данный белок обладает высокой рН-стабильностью (кажущееся значение $pK_a=4,4$). mRuby выигрывает по яркости флуоресценции, но проигрывает по фотостабильности белку mCherry. В химерных конструкциях с белками слияния mRuby демонстрирует правильную локализацию.

В нашей лаборатории была клонирована кДНК красного белка eqFP578 из актинии *Entactmaea quadricolor*. Недостатком данного белка являлась низкая скорость созревания. На основе eqFP578 был получен белок TurboRFP- яркий димерный белок, обладающий высокой скоростью созревания и высокой фотостабильностью. TurboRFP удалось мономеризовать почти без потери яркости флуоресценции путём внесения ряда мутаций в гидрофобный и гидрофильный интерфейсы [111]. Конечный вариант, TagRFP (от английского Tag - ярлык, бирка, и Red Fluorescent Protein - красный флуоресцентный белок) представляет собой яркий мономерный белок с высокой рН-стабильностью. Максимумы возбуждения и эмиссии флуоресценции TagRFP приходятся на 555 нм и 584

нм, соответственно. Молярный коэффициент экстинкции белка TagRFP при 556 нм составляет $100\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, а квантовый выход флуоресценции равен 0.48 (расчетная яркость в 2.2 раза превышает таковую красного мономерного белка mCherry). Высокий коэффициент молярной экстинкции TagRFP позволяет использовать его в качестве эффективного акцептора FRET для флуоресцентных белков с более коротковолновой эмиссией. В частности, с использованием FRET-пары TagGFP-TagRFP в нашей лаборатории был создан высококонтрастный внутриклеточный биосенсор для детекции активности каспазы-3 – ключевого фермента апоптотического каскада [92].

Позже был получен почти в 10 раз более фотостабильный (в определенных условиях) вариант TagRFP-T (S158T) [96, 112]. TagRFP-T фотостабильнее mCherry и превосходит белок mCherry по яркости флуоресценции. TagRFP-T обладает сходными с TagRFP спектральными характеристиками, квантовым выходом флуоресценции и скоростью созревания. Однако данный белок обладает более низким молярным коэффициентом экстинкции по сравнению с TagRFP ($81,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ против $98,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$). Так как замена S158T является внутренним, полученный белок сохранил мономерные свойства белка-предшественника.

В нашей лаборатории на основе оранжево-красного димерного флуоресцентного белка eqFP578 (спектральные максимумы $\lambda_{ex} = 552\text{ нм}$, $\lambda_{em} = 578\text{ нм}$) [113] был также создан дальне-красный флуоресцентный белок, названный Katushka (спектральные максимумы $\lambda_{ex} = 588\text{ нм}$, $\lambda_{em} = 635\text{ нм}$) [114]. Было показано, что яркость флуоресценции белка Katushka в 7-10 раз превышает яркость флуоресценции спектрально близких белков HcRed и mPlum. Этот белок характеризуется быстрым созреванием (время полусозревания составляет 20 мин), высокой pH-стабильностью (кажущееся значение $pK_a = 5,5$) и фотостабильностью. На основе белка

Katushka был разработан мономерный вариант, названный mKate (от monomeric и Katushka) [115]. По данным флуорометрии, белки Katushka и mKate обладают практически идентичными спектрами возбуждения и эмиссии флуоресценции. Максимум возбуждения флуоресценции mKate приходится на 588 нм, максимум эмиссии флуоресценции – на 635 нм. Спектр поглощения mKate характеризуется единственным пиком, максимум которого совпадает с максимумом возбуждения флуоресценции, что говорит об отсутствии альтернативных либо промежуточных форм созревания хромофора в зрелом белке. При pH 7.5 квантовый выход флуоресценции mKate составляет 0.28, молярный коэффициент экстинкции при 588 нм составляет $31\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$. Однако, по pH-стабильности флуоресценция mKate заметно уступает TagRFP. Белок mKate сохраняет высокую яркость, фотостабильность и является хорошей флуоресцентной меткой в дальне-красной области спектра. Кристаллографические исследования выявили три ключевых аминокислотных остатка: Ser143, Leu174, и Arg197, находящиеся вблизи хромофора, являющиеся ответственным за дальне-красное смещение спектра эмиссии флуоресценции. Группа аминокислотных остатков Val93, Arg122, Glu155, Arg157, Asp159, His169, Ile171, Asn173, Val192, Tyr194, и Val216 наиболее вероятно отвечает за мономерное состояние белка в растворе [115].

Была получена новая улучшенная версия белка mKate, названная mKate2 [53]. Максимумы возбуждения и эмиссии флуоресценции mKate2 близки к белку mKate и приходятся на 588 и 633 нм, соответственно. Однако, по сравнению с mKate, коэффициент молярной экстинкции при 588 нм при pH 7.5 был увеличен практически в 2 раза и составил $62\,500\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, а квантовый выход флуоресценции был увеличен в 1.4 раза и составил 0.4. Белок mKate2 обладает более высокой фотостабильностью, по сравнению с

другими мономерными дальне-красными ФБ. Время полусозревания mKate2 составляет менее 20 мин, что делает его самым быстро созревающим мономерным красным флуоресцентным белком (для сравнения, время полусозревания составляет 40 мин для mCherry, 75 мин для mKate и 100 мин для TagRFP). Было получено 20 слитных химерных конструкций, содержащих кодирующие последовательности mKate2 и различных клеточных белков, а также сигналов внутриклеточной локализации. Для большинства белков наблюдалась правильная локализация и функциональность. Однако, в случае ряда чувствительных клеточных белков химерные молекулы с mKate2 имеют нарушенную локализацию. Свойства белка mKate2 сочетают высокую яркость и фотостабильность флуоресценции; в настоящее время mKate2 - вероятно, предпочтительный дальне-красный ФБ для большинства применений.

Недавно был описан дальне-красный мономерный ФБ TagRFP657 [116, 117], разработанный на основе белка mKate. TagRFP657 обладает максимумом возбуждения флуоресценции при 611 нм и максимумом эмиссии флуоресценции при 657 нм (см. рис. 3). Теоретически, такое длинноволновое возбуждение помогает проникнуть глубже в биологические ткани, вызывая меньший аутофлуоресцентной фон, и уменьшить фототоксичность. Однако недостатками TagRFP657 являются низкая яркость флуоресценции (14% от яркости белка mKate2) и низкая скорость созревания (время полусозревания при 37°C составляет 125 мин, для белка mKate2 этот показатель составляет менее 20 мин).

1.7 Заключение

Таким образом, сегодня палитра мономерных флуоресцентных белков позволяет проводить эксперименты по многоцветовому мечению, что открывает новые возможности для отображения сложных структур и процессов в живых системах (см. рис. 5)

В красной области спектра лучшими образцами являются белки mCherry, TagRFP и mKate2. Эти белки хорошо работают в составе единых химерных конструкций с большинством исследуемых белков. Однако в случае ряда чувствительных клеточных белков химерные молекулы с mCherry, TagRFP и mKate2 имеют нарушенную локализацию и функцию, в то время как аналогичные конструкции с использованием природных зеленых мономеров (таких как EGFP) хорошо проявляют себя в работе.

Эти проблемы объясняются остаточной слабой димеризацией красных флуоресцентных белков, которую можно детектировать *in vitro*, например, методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC), а также склонностью этих белков к неспецифическим взаимодействиям и агрегации в составе химерных конструкций при мечении белков слияния в живых клетках.

Таким образом, по-прежнему актуальной задачей является получение красных и дальне-красных ФБ, оптимальных для мечения клеточных белков. Такие белки должны сохранять мономерные свойства даже при высоких концентрациях (более 1 мг/мл), не должны быть склонными к неспецифическим взаимодействиям в живых клетках, не должны проявлять цитотоксических свойств, и при этом должны отличаться высокой яркостью, рН- и фотостабильностью, и достаточно высокой скоростью созревания хромофора.

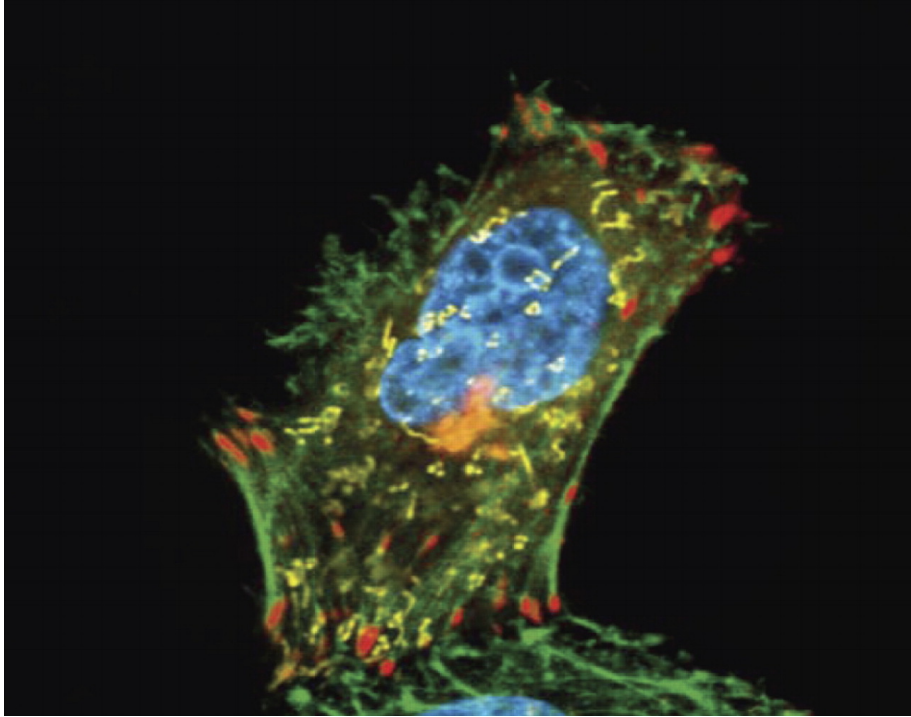


Рисунок 5. Многоцветное мечение, клетки линии HeLa.

Конфокальная микроскопия. TagBFP-H2B(синий флуоресцентный сигнал), TagGFP-2-actin(зеленый флуоресцентный сигнал), phiYFP-mito (желтый флуоресцентный сигнал), TagRFP-golgi (оранжевый флуоресцентный сигнал), mKate2-zyxin (красный флуоресцентный сигнал).

2. Материалы и методы

2.1 Оборудование и реактивы

2.1.1 Оборудование

В экспериментальной части работы использовалось следующее оборудование: автоматические пипетки (Gilson); настольная микроцентрифуга (Biosan); настольная центрифуга (Eppendorf 5415R); вортекс Model CV1500; холодильники (Indesit); кельвинатор; термостат Термит (ДНК-Технология); шейкер Shaker S3 (ELMI), Mini Rotator (Glas Col); лабораторный pH-метр PB-11 (Sartorius), источники питания постоянного тока: Macrodrive 15 (LKB), PS500X (HSI), EPS250 (CBS), EPS500/400 (Pharmacia); оборудование для горизонтального гель-электрофореза: GNA-200, Hoefer HE33 (Pharmacia), Minicell EC370M (E-C Apparatus Corp.); весы Chya JP2-300 (Anselma-Industrie); УФ-трансиллюминатор TF-20M; анализатор изображения Alpha Imager 2000 (Alpha Innotech Inc.); амплификатор PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research); электропоратор MicroPulser (BioRad); автоматический секвенатор Applied Biosystems DNA Analyser 3730xl; прибор для разрушения мембран ультразвуком Sonic Dismembrator (Fisher Scientific); CO₂ инкубатор; культуральный ламинарный шкаф (FluFrance); флуоресцентный бинокуляр SZX-12 (Olympus), цифровая CCD фотокамера DP-50 (Olympus), лазерный сканирующий конфокальный микроскоп TCS SP2 (Leica Microsystems AG), оптический флуоресцентный микроскоп DMI 6000 B (Leica Microsystems AG); спектрофотометр Beckman DU520 UV/VIS.

2.1.2 Реактивы

В работе использовались следующие реактивы с квалификацией хч и осч: этанол; изопропиловый спирт; уксусная кислота; медицинский хлороформ; фенол; $MnSO_4$; $NaCl$; KCl ; $NaOH$, Na_2HPO_4 ; NaH_2PO_4 ; $MgCl_2$; соляная кислота; перхлорат аммония; ацетат калия; ацетат натрия; ИПТГ (изопропил-1-тио- β -D-галактозид); динатриевая соль этилендиамина тетрауксусной кислоты (ЭДТА); канамицин; ампициллин; бычий сывороточный альбумин (SibEnzyme, NEB); трис-гидроксиметиламинометан (Tris); бромистый этидий; бакто-агар; бакто-триптон, дрожжевой экстракт (Difco), агароза; деионизованная вода mQ.

Использовались следующие ферменты с соответствующими буферами: Taq polymerase (Evrogen), смесь термостабильных ДНК-полимераз Encyclo polymerase (Evrogen); эндонуклеазы рестрикции: BamHI, HindIII, AsiGI (изошизомер AgeI), CciNI (изошизомер NotI), а также BglIII (SibEnzyme), и соответствующие буферы; высокоактивная ДНК-лигаза фага T4 (SibEnzyme, Promega). Использовались векторы pQE-30 (Qiagen), pTurboGFP-N, pTurboGFP-C, pTagGFP-tubulin, pTagGFP-actin (Evrogen).

В работе использовались следующие наборы реактивов: набор реактивов для очистки ДНК на колонках (Qiagen, Евrogen); набор для случайного ПЦР-мутагенеза Diversity PCR Random Mutagenesis kit (Clontech); маркер для электрофореза нуклеиновых кислот 1 kB ladder (SibEnzyme).

В работе использовался трансфицирующий реагент FuGene6 (Roche). Для поддержания клеток млекопитающих использовалась среда DMEM, эмбриональная бычья сыворотка, раствор Трипсин-ЭДТА.

2.1.3 Буферные растворы

В ходе работы использовались следующие буферные растворы:

Буфер ТАЕ (50 мМ Трис-ацетат (pH 8.0); 20 мМ ацетат натрия; 2 мМ EDTA);

Буфер для нанесения ДНК для агарозного электрофореза (ксиленцианол 0.1%; бромфеноловый синий 0.1%; SDS 0.5%; EDTA 1М pH 8; глицерол 50%);

Буфер для выделения белка

20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 100 мМ NaCl

Буфер для ренатурации белка

50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 35 мМ KCl, 2мМ MgCl₂ , 1мМ DTT

2.1.4 Микробиологические среды

Среда SOB.

2% триптон, 0.55% дрожжевой экстракт; 0,01 мМ TrisHCl pH 8,0; 10 мМ NaCl; 10 мМ KCl; 20 мМ Mg²⁺ (в виде MgCl₂ и MgSO₄).

Среда автоклавировалась 30 мин при 1 атм. и хранилась при температуре -20°C.

Среда LB.

1% триптон; 0,5% дрожжевой экстракт; 0,1% NaCl; 0,01 мМ Трис-НCl pH 8.0.

Среда автоклавировалась 30 мин при 1 атм. и хранилась при комнатной температуре. Для селекции клеток, содержащих плазмиду, в среду добавлялся ампициллин до концентрации 50 мкг/мл или канамицин

до концентрации 5 мкг/мл. Для изготовления агаризованной среды LB перед автоклавированием в среду дополнительно добавлялся агар (Difco) до концентрации 1,5%.

2.1.5 Бактериальные штаммы и клеточные линии

Для трансформации и экспрессии кодирующих последовательностей рекомбинантных плазмид использовались *E. coli* штамма XL1 Blue. Для проведения трансфекций использовалась клеточная линия HeLa.

2.2 Методы исследования и анализа результатов

2.2.1 Амплификация фрагментов ДНК

Для клонирования и тестирования полученных конструкций применяли метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Реакционная смесь состояла из праймеров (0.2 мкМ каждого), эквимольной смеси dNTP (0.5 мкМ), смеси термостабильных ДНК-полимераз Encyclo polymerase (Evrogen) и соответствующего буфера (Encyclo buffer), матричной ДНК (10-50 нг) и бидистиллированной воды mQ. Амплификацию проводили в программируемом термостате PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research). Для амплификации использовали следующую программу:

- 1) денатурация матричной ДНК: 96°C - 20 сек;
- 2) отжиг праймеров: (температура зависит от нуклеотидного состава, рассчитывалась по формуле $G/C*4+A/T*2$) - 20 сек;

3) элонгация: 72°C – (время зависит от длины получаемого фрагмента из расчета 1 мин на 1000 пар оснований).

Оценку количества ПЦР-продукта количества проводили с помощью электрофореза в агарозном геле.

2.2.2. Случайный (Random) мутагенез

PCR-мутагенез проводили в условиях, оптимальных для возникновения 7 мутаций на 1000 пар оснований. Реакционная смесь состояла из концевых праймеров (по 0.2 мкМ каждого), смеси dNTP (0,2 мМ dGTP, 0,2 мМ dATP, 1 мМ dCTP, 1 мМ dTTP), 0,64 мМ MnSO₄, термостабильной Tag-полимеразы (Evrogen) и соответствующего буфера (PC2-buffer) , матричной ДНК (≈1 нг) и бидистиллированной воды mQ. Дополнительно в пробу общим объемом 50 мкл вносили 3 мкл 2 мМ раствора dGTP. Амплификацию проводили в программируемом термостате PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research). Для амплификации использовали следующую программу:

- 1) денатурация матричной ДНК: 96°C - 20 сек;
- 2) отжиг праймеров: - 20 сек;
- 3) элонгация: 72°C – 1мин.

Проводили 23 цикла. Продукты PCR-мутагенеза анализировали методом горизонтального гель-электрофореза.

2.2.3. Сайт-специфический мутагенез

Для сайт-специфического мутагенеза использовали метод ПЦР с перекрывающимися праймерами ("overlap extention"). Этот метод позволяет целенаправленно получать точечные мутации.

Проводили ПЦР с использованием праймеров, содержащих необходимые точечные замены, то есть не полностью комплементарных ДНК-матрице.

При проведении "overlap extention" в реакционную смесь не добавляли праймеры, температуру отжига выбирали наименьшей из таковых для двух перекрывающихся участков, время отжига увеличивали до 1 мин, а время элонгации - до 3 мин. После 5 циклов «overlap extention» в реакционную смесь добавляли концевые праймеры. В качестве матрицы выступали уже присутствующие в реакционной смеси фрагменты. Проводили еще 9-10 циклов ПЦР с температурой отжига концевых праймеров и стандартным временем отжига 20 сек.

2.2.4. Трансформация клеток *E. Coli*

Для проведения электрической трансформации использовали кюветы BioRad и электропоратор MicroPulser. К компетентным клеткам *E. coli* (штамм XL1- Blue) добавляли несколько мкл лигата, очищенного переосаждением. После электропорации к клеткам сразу же добавляли 0,5 мл стерильной среды SOB и инкубировали пробы в течение часа при 37°C. После этого 70 мкл суспензии наносили на чашки Петри с твердой селективной средой и инкубировали при 37°C в течение ночи.

Для химической трансформации использовали "кальциевые" компетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue. К 40 мкл клеток добавляли 0,01-0,1 мкг лигата или плазмидной ДНК. Клетки инкубировали с ДНК на льду в течение 20 мин, затем 2 мин при 42°C. После теплового шока клетки снова помещали на лед на 1 мин, после чего к ним добавляли 200 мкл стерильной среды SOB. Суспензию инкубировали при 37°C в течение одного часа. После инкубации наносили по 100 мкл суспензии на чашки Петри с твердой селективной средой- ампициллином (50 мкг/мл) или канамицином (5 мкг/мл) и инкубировали при 37°C в течение ночи.

2.2.5. Выделение плазмидной ДНК

Клетки *E. coli*, содержащие рекомбинантные плазмиды, в небольшом количестве вносили в 5 мл жидкой среды LB с антибиотиком (в зависимости от типа селекции). Клетки инкубировали в течение 14-18 часов при температуре 37°C и интенсивном перемешивании. Плазмидную ДНК выделяли на колонках фирмы Qiagen или Евроген по протоколу фирмы-производителя.

2.2.6. Переосаждение ДНК

Переосаждение ДНК использовали для концентрирования растворов ДНК после очистки и для перевода ДНК в другой буфер. К раствору ДНК добавляли 1/10 часть объема 3 М CH_3COONa и 3 объема 95 % $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Пробы перемешивали и центрифугировали в течение 10 мин при 13400 об/мин (около 12000 g) в настольной центрифуге. Удаляли супернатант, осадок

промывали 80 % C₂H₅ОН. Удаляли супернатант, осадок высушивали от спирта при 37°C и растворяли в необходимом объеме mQ.

Для контроля чистоты и оценки количества ДНК проводили горизонтальный гель-электрофорез.

2.2.7. Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Нуклеотидные последовательности ДНК определялись методом прямого секвенирования по Сэнгеру с помощью автоматического секвенатора Applied Biosystems DNA Analyser 3730xl в компании Евроген. Были использованы праймеры, фланкирующие вставки с 3'- и 5'- концов.

Анализ нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программного пакета DNASTar .

2.2.8 Выделение и очистка рекомбинантных белков

Рекомбинантные белки, исследуемые в работе, являются His₆-мечеными. Для их очистки использовали металл-афинную хроматографию на смоле TALON (Clontech). Часть колонии *E. coli*, содержащей рекомбинантную плазмиду, кодирующую исследуемый рекомбинантный белок, вносили в 100 мл жидкой среды LB с ампициллином. Инкубировали бактерии в течение ночи при перемешивании и температуре 37°C. Клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин со скоростью 4000 об/мин при температуре 4°C и ресуспендировали в буфере для выделения белка из

расчета 4 мл буфера на осадок, полученный из 100 мл клеток в жидкой среде LB. Затем клетки разрушали ультразвуком с помощью прибора Sonic Dismembrator (Fisher Scientific) при мощности 15-30 Вт. Лизат центрифугировали 10 мин при 13400 об/мин в настольной центрифуге. Полученный супернатант переносили в пробирки с металло-афинной смолой (Co²⁺) TALON (Clontech) из расчета 300 мкл смолы на 1500 мкл супернатанта. Пробирки помещали в шейкер (скорость 40 об/мин) и инкубировали 5 мин. После этого смолу промывали 3 раза буфером для выделения белка. Далее белок элюировали добавлением к смоле 0,2 объёма 0,5 М ЭДТА, центрифугировали 90 с при 4000 об/мин в настольной центрифуге, отбирали супернатант и хранили при 4°C.

2.2.9 Определение скорости созревания хромофора

Для определения скорости созревания хромофора белок выделяли в анаэробных условиях.

Часть колонии *E. coli*, содержащей рекомбинантную плазмиду, кодирующую исследуемый рекомбинантный белок, вносили в 100 мл жидкой среды LB с ампициллином и 3% глюкозы. После чего инкубировали бактерии в течение ночи при 37°C при непрерывном перемешивании. Затем клетки в замотанном парафильмом нунке осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 4000 об/мин при температуре 4°C. После центрифугирования данный нунк ставили качаться на небольших оборотах (65 об/мин) на 40 мин. Далее вводили шприцом IPTG до 2х стандартной концентрации (0.2 mMx2) и оставляли на 37°C на 1 час, за это время нарабатывался белок. Затем выделяли белок по стандартному протоколу на холоду. Полученный белок быстро переносили в буфер для

ренатурации и снимали кинетику созревания белка с использованием флуоресцентного спектрофотометра Varian Cary Eclipse.

2.2.10 Гель-фильтрация

Гель-фильтрация проводилась на 1 x 90 см колонке Econo-column (Bio-Rad) Sephacryl-S200 (Amersham), уравновешенной 25 mM Трис-НСl pH 7,5, 150 mM NaCl.

2.2.11 Спектроскопические методы

Для измерения спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции аликвоту очищенного рекомбинантного белка добавляли к 1 мл буфера (20 mM Tris-НСl, pH 7,5, 100 mM NaCl) при комнатной температуре в кювету для флуориметрии. Затем анализировали спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции с использованием флуоресцентного спектрофотометра Varian Cary Eclipse. Для измерения спектра поглощения аликвоту очищенного рекомбинантного белка добавляли к 0,5 мл буфера (20 mM Tris-НСl, pH 7,5, 100 mM NaCl) при комнатной температуре в кювету для абсорбционной спектрофотометрии и снимали спектр поглощения с использованием спектрофотометра Beckman DU520 UV/VIS.

Определение молярного коэффициента экстинкции исследуемых флуоресцентных белков проводилось на основании измерения концентрации зрелого хромофора. Хромофор DsRed-подобных красных флуоресцентных белков при щелочной денатурации белка конвертируется

в GFP-подобный с коэффициентом экстинкции $44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при 452 нм. Измеряли поглощение флуоресцентного белка при длине волны максимума возбуждения флуоресценции, затем к раствору белка добавляли равный объём 1М NaOH и измеряли поглощение при 452 нм. ЕС рассчитывали по соотношению этих величин с учётом разведения.

$$EC = \frac{\max Abs \cdot 44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}}{Abs_{452} \cdot 1,2}$$

где $\max Abs$ - поглощение при длине волны возбуждения флуоресценции, Abs_{452} - поглощение при 452 нм после щелочной денатурации белка, 1,2- разведение.

Определение квантового выхода флуоресценции (QY) исследуемого белка проводили относительно известного значения этого параметра (0,22) для белка mCherry, обладающего сходным поглощением.

$$QY(\text{белок}) = \frac{Abs(mCherry) \cdot Em(\text{белок})}{Abs(\text{белок}) \cdot Em(mCherry)} \cdot 0,22$$

где Abs - поглощение при длине волны возбуждения флуоресценции, Em - флуоресценция в максимуме эмиссии белка.

Произведение коэффициента экстинкции в максимуме возбуждения флуоресценции и квантового выхода является количественной характеристикой яркости флуоресцентного белка.

Для измерения pH-стабильности исследуемого флуоресцентного белка одинаковые аликвоты белка добавляли к 900 мкл буферных растворов с различными значениями pH (от 3 до 10,5). После 60 мин инкубации при 25°C проводили флуориметрическое определение максимальной интенсивности флуоресценции каждой аликвоты. Полученные результаты нормировали к максимальному значению и строили график зависимости интенсивности флуоресценции от pH, используя программу Microsoft Excel.

2.2.12. Трансфекция эукариотических клеток

Культуру клеток HeLa растили в среде D-MEM (Invitrogen), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (PAA Laboratories) на 35 мм чашках Петри для конфокальной микроскопии (World Precision Instruments). По достижении 80% конfluence, среду меняли на 700 мкл среды Opti-MEM (Invitrogen) без сыворотки и чашки Петри инкубировали в течение 1 час при 37°C в CO₂-инкубаторе.

К 100 мкл стерильной среды Opti-MEM в пробирке добавляли 3 мкл трансфекционного реагента FuGene 6 (Roche), пробирки встряхивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. К смеси добавляли 1-1,5 мкг плазмидной ДНК, смесь встряхивали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Содержимое пробирки добавляли к клеткам на чашке Петри, перемешивали, добавляли фетальную телячью сыворотку до 5% и помещали чашки Петри в CO₂-инкубатор. Через 18-24 часа клетки анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии DMI 6000 B (Leica Microsystems AG).

2.2.13 Микроскопия

Для визуализации флуоресценции трансфицированных клеток использовали флуоресцентный микроскоп DMI 6000 B (Leica Microsystems AG) с использованием соответствующих светофильтров при мощности света 200 мВт/см². Обработка полученных изображений производилась с использованием программы Leica Software.

Для изучения фотостабильности исследуемых белков под воздействием ртутной лампы использовали флуоресцентный микроскоп DMI 6000 B (Leica Microsystems AG) с использованием иммерсионного объектива 63x и соответствующих светофильтров при мощности света 200 мВт/см².

Для тушения фоточувствительных белков использовали набор фильтров TX2 (фильтр возбуждающего света BP560/40, фильтр эмиссии BP645/75); для активации белков с “потушенной” флуоресценцией использовали набор фильтров GFP (фильтр возбуждающего света BP470/40, фильтр эмиссии BP525/50). Для минимизации фотообесцвечивания при получении изображения в TX2-канале использовали режим binning (т.е. сложение сигнала от соседних пикселей CCD камеры) 4x4. При работе с фотоактивируемыми белками использовали свет мощностью около 340 мВт/см² и 100 Вт/см², а при регистрации изображения - свет с меньшей интенсивностью – около 20-200 мВт/см².

2.2.14 Получение рекомбинантных конструкций

2.2.14.1 Получение бактериальных экспрессионных векторов

Вектор pQE-30 (Qiagen) использовался для получения экспрессии последовательностей нуклеотидов, кодирующих флуоресцентные белки в бактериальных клетках. Проводилась амплификация фрагментов ДНК, кодирующих флуоресцентный белок. Концевые праймеры содержали сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции BamHI и HindIII. Амплифицированные фрагменты ДНК подвергались рестрикции ферментами BamHI и HindIII и очищались на колонках фирмы Евроген по

протоколу фирмы-производителя. Вектор pQE-30 линейризовывался рестриктазами BamHI и HindIII и очищался из агарозного геля. Затем проводилось лигирование и компетентные клетки *E. coli* XL1 Blue трансформировались продуктом реакции лигирования.

2.2.14.2 Получение эукариотических экспрессионных векторов

Аmplицированные с помощью концевых праймеров, содержащих сайты узнавания AgeI и NotI или BglII, нуклеотидные последовательности флуоресцентных белков подвергались воздействию рестриктаз AsiGI (изошизомер AgeI) и CciNI (изошизомер NotI) или BglII. Эукариотические вектора pTurboGFP-N (Evrogen) или pTurboGFP-C (Evrogen) также подвергались воздействию данных рестриктаз. Фрагмент, кодирующий TurboGFP, был вырезан рестрикцией с использованием рестриктаз AsiGI (изошизомер AgeI) и CciNI (изошизомер NotI) для pTurboGFP-N и AsiGI (изошизомер AgeI) и BglII для pTurboGFP-C. Линейризованные вектора очищали из агарозного геля. Затем проводилось лигирование. Компетентные клетки *E. coli* XL1 Blue трансформировались продуктом реакции лигирования, очищенным переосаждением. После инкубации в течение ночи на твёрдой среде с канамицином, проводился скрининг бактериальных колоний при помощи ПЦР с праймеров, фланкирующих вставку. Результат оценивался по электрофоретической подвижности амплицированных фрагментов в агарозном геле. Из колоний, содержащих искомые конструкции, выделялась плазмидная ДНК.

Для мечения белков слияния получали химерные конструкции, в которых исследуемый белок находился в одной рамке считывания с модельным белком. Амплицированные с помощью концевых праймеров,

содержащих сайты узнавания AgeI и NotI или BglII, нуклеотидные последовательности флуоресцентных белков подвергались воздействию рестриктаз AsiGI (изошизомер AgeI) и CciNI (изошизомер NotI) или BglII и очищались на колонках Евроген по протоколу фирмы-производителя. Последовательности модельных флуоресцентных белков (Eurogen) также были обработаны данными рестриктазами. Линеаризованные вектора очищали из агарозного геля. Затем проводилось лигирование и компетентные клетки *E. coli* XL1 Blue трансформировались продуктом реакции лигирования. После инкубации в течение ночи на твердой селективной среде, проводился скрининг бактериальных колоний при помощи ПЦР с праймеров, фланкирующих вставку. Результат оценивался по электрофоретической подвижности амплифицированных фрагментов в агарозном геле.

2.2.14.3 Получение FusionRed

На основе белка mKate 2 методом сайт-специфического мутагенеза (см. раздел 2.2.3) был получен белок mKate 2,5. Для этого были использованы концевые праймеры, содержащие сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции и праймеры, содержащие замены нуклеотидов, кодирующих аминокислотные остатки в положениях 132, 164, 182 и 200:

| | |
|-------------------|---|
| FusRed N-концевой | 5'-TTTTGGATCCTTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCGAGCTGATTAAGGAGAAC |
| 132A прямой | 5'- AACTTCCCAGCCAACGGCCCT |
| 132A обратный | 5'- AGGGCCGTTGGCTGGGAAGTT |
| 164A прямой | 5'- CTGGAAGGCGCAGCTGACATG |
| 164A обратный | 5'- CATGTCAGCTGCGCCTTCCAG |
| 182E прямой | 5'- TGCAACTTGGAGACCACATAC |

| | |
|-------------------|---|
| 182E обратный | 5'- GТATGTGGTCTCCAAGTTGCA |
| 200N прямой | 5'- GCGTCTACAACGTGGACAGG |
| 200N обратный | 5'- CCTGTCCACGTTGTAGACGCC |
| FusRed C-концевой | 5'- ATATAAGCTTGC GGCCGCTCATTTACCTCCATCACCAGCG |

Для получения нуклеотидной последовательности, кодирующей мономерный белок FusionRed, проводился сайт-специфичный ПЦР-мутагенез *mKate 2,5* с использованием следующих праймеров:

| | |
|-------------------|---|
| FusRed N-концевой | 5'-TTTTGGATCCTTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCGAGCTGATTAAGGAGAAC |
| 69R прямой | 5'- TACGGCAGCAGAACCTTCATCAA; |
| 69R обратный | 5'- TACGGCAGCAGAACCTTCATCAA; |
| 148N обратный | 5'- TGGGAGGCCAACACCGAGACGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGA; |
| 148-165 прямой | 5'- GCTGACGGCGGCCTGGA |
| 165T прямой | 5'- GCTGACGGCGGCCTGGAAGGCGCAACTGACATGGCCCTGAA; |
| 148-165 обратный | 5'- TCCAGGCCCGCCTCAGC |
| 181F прямой | 5'- ATCTGCAACTTTGAGACCACA; |
| 181F обратный | 5'- TGTGGTCTCAAAGTTGCAGAT; |
| 203N прямой | 5'- AACGTGGACCACAGACTGGAAAGAAT; |
| 203N обратный | 5'-ATTCTTTCCAGTCTGTGGTCCACGTT |
| FusRed C-концевой | 5'- ATATAAGCTTGC GGCCGCTCATTTACCTCCATCACCAGCG |

Сайт-направленный мутагенез *mKate 2,5* в сочетании с несколькими раундами случайного мутагенеза (см. разд. 2.2.2) привели к получению белка FusionRed. На основе нуклеотидной последовательности FusionRed были получены эукариотические экспрессионные вектора.

2.2.14.4 Получение mKateKFP1 и mKateKFP2

Для получения нуклеотидных последовательностей, кодирующих фотоактивируемые варианты белка FusionRed, проводился сайт-направленный мутагенез (см. раздел 2.2.3) FusionRed с использованием концевых праймеров и праймеров, несущих замены нуклеотидов, кодирующих аминокислотные остатки в ключевых положениях (69К, 148Н, 179А):

| | |
|-------------------|---|
| FusRed N-концевой | 5'-TTTTGGATCCTTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCGAGCTGATTAAGGAGAAC |
| 69К прямой | 5'-TACGGCAGCAAAACCTTCATCAA |
| 69К обратный | 5'-TTGATGAAGGTTTTGCTGCCGTA |
| 148-165 прямой | 5'-GCTGACGGCGGCCTGGA |
| 148Н обратный | 5'-TCCAGGCCGCCGTCAGCGGGGTACATCGTCTCGGTGTGGGCCTCCCA |
| C179А прямой | 5'-CCACCTGATCGCCAACCTTGAG |
| C179А обратный | 5'-CTCAAGGTTGGCGATCAGGTGG |
| FusRed C-концевой | 5'-ATATAAGCTTGCGGCCGCTCATTTACCTCCATCACCAGCG |

На основе полученных библиотек были получены бактериальные экспрессионные вектора. Был произведен отбор по яркости флуоресценции в системе *E.coli*. В результате было отобрано два фотоактивируемых белка- mKateKFP1 и mKateKFP2.

2.2.14.5 Получение FusionRed-657

Для получения нуклеотидной последовательности, кодирующей дальне-красный вариант FusionRed был проведен сайт-специфический

мутагенез FusionRed (см. раздел 2.2.3). Для этого были использованы следующие праймеры:

| | |
|--------------------|---|
| FusRed N-концевой | 5'-TTTTGGATCCTTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCGAGCTGATTAAGGAGAAC |
| 44QE прямой | 5'- ACCCAGACCSAAAGAATCAAGGT; |
| 44QE обратный | 5'- ACCTTGATTCTTTSGGTCTGGGT; |
| 69NH прямой | 5'- GTACGGCAGCМАСАССТТСАТС; |
| 69NH обратный | 5'- GATGAAGGTGТКGCTGCCGTAC; |
| 148NH152M обратный | 5'- TCCAGGCCGCCGTСAGCGGGTACATCGTCTCGGTATKGGCCTCCCA; |
| 165T167ML прямой | 5'- GCTGACGGCGGCCTGGAAGGCGCAACTGACWTGGCCCTGAA; |
| 181F прямой | 5'- ATCTGCAACTTTGAGACCACA; |
| 181F обратный | 5'- TGTGGTCTCAAAGTTGCAGAT |
| 203YF прямой | 5'- CAACGTGGACTWTAGACTGGAAA; |
| 203YF обратный | 5'- TTTCCAGTCTAWAGTCCACGTTG |
| FusRed C-концевой | 5'- ATATAAGCTTGCGGCCGCTCATTTACCTCCATCACCAGCG |

На основе полученных библиотек были получены бактериальные экспрессионные вектора. Скрининг библиотек и принципы отбора описаны в разделе 3.3.1. Было проведено два раунда случайного ПЦР-мутагенеза (см. раздел 2.2.2). Для наиболее ярких отобранных вариантов с батохромным сдвигом максимума эмиссии флуоресценции определяли нуклеотидные кодирующие последовательности. Для работы отбирались лишь те варианты, которые не содержали димеризующих замен. Впоследствии на основе нуклеотидной последовательности FusionRed-657 были получены эукариотические экспрессионные вектора (см. раздел 2.2.14.2).

2.2.15 Трансгенные *Xenopus laevis*

Данная часть работы проводилась А. Г. Зарайским и сотрудниками в лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН.

Трансгенные эмбрионы *X.laevis* были получены в соответствии с предыдущим описанием [118]. Плазмидную ДНК выделяли на колонках фирмы Qiagen по протоколу фирмы-производителя и очищали фенол-хлороформной экстракцией с последующим переосаждением. Плазмидную ДНК (30 pg/эмбрион) вводили инъекциями. Трансгенные эмбрионы *X.laevis* были проанализированы во флуоресцентном стереомикроскопе Leica M205 с использованием светофильтров Texas Red и GFP. Обработка полученных данных производилась с использованием программы LAS software.

3. Результаты и обсуждение

3.1 Красный мономерный флуоресцентный белок.

Многие белки слияния и большинство биосенсоров на основе ФБ чрезвычайно чувствительны к олигомеризации и неспецифическим внутриклеточным взаимодействиям. За последнее десятилетие ряд красных димерных и тетрамерных белков подвергался искусственной мономеризации, которая в большинстве случаев приводила к потере яркости, уменьшению скорости созревания и снижению стабильности флуоресценции. И, тем не менее, лучшие образцы красных мономерных белков уступают природным зеленым мономерным белкам в составе белков слияния. Эта проблема объясняется их остаточной слабой димеризацией, токсичностью, склонностью к формированию агрегатов в живых клетках. В настоящей работе нас мотивировала задача получения красного флуоресцентного белка, качество работы которого в составе белков слияния не уступало бы лучшим естественно мономерным зеленым флуоресцентным белкам, таким как mEmerald или mEGFP.

3.1.1 Получение белка FusionRed

На основании таких характеристик как высокая яркость флуоресцентного сигнала, высокая скорость созревания хромофора, и низкая токсичность, белок mKate2 был выбран нами в качестве основы для разработки красного мономерного белка, для которого не будет характерна проблема слабой димеризации.

На основании анализа трехмерной структуры белка mKate [115] мы выбрали ряд положений аминокислотных остатков, которые способны влиять на олигомерные свойства белка mKate2. С помощью сайт-специфичного ПЦР-мутагенеза (см. раздел 2.2.3) мы внесли следующие замены в микроокружение хромофора: R164A, K182E, Y200N. Кроме того, мы заменили гидрофобный С-концевой участок, стабилизирующий, согласно данным о структуре белка mKate, формирование димера, на Gly-богатый участок (см. рис. 6).

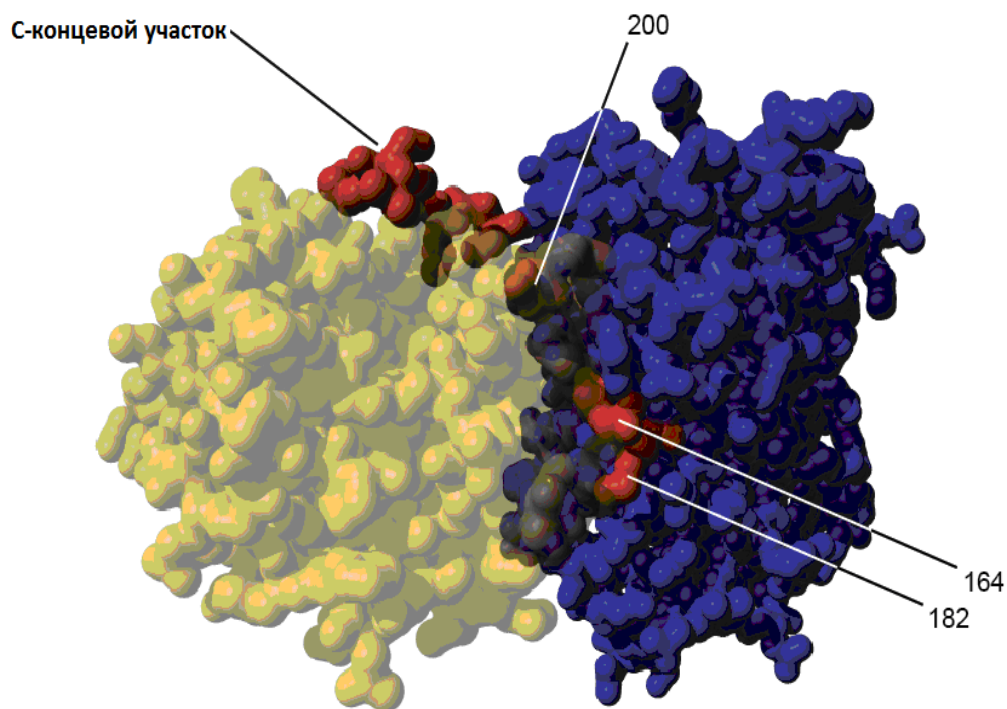


Рисунок 6. Визуализация основных аминокислотных остатков, отвечающих за димеризацию белка mKate.

Аминокислотные остатки, ответственные за димеризацию, показаны красным. Две субъединицы mKate окрашены в желтый (полупрозрачный) и синий цвета. Модель основана на данных кристаллографического анализа белка mKate.

Полученный на этом этапе белок был назван mKate2.5. Его мономерность при концентрации до 10 мг/мл была подтверждена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии HPLC. Однако, следствием введения мономеризующих замен стало ухудшение ряда характеристик белка. В частности, недостатками mKate2.5 являются относительно невысокая яркость флуоресценции, а также низкая pH-стабильность (кажущееся значение $pK_a = 7.0$, тогда как для исходного белка mKate2 $pK_a = 5.0$). Наша дальнейшая работа была направлена на оптимизацию спектральных и биохимических характеристик белка mKate2.5, которая, однако, не должна была произойти за счет потери его мономерных свойств.

Основываясь на нашем предыдущем опыте работы с белками этого семейства (потомками белка дикого типа eqFP578), а также на данных о трехмерной структуре белка mKate, мы предположили, что аминокислотные замены в окружении хромофора, такие как K69R, S148N, C165T, L181F и R203H приведут к созданию флуоресцентного белка, подобного TagRFP.

Принципиальная разница между белками mKate и TagRFP заключается в том, что во флуоресцентном состоянии хромофор белка mKate имеет цис-конформацию, а белок TagRFP - транс. При этом белок TagRFP характеризуется высокой pH-стабильностью и самой высокой яркостью флуоресцентного сигнала из всех известных мономерных и слабо димерных красных флуоресцентных белков.

В то же время, мутагенез по перечисленным выше внутренним (то есть ориентированным внутрь бета-бочонка белка) аминокислотным позициям, отличающим mKate2.5 от белка TagRFP, не должен был привести к изменению олигомерных свойств mKate2.5.

Используя специально разработанные праймеры (см. раздел 2.2.14.3), мы провели несколько раундов сайт-специфичного мутагенеза. Были получены библиотеки, содержащие различные комбинации аминокислотных замен в выбранных нами положениях. Яркость полученных вариантов анализировали с помощью флуоресцентного бинокля SZX-12 (Olympus, фильтр возбуждающего света 545-580 нм, фильтр эмиссии 610LP), спектрофотометра SMS2VIS и программы smsCalc для измерения спектров флуоресценции с отдельных колоний и штрихов *E. coli*. Самые яркие варианты были объединены и подверглись нескольким раундам случайного мутагенеза (см. раздел 2.2.2). На каждом раунде случайного мутагенеза отбиралось от 20 до 40 вариантов. После секвенирования отобранных вариантов мы объединяли накопленные аминокислотные замены, за исключением потенциально димеризующих согласно результатам анализа трехмерной структуры белка mKate. Замены объединялись в различных комбинациях с использованием метода вырожденного сайт-направленного мутагенеза, и полученный таким образом набор вариантов подвергали следующему раунду случайного мутагенеза. Такой цикл повторяли в общей сложности 7 раз.

Ряд замен, найденных в ходе случайного мутагенеза, такие как пара T75P+Q76P, значительно увеличили скорость и эффективность созревания белка. Этот дуплет пролинов находится между α -спиралью, несущей хромофор, и четвертым β -слоем, и по всей вероятности обеспечивает необходимый угол поворота при переходе между этими структурными элементами.

Окончательный вариант, названный FusionRed (от fusion- белок слияния) имеет яркость при экспрессии в бактериях сопоставимую и даже превосходящую яркость белка-предшественника mKate2 (см. рис. 7).

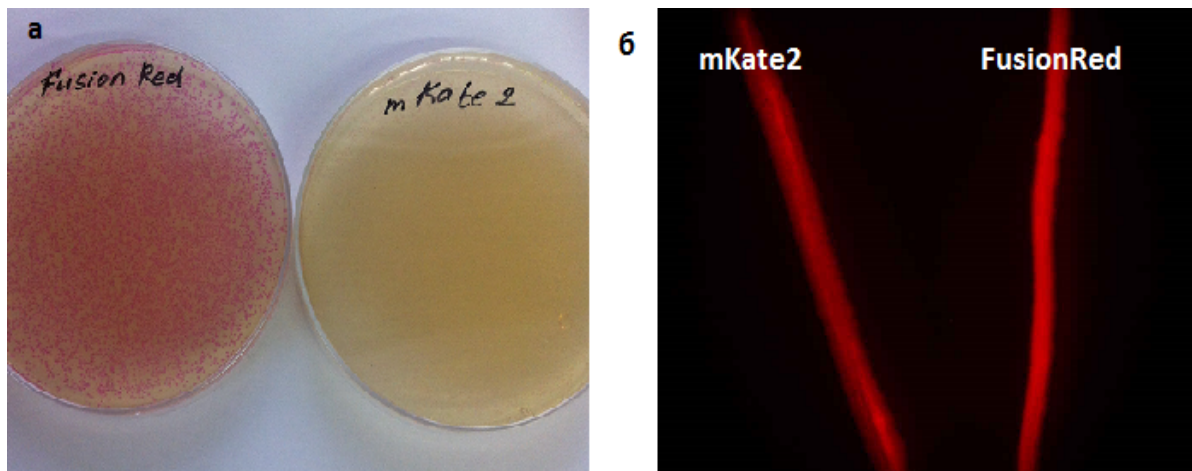


Рисунок 7. Бактерии, экспрессирующие белки FusionRed и mKate2.

а. Бактерии, экспрессирующие белки FusionRed (слева) и mKate2 (справа), на чашках Петри в видимом свете.

б. Бактерии, экспрессирующие белки mKate2 (слева) и FusionRed (справа), на чашках Петри под бинокляром (фильтр возбуждающего света 545-580 нм, фильтр эмиссии 610LP).

3.1.2 Характеристика и сравнение FusionRed с аналогами *in vitro*

Анализ олигомерного статуса белков mKate2, mKate2.5 и FusionRed проводился с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии HPLC на носителе Superdex 200, при концентрации 10 мг/мл (см. рис. 8).

Было показано, что белки mKate2.5 и FusionRed сохраняют мономерную природу (молекулярная масса около 22 kDa) даже при этой высокой концентрации, сопоставимой с максимально достижимой в физиологических условиях. В то же время, белок mKate2 был представлен на HPLC двумя перекрывающимися пиками, что свидетельствует о наличии димерной составляющей при концентрации 10 мг/мл.

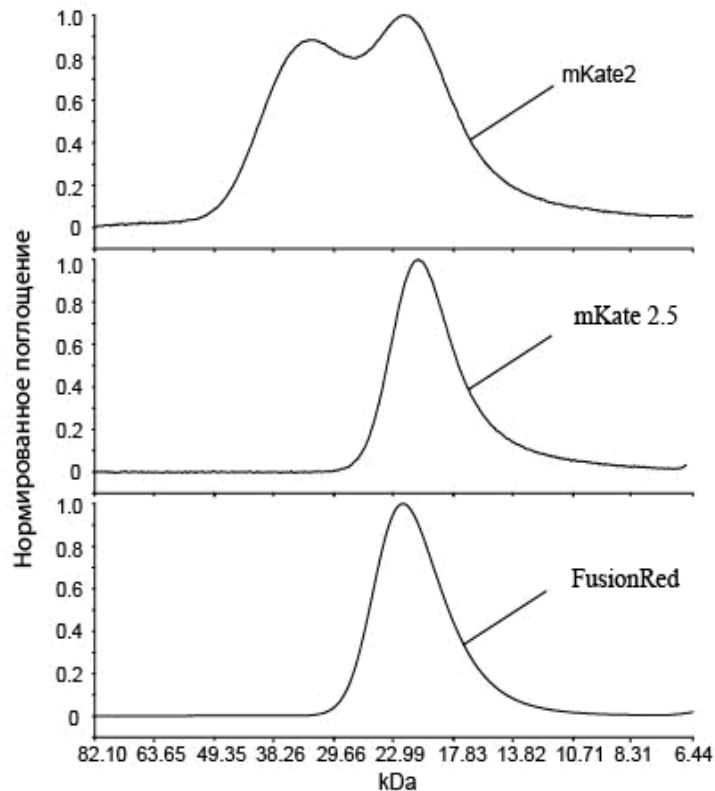


Рисунок 8. Результаты HPLC для белков mKate2, mKate2.5 и FusionRed при концентрации 10 мг/мл.

По оси Y отложены нормированные значения поглощения белка, по оси X – молекулярная масса в kDa.

Были измерены спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции белка FusionRed в интервале длин волн от 400 до 850 нм. Спектры имеют узкую и четкую форму пиков (см. рис. 9). Максимум возбуждения флуоресценции составил 580 нм, максимум эмиссии – 608 нм. Таким образом, наблюдается сдвиг максимума эмиссии флуоресценции в более коротковолновую часть спектра относительно белка mKate2 ($\lambda_{em}=633$ нм).

Отсутствие промежуточных форм существования хромофора подтверждается наличием единственного узкого пика на спектре поглощения. Дополнительный пик поглощения при 350 нм является характерным для всех красных флуоресцентных белков и не

свидетельствует о наличии дополнительных альтернативных либо незрелых форм хромофора (см. рис. 9).

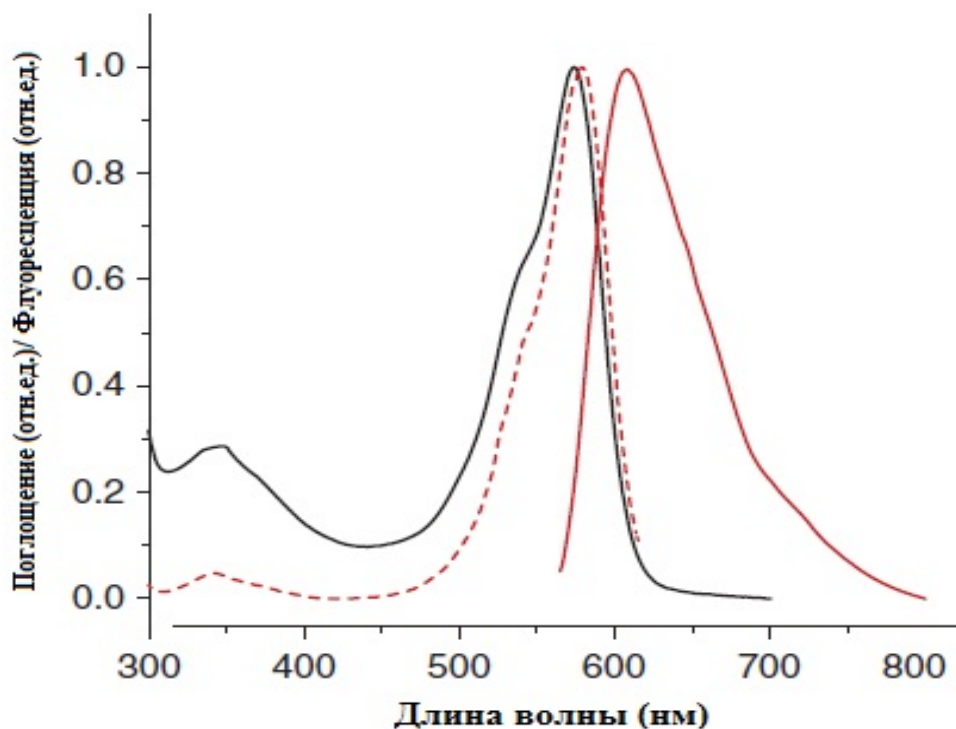


Рисунок 9. Нормализованные спектры поглощения (черная сплошная линия), возбуждения флуоресценции (красная пунктирная линия) и эмиссии флуоресценции (красная сплошная линия) белка FusionRed.

Для определения скорости созревания хромофора рекомбинантный белок FusionRed выделяли в анаэробных условиях (см. раздел 2.2.9). Время полусозревания белка FusionRed составило 130 мин, что вполне приемлемо для применения во флуоресцентной микроскопии живых клеток, хотя и уступает времени полусозревания белка mKate2, составляющему около 20 минут.

Было определено, что квантовый выход флуоресценции для белка FusionRed составляет 0.19. Коэффициент молярной экстинкции при максимуме поглощения (580 нм) составляет $94,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Таким образом,

по относительной яркости, вычисляемой как произведение коэффициента молярной экстинкции и квантового выхода флуоресценции, результирующая яркость белка FusionRed сопоставима с таковой для mKate2 и превосходит относительную яркость белка mCherry. При этом коэффициент молярной экстинкции FusionRed больше, чем таковой у mKate2 и mCherry, а квантовый выход, наоборот, ниже, но близок к mCherry (см. табл. 1). Высокий коэффициент молярной экстинкции делает данный белок потенциально эффективным акцептором для FRET.

По результатам измерения рН-стабильности FusionRed лишь немного уступает TagRFP и mCherry. Кажущееся значение рКа для FusionRed составляет 4.6, тогда как для TagRFP и mCherry рКа около 3.8 [119].

В предыдущих работах нашей лаборатории [120] было показано, что скорость фотообесцвечивания существенно зависит от конкретных условий облучения и окружающего раствора.

Для определения относительной фотостабильности полученного белка FusionRed и сравнения его по этому параметру с аналогами, такими как TagRFP, mKate2, и mCherry, в максимально реалистичных условиях, мы использовали систему транзientной экспрессии в клетках линии HeLa. Для большей стандартизации условий, использовались химерные конструкции с гистоном Н2В, обеспечивающие локализацию в ядре клетки. Фотостабильность исследуемых белков определялась при помощи флуоресцентного микроскопа. Было показано, что время полуобесцвечивания белка FusionRed превосходит время полуобесцвечивания белков TagRFP и mKate2 ориентировочно в 3 и 2 раза, соответственно (см. табл. 1).

Таблица 1. Ключевые характеристики мономерных флуоресцентных белков mCherry, TagRFP, mKate2 и FusionRed.

| Флуоресцентный белок | Максимумы возб./эмис., (нм) | QY | ЕС $M^{-1} cm^{-1}$ | Расч. яркость, % от EGFP | Время полусозревания, мин | pKa | Время полубесцвечивания, с |
|----------------------|-----------------------------|------|------------------------|--------------------------|---------------------------|------|----------------------------|
| mCherry | 587/610 | 0.22 | 72,000 | 47 | 40 | <4.5 | 111 |
| TagRFP | 555/584 | 0.48 | 100,000 | 143 | 100 | <4.0 | 48 |
| mKate2 | 588/633 | 0.40 | 62,500 | 74 | <20 | 5.4 | 69 |
| FusionRed | 580/608 | 0.19 | 94,5000 | 53 | 130 | 4.6 | 150 |

QY – квантовый выход флуоресценции; ЕС- коэффициент молярной экстинкции при максимуме поглощения. Яркость рассчитана как произведение ЕСхQY и дана в процентах от относительной яркости mEGFP (ЕС=56,000; QY=0.22). Фотостабильность дана в секундах как время полубесцвечивания белков во флуоресцентном микроскопе. Интенсивность облучения около 21 мВт/см².

Таким образом, FusionRed является достаточно ярким, pH- стабильным белком, сохраняющим мономерные свойства даже при высоких концентрациях.

3.1.3 Характеристика и сравнение белка FusionRed с аналогами *in vivo*

Было получено более 40 белков слияния FusionRed, которые были протестированы при экспрессии в клетках млекопитающих. Все исследованные химерные конструкции проявляли в экспериментах преимущественно ожидаемую внутриклеточную локализацию.

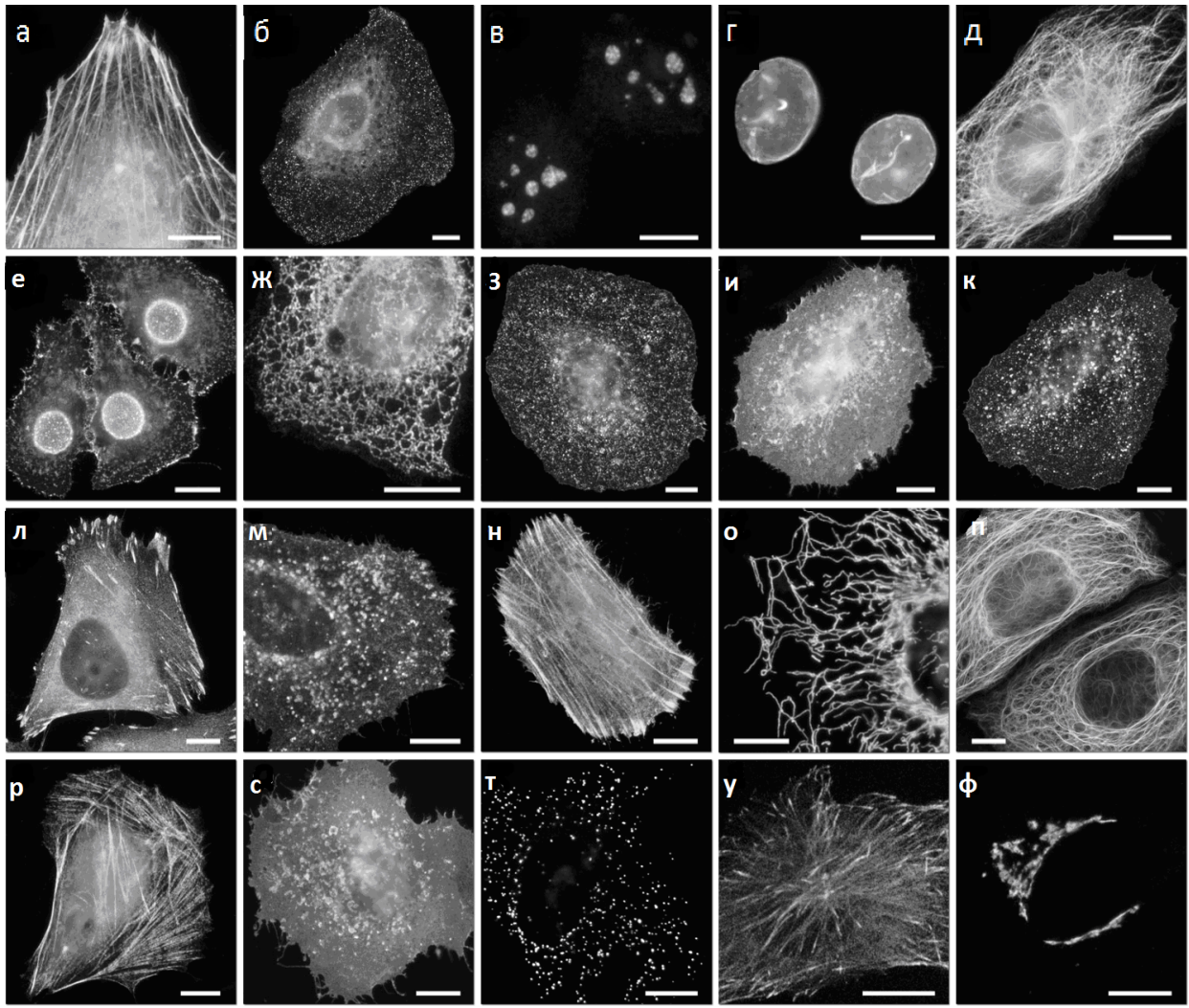


Рисунок 10 . Белок FusionRed в живых клетках.

Изображения клеток, трансфицированных рекомбинантными генетическими конструкциями, кодирующими следующие слитные белки:

а. FusionRed- β -актин; **б.** FusionRed-Rab5a-7 (локализация в эндосомах); **в.** FusionRed-фибрилларин; **г.** FusionRed- ламин; **д.** FusionRed- α -тубулин; **е.** FusionRed-аннексин- A4; **ж.** FusionRed-ER (локализация в эндоплазматическом ретикулуме) **з.** FusionRed-кавеолин; **и.** FusionRed- с-Ha-Ras (мембранная локализация); **к.** FusionRed-эпитоп-RhoB-GТразы (локализация в эндосомах); **л.** FusionRed-паксиллин-22; **м.** FusionRed-лизосомальный-мембранный-гликопротеин (мембранная локализация); **н.** FusionRed-lifeact (пептид, связывающий филаменты актина); **о.** FusionRed-PDHA1-10 (pyruvate dehydrogenase; митохондриальная локализация); **п.** FusionRed-кератин; **р.** FusionRed-миозин (легкая цепь); **с.** FusionRed-с-src-N-7; **т.** FusionRed-РМР (сигнал пероксисомальной локализации); **у.** FusionRed-EB3 (белок семейства RP/EB, ассоциированный с микротрубочками); **ф.** FusionRed-Golgi (45 N-концевой аминокислотный остаток галактозилтрансферазы, локализация в комплексе Гольджи)

Масштабная линейка, 10 мкм. Фотографии сделаны Michael W. Davidson, США.

Уровень экспрессии флуоресцентного белка (наблюдаемая яркость сигнала) варьировался в различных клетках, что характерно при временной трансфекции эукариотических клеток. Исследованные конструкции FusionRed с белками слияния демонстрировали сопоставимую яркость сигнала и процент трансфицированных клеток. В подавляющем большинстве случаев качество работы FusionRed не уступало лучшим мономерным зеленым белкам, таким как mEGFP или mEmerald (см. рис. 10).

Формирование белковых агрегатов может быть токсичным для клеток. Для тестирования склонности белка FusionRed к формированию агрегатов мы протестировали его поведение в продолжительной экспрессии в клетках линии HeLa. Клетки были трансфицированы рекомбинантными плазмидами, содержащими последовательность нуклеотидов, кодирующую ген белка FusionRed под контролем CMV-промотора. Яркий красный флуоресцентный сигнал появлялся уже через 23-24 часа после трансфекции. При этом мы не наблюдали формирования видимых агрегатов даже через 5 дней после трансфекции. Таким образом, в этом отношении белок FusionRed унаследовал позитивные черты белка-предшественника mKate2.

Далее были получены стабильно трансфицированные клеточные линии U2OS-FusionRed-тубулин и U2OS-FusionRed-MAP4 (см. рис. 11).

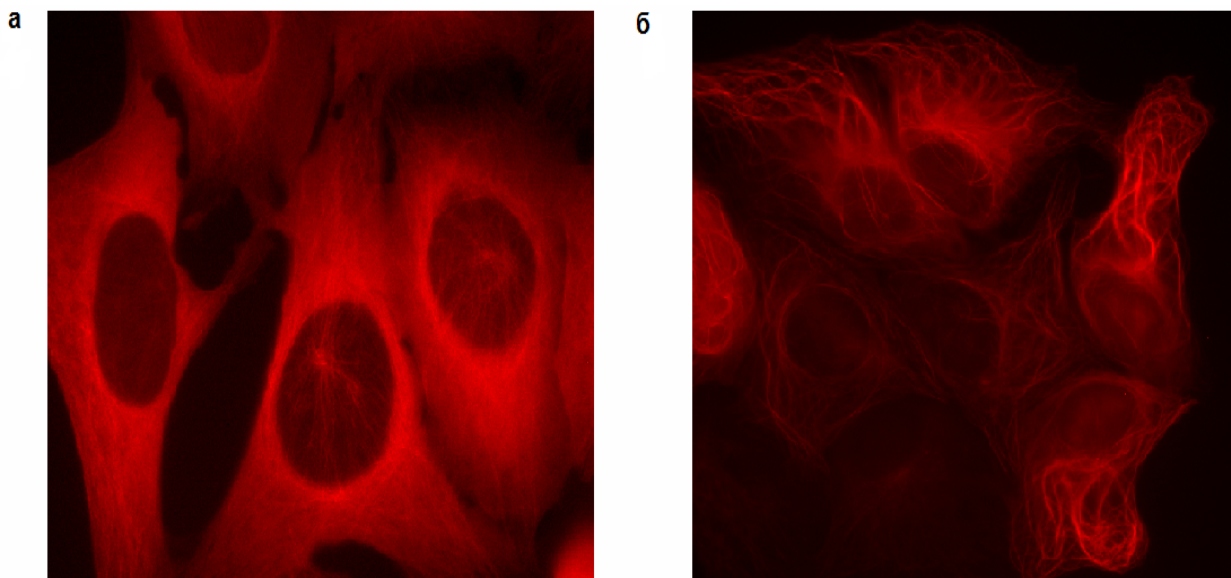
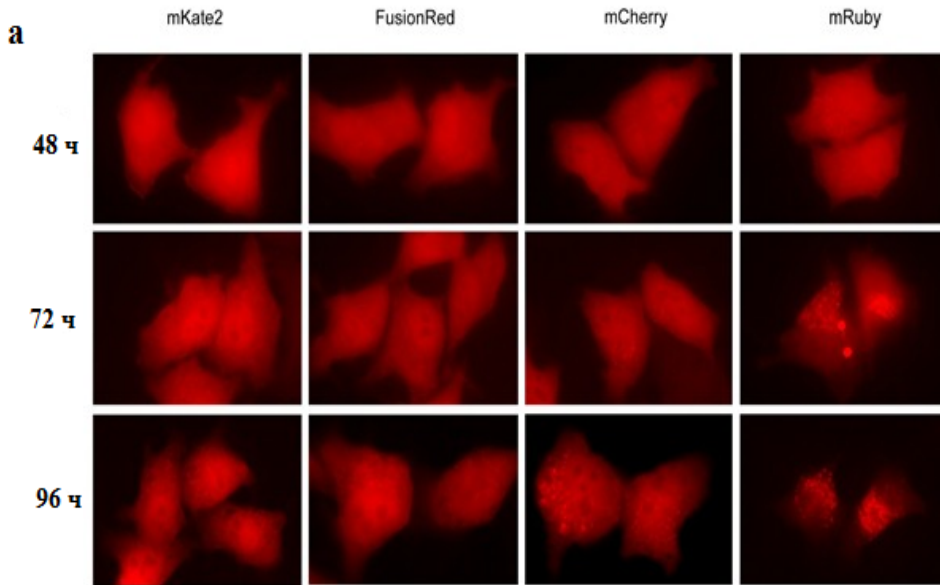


Рисунок 11 . Стабильно трансфицированные клеточные линии.

а.U2OS-FusionRed- тубулин **б.** U2OS-FusionRed-MAP4.

Следующим этапом работы стало сравнение цитотоксичности белков FusionRed, mKate2, mCherry и mRuby относительно белка EGFP, широко применяемого для мечения белков слияния и характеризующегося низкой токсичностью даже при высоких концентрациях. Для этого был проведен ряд трансфекций клеток линии HeLa векторами, кодирующими данные флуоресцентные белки. Клетки, экспрессирующие белок EGFP, были смешаны с клетками, экспрессирующими один из красных ФБ, в результате чего было получено четыре отдельные клеточные смеси: EGFP и mRuby, EGFP и FusionRed, EGFP и mKate2, EGFP и mCherry. Через 48 часов после трансфекций было рассчитано соотношение красных и зеленых клеток с использованием проточной цитометрии. После дополнительной 92-часовой инкубации соотношение красных и зеленых клеток было заново измерено. Поскольку подсчету подвергались только живые клетки, соотношения до и после инкубации можно считать точным отображением токсичности красного белка по сравнению с EGFP. В этих экспериментах было показано, что цитотоксичность белка mRuby более чем в 10 раз

превышает цитотоксичность белка EGFP. Остальные красные белки (FusionRed, mKate2 и mCherry) характеризовались низкой цитотоксичностью, сопоставимыми с цитотоксичностью EGFP (см. рис. 12б). Следует отметить, что через четыре дня после трансфекции клеток линии HeLa векторами, кодирующими mCherry и mRuby, мы наблюдали флуоресцентное мечение, напоминающие лизосомальную локализацию. Для белков mKate2 и FusionRed такого явления через четыре дня после трансфекции не наблюдалось (см. рис. 12а). По всей вероятности, эти данные свидетельствуют в пользу того, что склонность к лизосомальной локализации может коррелировать с общей токсичностью флуоресцентного белка в живых клетках.



б

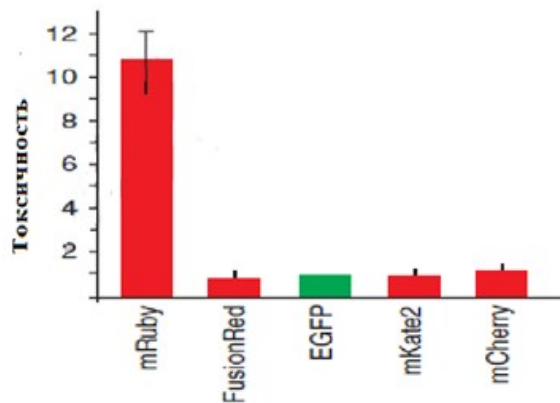


Рисунок 12 . Сравнение цитотоксичности красных мономерных флуоресцентных белков.

а. Клетки линии HeLa, трансфицированные плазмидами, кодирующими исследуемые красные флуоресцентные белки под контролем CMV-промотора в разные периоды времени после трансфекции. Для белков mCherry и mRuby наблюдается лизосомальная локализация. mKate2 и FusionRed остаются равномерно распределены в цитоплазме.

б. Цитотоксичность белков в клетках линии HeLa относительно EGFP.

Следующим этапом работы стала оценка токсичности полученного мономерного белка FusionRed на лабораторных животных. В качестве модели нами были выбраны *Xenopus laevis* (работа велась совместно с Лабораторией молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН). Были

проведены микроинъекции плазмид, кодирующих флуоресцентные белки под контролем CMV-промотора, в эмбрионы *Xenopus laevis*. В предварительных экспериментах мы наблюдали разные степени снижения среднего размера глаз головастиков, в зависимости от экспрессируемых флуоресцентных белков. Учитывая, что данный параметр относительно легко измерить, он был использован для оценки относительной токсичности следующих флуоресцентных белков: EGFP, mCherry, mKate2 и FusionRed (см. рис. 13 а-е).

Белок mCherry оказался наиболее токсичным из всех тестируемых белков. Инъекции mCherry снизили средний размер глаз наиболее значительно (см. рис. 13 б', д, е). EGFP и mKate2 обладают умеренной токсичностью (см. рис. 13 а', в'), а белок FusionRed является наименее токсичным из всех четырех вариантов (см. рис. 13 г'). Выживаемость FusionRed-экспрессирующих эмбрионов составила 68%, тогда как этот показатель для контрольных эмбрионов составил 76%. Для EGFP, mKate2 и mCherry - 59%, 51% и 37% соответственно.

Полученные результаты свидетельствуют о низкой токсичности FusionRed и его применимости для мечения белков, клеток и тканей в трансгенных организмах.

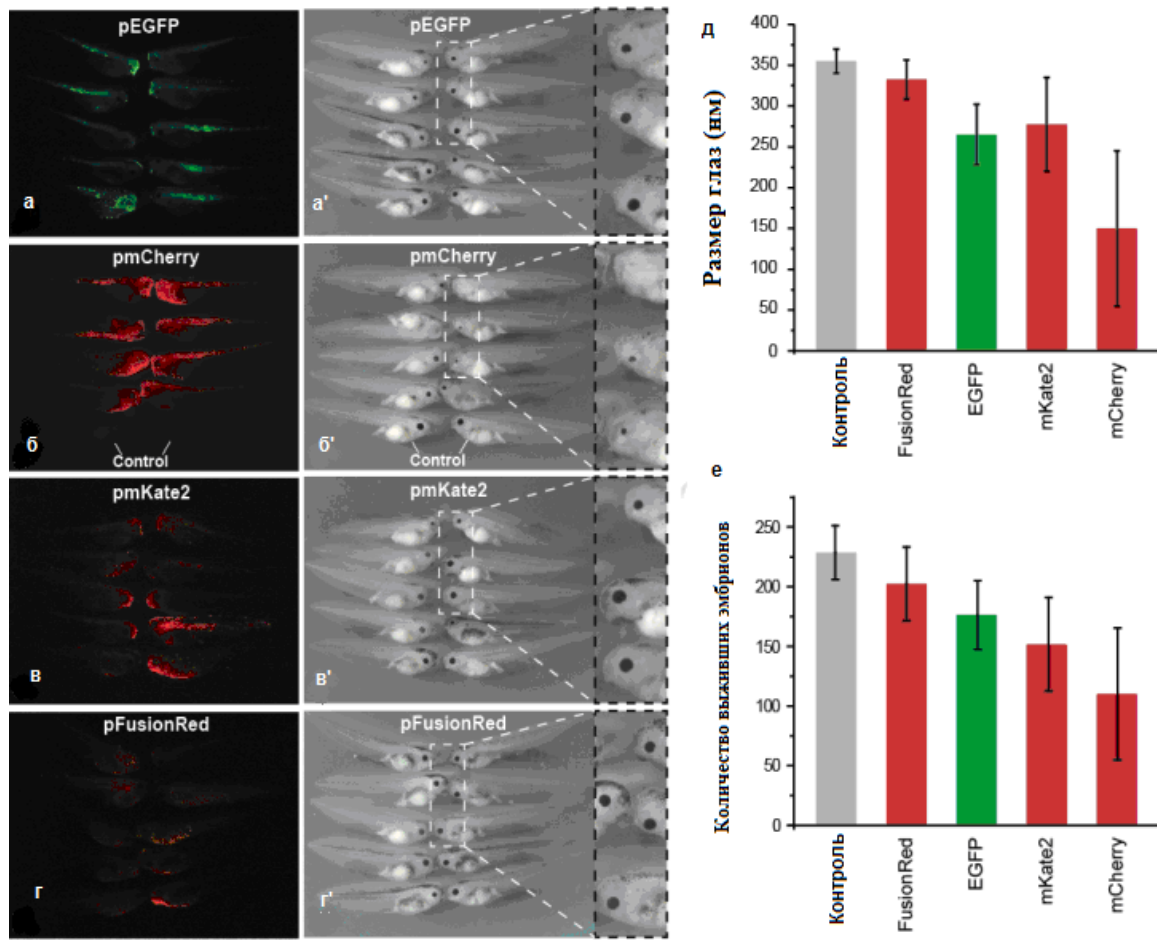


Рисунок 13. Токсичность белков EGFP, mCherry, mKate2 и FusionRed *in vivo*.

Трансгенные эмбрионы *Xenopus laevis*, экспрессирующие EGFP (а, а'), mCherry (б, б'), mKate2 (в, в') и FusionRed (г, г'). Фотографии эмбрионов в белом свете (а', б', в', г') и флуоресцентные изображения (а, б, в, г).

д. Среднее значение размера глаз эмбрионов *Xenopus laevis* после инъекций плазмид, экспрессирующих различные флуоресцентные белки.

е. Количество выживших эмбрионов через 5 дней после инъекций плазмид.

3.2. Красные мономерные обратимо фотоактивируемые белки

Недавно на основе белка TagRFP был получен обратимо фотоактивируемый белок KFP-НС. Данный белок обладает флуоресценцией в красной области спектра. Максимумы возбуждения и эмиссии KFP-НС

приходится на 585 и 615 нм, соответственно. Интенсивность флуоресценции KFP-НС падает в 10 раз (за счет уменьшения квантового выхода флуоресценции) под воздействием зеленого света (530–560 нм) и затем возвращается к исходному уровню при облучении синим светом (450–490 нм) или после инкубации в темноте (время полувосстановления флуоресценции составляет 30 мин). Аминокислотные остатки 69, 148, 165, 179 и 181 (нумерация по GFP) играют определяющую роль в проявлении свойств фотоактивируемости. 148 и 165 аминокислотные остатки в значительной степени определяют возможность фотоиндуцируемой *цис-транс*-изомеризации хромофора.

Однако недостатком белка KFP-НС является низкая яркость флуоресценции. Нас привлекла возможность получения мономерного фотоактивируемого красного флуоресцентного белка на основе мономерного белка FusionRed, который высоко гомологичен KFP-НС.

3.2.1 Получение фотоактивируемых белков mKateKFP1 и mKateKFP2

Мы сравнили KFP-НС и FusionRed по позициям 69, 148, 165, 179 и 181. Оба белка содержат цистеин в 165 положении и лейцин в 181. Различия наблюдаются только по 69, 148 и 179 положениям. Соответственно, было решено провести направленный мутагенез FusionRed с различным набором мутаций по этим позициям.

Используя специально разработанные праймеры (см. раздел 2.2.14.4), мы провели несколько серий сайт-специфичного мутагенеза. Нами были получены следующие варианты: FusionRedS148H; FusionRed R69K, S148H; FusionRed R69K, S148H, C179A. Отсутствие случайных замен в

результатирующих вариантах было подтверждено секвенированием. При этом яркость флуоресценции FusionRed R69K, S148H и FusionRed R69K, S148H, C179A была намного выше, чем яркость флуоресценции белков KFP-НС или FusionRedS148H. Варианты белка FusionRed R69K, S148H (далее mKateKFP1) и FusionRed R69K, S148H, C179A (далее mKateKFP2) демонстрировали выраженную способность к обратимому изменению флуоресцентных свойств. Было принято решение продолжить работу с вариантами.

3.2.2 Изучение фотоаквационных свойств белков mKateKFP1 и mKateKFP2

Фотоаквационные свойства вариантов mKateKFP1 и mKateKFP2 изучали на экспрессирующих эти белки колониях *E.coli*, при помощи микроскопа Leitz Laborlux К (объектив 40x) с высокой мощностью (100 Вт ртутная лампа), а также флуоресцентного бинокуляра Olympus SZX-12. Интенсивность флуоресценции обоих вариантов довольно быстро снижалась при облучении зеленым светом (менее чем за одну минуту). Восстановление флуоресценции происходило при облучении синим светом за две минуты или за 10 минут в темноте. Для исходного белка FusionRed в тех же условиях эффекта обратимого фотообесцвечивания не наблюдалось.

Следующим этапом нашей работы стало изучение фотоаквационных свойств белков mKateKFP1 и mKateKFP2 иммобилизованных на металлоафиной смоле, с помощью флуоресцентного микроскопа DMI 6000 В. В этих условиях достигаются

более высокие локальные мощности облучения, которые также могут применяться в реальной микроскопии живых клеток.

Были подобраны условия многократной фотоактивации/тушения флуоресценции данных белков. Белки mKateKFP1 и mKateKFP2 под действием зеленого света (3 с, ~ 3 Вт/см²) переходят в потушенное состояние и быстро восстанавливают красный флуоресцентный сигнал при облучении синим светом (1.5-3 с, ~ 3 Вт/см²). Интересно, что наблюдается возрастание интенсивности свечения флуоресцентной формы этих белков на начальных циклах фотопереключения (см. рис. 14). Для белка mKateKFP1 после достижения максимума наблюдается постепенное выгорание флуоресцентной формы. Необратимое фотообесцвечивание белка mKateKFP2 при тех же условиях происходит намного медленнее. Фактически, белок mKateKFP2 не обесцвечивается даже после сотен циклов фотоактивации-фотоинактивации при заданных условиях. Контраст между фотоинактивированной и фотоактивированной формами флуоресценции для белка mKateKFP1 достигает 30 раз, для mKateKFP2- 20 раз.

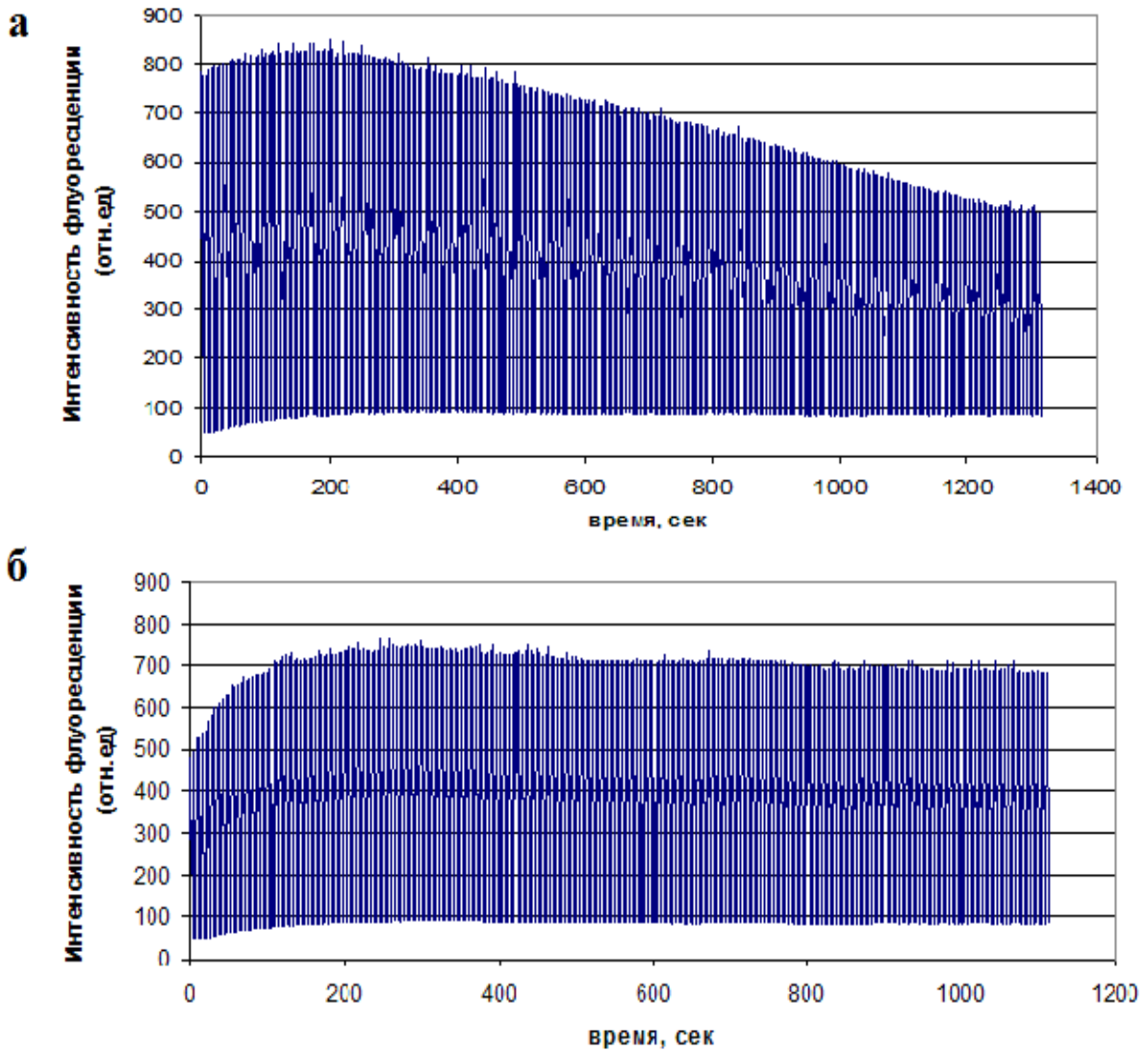


Рисунок 14. Фотоконверсия иммобилизованного на смоле белков mKateKFP1(**а**) и mKateKFP2 (**б**) синим светом (1.5 с) после облучения зеленым светом (3 с). Нижний ряд точек – потушенная флуоресценция, верхний ряд точек – восстановленная флуоресценция. Интенсивность облучения около 3 Вт/см².

Были измерены спектры поглощения, возбуждения и эмиссии флуоресценции полученных белков. Для активированной формы mKateKFP1 максимум возбуждения и эмиссии флуоресценции приходятся на 572 нм и 613 нм, соответственно. Максимум эмиссии после тушения флуоресценции составляет 602 нм (сдвиг на 11 нм).

Максимум возбуждения флуоресценции для активированной формы mKateKFP2 приходится на 580 нм, максимум эмиссии - на 605 нм. После тушения флуоресценции максимум эмиссии смещается на 2 нм влево и приходится на 603 нм.

Белки mKateKFP1 и mKateKFP2 имеют два максимума поглощения - 405 нм и 565 нм (см. рис. 15). При облучении зеленым светом, приводящим к падению яркости красного флуоресцентного сигнала, наблюдается падение пика поглощения при 405 нм и рост при 565 нм. Рост поглощения при 565 нм свидетельствует об увеличении коэффициента молярной экстинкции белка. Так как яркость флуоресценции пропорциональна произведению коэффициента молярного поглощения и квантового выхода, тушение флуоресценции данных белков объясняется одновременным и доминирующим уменьшением квантового выхода флуоресценции.

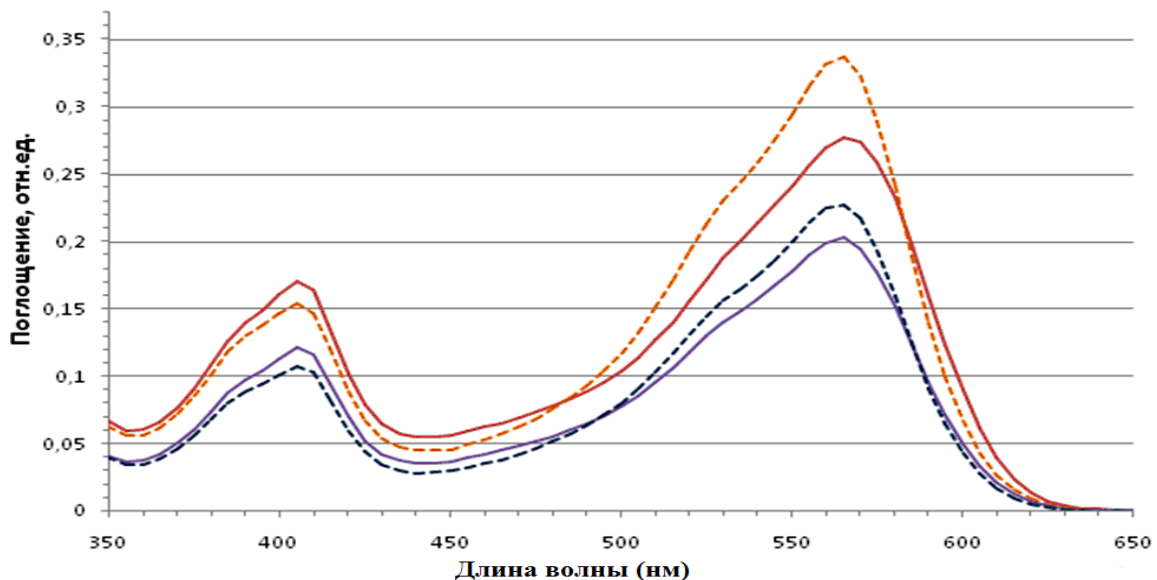


Рисунок 15. Спектры поглощения белков mKateKFP1 и mKateKFP2 до (красная сплошная и фиолетовая сплошная линии соответственно) и после (оранжевая пунктирная и синяя пунктирная линии соответственно) тушения флуоресценции зеленым светом высокой интенсивности.

Полученные белки mKateKFP1 и mKateKFP2 имеют высокий контраст, быстро тушатся и восстанавливаются. Яркость флуоресценции данных белков выше яркости флуоресценции белка KFP-НС. Данные белки не содержат замен во внешней части бета-бочонка относительно FusionRed и таким образом наследуют мономерные свойства белка-предшественника. Это делает их оптимальными фотоактивируемыми вариантами для использования в составе белков слияния.

3.3. Дальне-красный мономерный белок

На сегодняшний день цветовая палитра мономерных ФБ охватывает практически весь видимый спектр, от фиолетовой до красной его части. Единственным заметным пробелом остается ближняя инфракрасная область спектра. Недавно был описан дальне-красный мономерный ФБ TagRFP657 [116] (максимум эмиссии флуоресценции при 657 нм), разработанный на основе белка mKate. Недостатками данного белка являются низкая яркость (14% от яркости белка mKate2) и низкая скорость созревания (время полусозревания при 37°C составляет 125 мин, для белка mKate2 этот показатель составляет 48 мин). Достигнутые нами успехи в разработке красного мономерного белка FusionRed заставили нас задуматься о получении дальне-красного мономерного белка с батохромным сдвигом максимума поглощения. Такой ФБ должен сохранять мономерные свойства даже при высоких концентрациях (более 1 мг/мл), не должен быть склонным к неспецифичным взаимодействиям в живых клетках, не должен проявлять цитотоксических свойств. Важно также отметить, что белок с максимум возбуждения флуоресценции более 600 нм

может быть эффективно возбужден стандартными 633 нм или 635 нм лазерными линиями.

3.3.1 Получение дальне-красного мономерного белка

Поиск ключевых аминокислотных остатков для сайт-специфичного мутагенеза был основан на анализе кристаллической структуры белка mKate и аминокислотной последовательности белка TagRFP 657.

Для сайт-специфического мутагенеза мы выбрали следующие аминокислотные остатки, потенциально способные влиять на спектральные характеристики белка:

1. 44 аминокислотный остаток, который находится в непосредственной близости от хромофора. Следует отметить, что остаток метионина в положении 44 уже был подвергнут мутагенезу в недавно опубликованных дальне-красных флуоресцентных белках: mNeptune, полученном на основе mKate [121]; E2-Crimson, полученном на основе DsRed-Express2 [122, 123]; eqFP650 и eqFP670, полученные в нашей лаборатории на основе белка Katushka 9-5 [124] ; белок TagRFP657 также несет замену в 44 положении [116].

2. 69 и 152 аминокислотные остатки. Исходя из выравнивания аминокислотных последовательностей флуоресцентных белков, боковая цепь аминокислоты в 69 и 152 положениях обращена внутрь белковой глобулы и ориентирована на хромофор.

3. 148, 165, 167 и 203 аминокислотные остатки. Природа этих аминокислотных остатков обуславливает смещение равновесия между анионной и протонированной формами хромофора, его изомеризацию (*цис-*

или *транс*-) и определяет нековалентные взаимодействия, влияющие на степень поляризации хромофора. Так, разработанный ранее в нашей лаборатории дальне-красный флуоресцентный белок eqFP670 на основе белка Katushka9-5 подвергся заменам по 148 и 165 положениям. Введение замены 203Y - ароматическое кольцо остатка тирозина в положении 203 способно входить в стэкинг-взаимодействие с системой сопряжённых связей хромофора и смещать спектр эмиссии белка в длинноволновую область спектра.

4. 181 аминокислотный остаток, который находится в непосредственной близости от хромофорной группы. Мы предположили, по опыту работы с FusionRed, что замена L181F может увеличить яркость флуоресценции.

Для получения библиотеки с аминокислотными заменами M44QEC, K69HN, S148HN, L152M, A165T, M167ML, L181F, R203YF (всего 48 вариантов) мы провели серию сайт-специфичных ПЦР-мутагенезов (см. раздел 2.2.14.5).

На этом этапе работы нашей основной задачей являлся отбор вариантов, обладающих максимумами эмиссии флуоресценции, сдвинутыми в дальне-красную область видимой части спектра. Отбор вариантов, характеризующихся батохромным сдвигом относительно белка FusionRed, проводили с использованием бинокюляра Olympus SZX-12 с соответствующим набором светофильтров. Спектры эмиссии флуоресценции мутантных вариантов, обладавших наиболее яркой флуоресценцией в дальне-красной области, снимали с помощью спектрофотометра SMS2VIS. Самый яркий вариант содержал следующие аминокислотные замены: M44Q, K69H, S148H, L152M, A165T, M167L, L181F, R203Y. Полученный белок характеризуется сильным батохромным сдвигом как спектра возбуждения (пик 610 нм), так и спектра эмиссии флуоресценции (пик 657 нм).

Для оптимизации яркости и скорости созревания полученного варианта, мы решили провести несколько раундов случайного мутагенеза для последующего отбора вариантов с дополнительными заменами в окружении хромофора.

На первом раунде нами было подвергнуто скринингу порядка 10,000 индивидуальных клонов. Было отобрано 12 наиболее ярких клонов с максимумами эмиссии флуоресценции в диапазоне от 653 нм до 660 нм. По результатам секвенирования мы отобрали 4 варианта, не содержащих нежелательных внешних (потенциально димеризующих) замен.

На основе этих четырех вариантов был проведен второй раунд случайного мутагенеза. На этом этапе было отобрано 16 клонов. По результатам секвенирования было отобрано 4 варианта не содержащих нежелательных потенциально димеризующих замен. Для этих клонов были выделены рекомбинантные белки. Полученные варианты мы сравнили по яркости флуоресценции и скорости созревания. Лучший вариант по этим показателям получил название FusionRed-657. Он содержит дополнительные аминокислотные замены S31C и E210G, возникшие в ходе случайного мутагенеза.

Мы определили спектральные характеристики белка FusionRed-657. Измерили спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции. Спектры имеют узкую форму пиков. Максимум возбуждения флуоресценции составил 609 нм, а максимум эмиссии- 657нм (см. рис. 16).

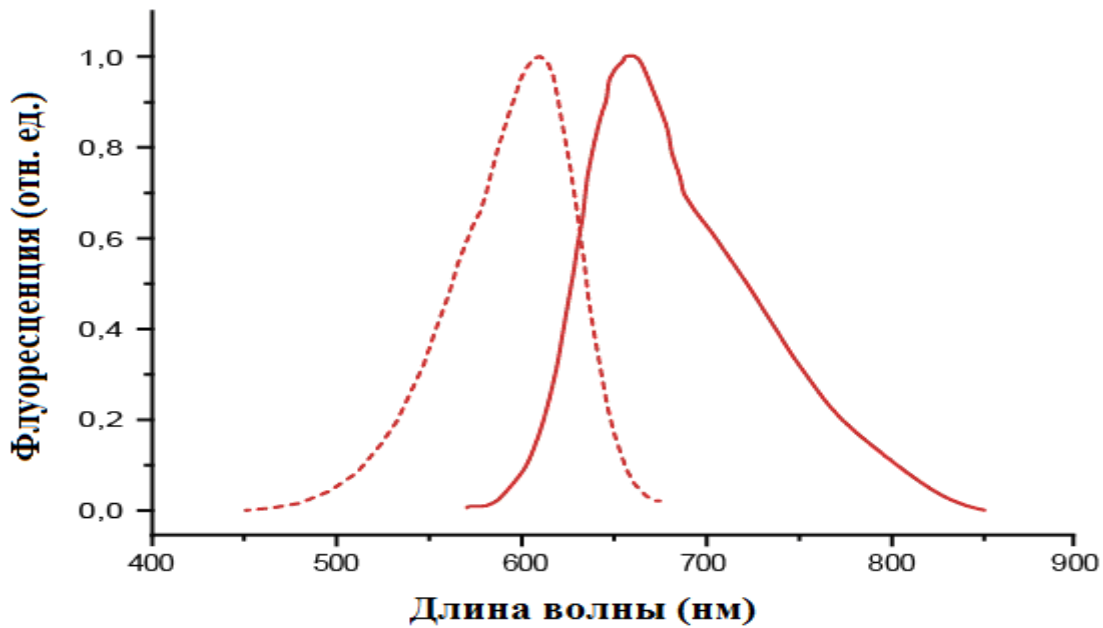


Рисунок 16. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции FusionRed-657R (пунктирная и прямая красная линии соответственно).

Для полученного белка были определены коэффициент молярной экстинкции и квантовый выход флуоресценции. Коэффициент молярной экстинкции для белка FusionRed-657 составил $43,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Для расчета квантового выхода флуоресценции данного белка были измерены спектры поглощения и эмиссии флуоресценции при комнатной температуре и соотнесены с белком TagRFP657, для которого квантовый выход флуоресценции составляет 0.1. Было определено, что квантовый выход флуоресценции для белка FusionRed-657 составляет 0.06 (см. табл. 2).

Таблица 2. Сравнение некоторых свойств белков FusionRed, mKate2, TagRFP657 и FusionRed-657

| Белок | Максимумы возб./эмис., (нм) | QY | EC (M ⁻¹ см ⁻¹) |
|-------------------|-----------------------------------|------|---|
| FusionRed | 574/610 | 0.19 | 94,500 |
| mKate2 | 588/635 | 0.4 | 62,500 |
| TagRFP657 | 611/657 | 0.1 | 34,000 |
| FusionRed- 657 | 609/657 | 0.06 | 43,000 |

QY – квантовый выход флуоресценции; EC- коэффициент молярной экстинкции при максимуме возбуждения.

Следующим этапом нашей работы стало тестирование белка FusionRed-657 *in vivo*. Для тестирования белка FusionRed-657 в клетках млекопитающих была получена нуклеотидная последовательность данного белка под контролем CMV-промотора. Мы провели ряд трансфекций клеток линии HeLa. При экспрессии в живых клетках FusionRed-657 унаследовал низкотоксичные свойства белка-предшественника. Детектируемый дальне-красный флуоресцентный сигнал появлялся через 24 часа после трансфекции, что свидетельствует о довольно быстром созревании полученного белка в клетках млекопитающих. Через три дня после трансфекции мы не наблюдали формирования белковых агрегатов (см. рис. 17). Таким образом, при экспрессии белка FusionRed-657 в клетках млекопитающих негативных эффектов не наблюдается.

Для проверки возможности использования полученного дальне-красного белка для мечения белков слияния мы использовали модель

визуализации β -актина. Для этого нами была получена химерная конструкция FusionRed-657- β -актин. После проведения трансфекций клеток линии HeLa полученной рекомбинантной плазмидой, мы наблюдали специфичное мечение актиновых филаментов (см. рис. 17). Однако следует признать, что относительная яркость флуоресцентного сигнала была недостаточна для надежного использования FusionRed-657 в составе белков слияния, и требуется дальнейшая работа по усовершенствованию этого варианта.

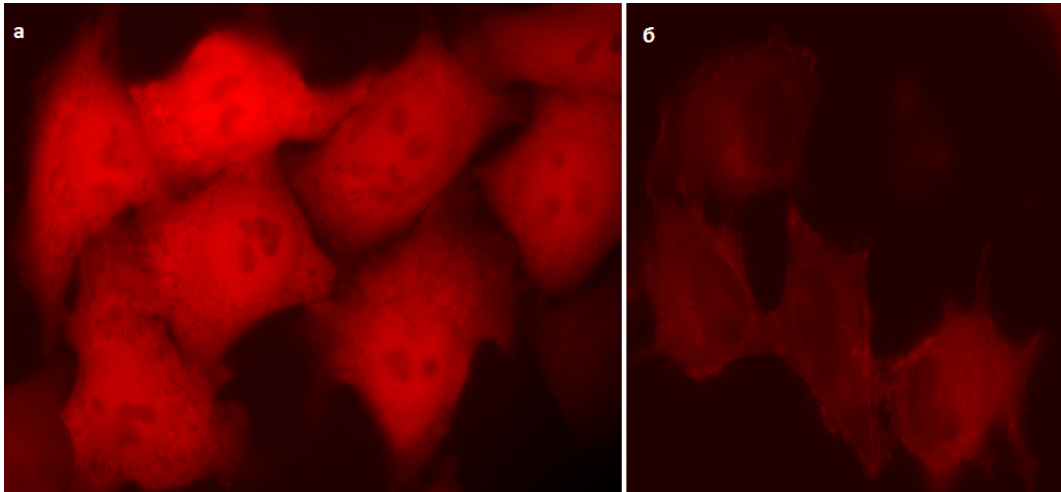


Рисунок 17. Белок FusionRed-657 в живых клетках.

а. Клетки линии HeLa, трансфицированные рекомбинантной плазмидой pFusionRed-657, 3 дня после трансфекции **б.** Клетки линии HeLa, трансфицированные рекомбинантной плазмидой p FusionRed-657- β -actin, 48 часов после трансфекции.

| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 |
|------------|-----------------|-----------------|----------------|-------|---------------|
| avGFP | MSKGEELFTGVVPI | LVELDGDVNGHKFSV | SGEGEGDATYGKLT | LKFI | CTTG-KLPVPWPT |
| DsRed | MRSSKNVIKEFMRFK | VRMEGTVNGHEFEI | EGEGEGRPYEGHNT | VKLVK | TGGPLPFAWDI |
| eqFP578 | MSELIKENMHMKLY | MEGTVNNHHFKCT | SEGERKPYEGTQTM | KIKV | VEGGPLPFAFDI |
| TagRFP | MSELIKENMHMKLY | MEGTVNNHHFKCT | SEEGGKPYEGTQTM | RIVV | VEGGPLPFAFDI |
| mKate | MSELIKENMHMKLY | MEGTVNNHHFKCT | SEEGGKPYEGTQTM | RIVV | VEGGPLPFAFDI |
| mKate2 | MVSELIKENMHMKLY | MEGTVNNHHFKCT | SEEGGKPYEGTQTM | RIVV | VEGGPLPFAFDI |
| mKate2.5 | MVSELIKENMHMKLY | MEGTVNNHHFKCT | SEEGGKPYEGTQTM | RIVV | VEGGPLPFAFDI |
| FusionRed | MVSELIKENMPMKLY | MEGTVNNHHFKCT | SEEGGKPYEGTQTM | RIVV | VEGGPLPFAFDI |
| mKateKFP1 | MVSELIKENMPMKLY | MEGTVNNHHFKCT | SEEGGKPYEGTQTM | RIVV | VEGGPLPFAFDI |
| mKateKFP2 | MVSELIKENMPMKLY | MEGTVNNHHFKCT | SEEGGKPYEGTQTM | RIVV | VEGGPLPFAFDI |
| FusRed-657 | MVSELIKENMPMKLY | MEGTVNNHHFKCT | CEGEGKPYEGTQTC | RIVV | VEGGPLPFAFDI |

| | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 |
|------------|-----------------|----------------|----------------|--------------|-------|---------------|
| avGFP | LVTTFSYGVCFSRYP | PDHMKQHDFFKSAM | PEGYVQERTIFFFK | DDGNYKTRAEV | KFE | GDT |
| DsRed | LSPQFQYGSKVYVK | HAPADIP--DYK | KLSP | PEGFKWERVMNF | EDGGV | LTATQDSSLQDGC |
| eqFP578 | LATSFMYGSKTFIN | HHTQGIP--DLF | KQSF | PEGFTWERITTY | EDGGV | LATQDTSLQNGC |
| TagRFP | LATSFMYGSRFTIN | HHTQGIP--DFF | KQSF | PEGFTWERVTTY | EDGGV | LATQDTSLQDGC |
| mKate | LATSFMYGSKTFIN | HHTQGIP--DFF | KQSF | PEGFTWERVTTY | EDGGV | LATQDTSLQDGC |
| mKate2 | LATSFMYGSKTFIN | HHTQGIP--DFF | KQSF | PEGFTWERVTTY | EDGGV | LATQDTSLQDGC |
| mKate2.5 | LATSFMYGSKTFIN | HHTQGIP--DFF | KQSF | PEGFTWERVTTY | EDGGV | LATQDTSLQDGC |
| FusionRed | LATSFMYGSRTFI | KHPPGIP--DFF | KQSF | PEGFTWERVTTY | EDGGV | LATQDTSLQDGC |
| mKateKFP1 | LATSFMYGSRTFI | KHPPGIP--DFF | KQSF | PEGFTWERVTTY | EDGGV | LATQDTSLQDGC |
| mKateKFP2 | LATSFMYGSRTFI | KHPPGIP--DFF | KQSF | PEGFTWERVTTY | EDGGV | LATQDTSLQDGC |
| FusRed-657 | LATSFMYGSRTFI | KHPPGIP--DFF | KQSF | PEGFTWERVTTY | EDGGV | LATQDTSLQDGC |

| | 120 | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 |
|------------|--------------|--------------|-----------|-------------|----------|---------------|
| avGFP | LVNRIELKGI | DFKEDGNILGHK | LEYNYN | SHNVYIMADKQ | KNGIKVNF | KIRHNI |
| DsRed | FIYKVKFIGVNF | PSDGPVMQKKT | M-GWEAS | TERLYPR--D | GVLKGEI | HKALKLKDGGHYL |
| eqFP578 | LIYNV | KINGVNFPS | NGSVMQKKT | L-GWEAN | TEMLYP | A--DGGLRGHSQ |
| TagRFP | LIYNV | KIRGVNFPS | NGPVMQKKT | L-GWEAN | TEMLYP | A--DGGLEGRSD |
| mKate | LIYNV | KIRGVNFPS | NGPVMQKKT | L-GWEAS | TEMLYP | A--DGGLEGRSD |
| mKate2 | LIYNV | KIRGVNFPS | NGPVMQKKT | L-GWEAS | TEMLYP | A--DGGLEGRSD |
| mKate2.5 | LIYNV | KIRGVNFPA | NGPVMQKKT | L-GWEAS | TETLYP | A--DGGLEGRSD |
| FusionRed | LIYNV | KIRGVNFPA | NGPVMQKKT | L-GWEAS | TETLYP | A--DGGLEGRSD |
| mKateKFP1 | LIYNV | KIRGVNFPA | NGPVMQKKT | L-GWEAS | TETLYP | A--DGGLEGRSD |
| mKateKFP2 | LIYNV | KIRGVNFPA | NGPVMQKKT | L-GWEAS | TETLYP | A--DGGLEGRSD |
| FusRed-657 | LIYNV | KIRGVNFPA | NGPVMQKKT | L-GWEAS | TETLYP | A--DGGLEGRSD |

| | 180 | 190 | 200 | 210 | 220 | 230 |
|------------|--------------|--------------|-------------|------------|------------|----------------|
| avGFP | ADHYQONTPIGD | -GPVLLPDNHYL | STQSALS | KDPNEKRDHM | VLL | EFVTAAGIT |
| DsRed | VEFKSIYMAK | KP---VQLPG | YVYVDSKLDIT | SH-NEDY | TIVEQYERTE | GRHHLFL |
| eqFP578 | CSFKTTYRSK | KPAK | NLKM | PGVYVDHRL | RIKE-ADK | ETYVEQHEVAVARY |
| TagRFP | CNFKTTYRSK | KPAK | NLKM | PGVYVDHRL | RIKE-ADK | ETYVEQHEVAVARY |
| mKate | CNLKTTYRSK | KPAK | NLKM | PGVYVDHRL | RIKE-ADK | ETYVEQHEVAVARY |
| mKate2 | CNLKTTYRSK | KPAK | NLKM | PGVYVDHRL | RIKE-ADK | ETYVEQHEVAVARY |
| mKate2.5 | CNLETTYRSK | KPAK | NLKM | PGVYVDHRL | RIKE-ADN | ETYVEQHEVAVARY |
| FusionRed | CNLETTYRSK | KPAT | NLKM | PGVYVDHRL | RIKE-ADN | ETYVEQHEVAVARY |
| mKateKFP1 | CNLETTYRSK | KPAT | NLKM | PGVYVDHRL | RIKE-ADN | ETYVEQHEVAVARY |
| mKateKFP2 | CNLETTYRSK | KPAT | NLKM | PGVYVDHRL | RIKE-ADN | ETYVEQHEVAVARY |
| FusRed-657 | CNLETTYRSK | KPAT | NLKM | PGVYVDHRL | RIKE-ADN | ETYVEQHEVAVARY |

Рисунок 18 . Выравнивание аминокислотных последовательностей

Структурно важные регионы отмечены серым цветом. Отмечены следующие замены аминокислотных остатков: голубым выделены мономеризующие замены; замены, увеличивающие скорость созревания белка, показаны желтым; замены микроокружения хромофора показаны зеленым. Нумерация аминокислотных остатков представлена относительно avGFP.

3. 4 Заключение

В результате данной работы мы получили и охарактеризовали четыре красных и дальне-красных мономерных флуоресцентных белка. Белок FusionRed по результатам HPLC сохраняет мономерные свойства при высоких концентрациях (10 мг/мл) и обладает низкой цитотоксичностью. Показано, что качество работы FusionRed в составе химерных конструкций с белками слияния не уступало лучшим мономерным зеленым белкам, таким как mEGFP или mEmerald.

На основе белка FusionRed были получены белки с различными спектральными характеристиками, оптимизированные для разных экспериментальных задач.

Обратимо фотоконвертируемые белки mKateKFP1 и mKateKFP2 способны ко многим сотням циклов фотопереключения без существенного фотообесцвечивания. mKateKFP1 является ярким ФБ, обладающим высоким контрастом (до 30 раз), быстро тушится и восстанавливается и может быть использован в качестве обратимо фотоконвертируемой мономерной флуоресцентной метки для локального оптического мечения, а также для микроскопии сверхвысокого разрешения. Белок mKateKFP2 немного уступает по яркости и контрасту mKateKFP1.

Сайт-специфический мутагенез M44C, R69H, S148H, C165T, M167L, L181F и H203Y в сочетании с найденными в ходе случайного мутагенеза заменами S31C и E210G привели к получению дальне-красного белка FusionRed-657. Показана применимость белка FusionRed-657 для мечения белков слияния.

Во всех трех случаях отсутствуют внешние (потенциально димеризующие) аминокислотные замены относительно белка FusionRed

(см. рис. 18), следовательно, мономерные и низкотоксичные свойства белка FusionRed не должны были измениться.

Полученные флуоресцентные белки могут быть полезны в качестве маркеров для мечения белков в живых клетках, в том числе при многоцветовом мечении и микроскопии сверхвысокого разрешения, а также, мы надеемся, послужат основой для разработки новых улучшенных вариантов ФБ и биосенсоров.

Выводы

1. Получен и охарактеризован красный флуоресцентный белок FusionRed, сохраняющий мономерные свойства даже при высоких концентрациях.
2. Показано, что качество работы белка FusionRed в составе белков слияния не уступает зеленым мономерным белкам. Показано преимущество белка FusionRed по сравнению с другими красными мономерными флуоресцентными белками *in vivo*: FusionRed демонстрирует низкую цитотоксичность и низкую склонность к агрегации.
3. Получены обратимо фотоконвертируемые белки на основе FusionRed, изучены их фотоактивационные свойства. Установлено, что замены R69K, S148N и C179A обуславливают эффект обратимой фотоактивации данных белков.
4. Получен и охарактеризован дальне-красный мономерный флуоресцентный белок с батохромным сдвигом максимума поглощения - FusionRed-657.

Список литературы

1. Prasher, D.C., et al., *Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein*. Gene, 1992. **111**(2): p. 229-33.
2. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.
3. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
4. Shagin, D.A., et al., *GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity*. Mol Biol Evol, 2004. **21**(5): p. 841-50.
5. Lukyanov, K.A., et al., *Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog*. J Biol Chem, 2000. **275** (**34**): p. 25879-25882.
6. Matz, M.V., et al., *Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 969-73.
7. Verkhusha, V.V. and K.A. Lukyanov, *The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 289-96.
8. Perozzo, M.A., et al., *X-ray diffraction and time-resolved fluorescence analyses of Aequorea green fluorescent protein crystals*. J Biol Chem, 1988. **263**(16): p. 7713-6.

9. Yang, F., L.G. Moss, and G.N. Phillips, Jr., *The molecular structure of green fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 1996. **14**(10): p. 1246-51.
10. Phillips, G.N., Jr., *Structure and dynamics of green fluorescent protein*. Curr Opin Struct Biol, 1997. **7**(6): p. 821-7.
11. Ormo, M., et al., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1392-5.
12. Cody, C.W., et al., *Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein*. Biochemistry, 1993. **32**(5): p. 1212-8.
13. Ward, W.W., *Biochemical and physical properties of green fluorescent protein*. Methods Biochem Anal, 2006. **47**: p. 39-65.
14. Niwa, H., et al., *Chemical nature of the light emitter of the Aequorea green fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13617-22.
15. Reid, B.G. and G.C. Flynn, *Chromophore formation in green fluorescent protein*. Biochemistry, 1997. **36**(22): p. 6786-91.
16. Зубова, Н.Н., А.Ю. Булавина, and С.А. П., *Спектральные и физико-химические свойства зелёного (GFP) и красного (drFP583) флуоресцирующих белков*. Успехи биологической химии, 2003. **43**: p. 163-224.
17. Labas, Y.A., et al., *Diversity and evolution of the green fluorescent protein family*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(7): p. 4256-61.
18. Salih, A., et al., *Fluorescent pigments in corals are photoprotective*. 2000. **408**: p. 850-853.

19. Bogdanov, A.M., et al., *Green fluorescent proteins are light-induced electron donors*. Nat Chem Biol, 2009. **5**(7): p. 459-61.
20. Johnson, F.H., et al., *Quantum efficiency of Cypridina luminescence, with a note on that of Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **60**: p. 85–103.
21. Ward, W.W. and M.J. Cormier, *In vitro energy-transfer in Renilla bioluminescence*. J Phys Chem, 1976. **80**: p. 2289–2291.
22. Morin, J.G. and J.W. Hastings, *Energy transfer in a bioluminescent system*. J Cell Physiol, 1971. **77**(3): p. 313-8.
23. Morise, H., et al., *Intermolecular energy-transfer in bioluminescent system of Aequorea*. Biochemistry, 1974. **13**: p. 2656–2662.
24. Partridge, J.C., *The colour sensitivity and vision of fishes*. In: *Light and Life in the Sea*. Cambridge Univ. Press, 1990: p. 167–184.
25. Marshall, N.J., T.W. Cronin, and T.M. Frank, *Visual adaptations in crustaceans: chromatic, developmental, and temporal aspects*. In: *Sensory Processing in Aquatic Environments*. New York: Springer,, 2003: p. 343–372.
26. Chudakov, D.M., S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov, *Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging*. Trends Biotechnol, 2005. **23**(12): p. 605-13.
27. Mirabella, R., et al., *Use of the fluorescent timer DsRED-E5 as reporter to monitor dynamics of gene activity in plants*. Plant Physiol., 2004. **135**(4): p. 1879-87.
28. Lidsky, P.V., et al., *Nucleocytoplasmic traffic disorder induced by cardioviruses*. J Virol, 2006. **80**(6): p. 2705-17.

29. Czirok, A., et al., *Elastic fiber macro-assembly is a hierarchical, cell motion-mediated process*. J Cell Physiol. , 2006. **207(1)**: p. 97-106.
30. Solimena, M. and H.H. Gerdes, *Secretory granules: and the last shall be first*. Trends Cell Biol, 2003. **13(8)**: p. 399-402.
31. Terskikh, A., et al., *"Fluorescent timer": protein that changes color with time*. Science, 2000. **290(5496)**: p. 1585-8.
32. Miyatsuka, T., et al., *Chronological analysis with Fluorescent Timer reveals unique features of newly generated β cells*. Diabetes, 2014. **16**: p. pii: DB_131312.
33. Zhang, S., C. Ma, and M. Chalfie, *Combinatorial marking of cells and organelles with reconstituted fluorescent proteins*. Cell, 2004. **119**: p. 137-144.
34. Olenych, S.G., et al., *The fluorescent protein color palette*. Curr Protoc Cell Biol, 2007. **Chapter 21**: p. Unit 21 5.
35. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann Physik 1948. **55**: p. 437.
36. Piston, D.W. and G.J. Kremers, *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly*. Trends Biochem Sci 2007. **32**: p. 407-414.
37. Siegel, R.M., et al., *Measurement of molecular interactions in living cells by fluorescence resonance energy transfer between variants of the green fluorescent protein*. Sci STKE, 2000. **2000**: p. PL1.
38. Schultz, C., et al., *Multiparameter imaging for the analysis of intracellular signaling*. Chembiochem, 2005. **6**: p. 1323-1330.

39. Phair, R.D. and T. Misteli, *High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus*. Nature, 2000. **404**: p. 604–609.
40. Bastiaens, P.I. and A. Squire, *Fluorescence lifetime imaging microscopy: spatial resolution of biochemical processes in the cell*. Trends Cell Biol., 199. **9(2)**: p. 48-52.
41. Rusanov, A.L., et al., *Lifetime imaging of FRET between red fluorescent proteins*. J Biophotonics, 2010. **3(12)**: p. 774-83.
42. Lippincott-Schwartz, J., N. Altan-Bonnet, and G.H. Patterson, *Photobleaching and photoactivation: following protein dynamics in living cells*. Nat Cell Biol, 2003. **Suppl**: p. S7-14.
43. Patterson, G.H. and J. Lippincott-Schwartz, *A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells*. Science, 2002. **297(5588)**: p. 1873-7.
44. Chudakov, D.M., et al., *Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking*. Nat Biotechnol, 2004. **22(11)**: p. 1435-9.
45. Chudakov, D.M., et al., *Kindling fluorescent proteins for precise in vivo photolabeling*. Nat Biotechnol, 2003. **21(2)**: p. 191-4.
46. Ando, R., H. Mizuno, and A. Miyawaki, *Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting*. Science, 2004. **306(5700)**: p. 1370-3.
47. Henderson, J.N., et al., *Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue*. Proc Natl Acad Sci USA, 2007. **104(16)**: p. 6672-6677.

48. Stiel, A.C., et al., *Generation of monomeric reversibly switchable red fluorescent proteins for far-field fluorescence nanoscopy*. *Biophys J*, 2008. **95(6)**: p. 2989-2997.
49. Lukyanov, K.A., et al., *Innovation: Photoactivatable fluorescent proteins*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005. **6(11)**: p. 885-891.
50. Hoffman, R.M., *The multiple uses of fluorescent proteins to visualize cancer in vivo*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5(10)**: p. 796-806.
51. Zhang, L., et al., *Identification of the amino acid residues responsible for the reversible photoconversion of the monomeric red fluorescent protein TagRFP*. *RGBC*, 2010. **36 (2)**: p. 179-184.
52. Fradkov, A.F., et al., *Far-red fluorescent tag for protein labelling*. *Biochem J*, 2002. **368(Pt 1)**: p. 17-21.
53. Shcherbo, D., et al., *Far-red fluorescent tags for protein imaging in living tissues*. *Biochem J*, 2009. **418(3)**: p. 567-74.
54. Heim, R., A.B. Cubitt, and R.Y. Tsien, *Improved green fluorescence*. *Nature*, 1995. **373**: p. 663-664.
55. Verkhusha, V.V., et al., *Common pathway for the red chromophore formation in fluorescent proteins and chromoproteins*. *Chem Biol*, 2004. **11(6)**: p. 845-54.
56. Cubitt, A.B., et al., *Trends Biochem Sci* 1995. **20**: p. 448-455.
57. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. 1998. **67**: p. 509-544.
58. Tomosugi, W., et al., *An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity*. *Nat Methods*, 2009. **6(5)**: p. 351-3.

59. Stephens, D.J. and V.J. Allan, *Light microscopy techniques for live cell imaging*. Science, 2003. **300**: p. 82-86.
60. Patterson, G.H., et al., *Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy*. Biophys J, 1997. **73**(5): p. 2782-90.
61. Heim, R. and R.Y. Tsien, *Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer*. Curr Biol, 1996. **6**(2): p. 178-82.
62. Miyawaki, A., et al., *Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin*. Nature, 1997. **388**(6645): p. 882-7.
63. Rehm, M., et al., *Single-cell fluorescence resonance energy transfer analysis demonstrates that caspase activation during apoptosis is a rapid process. Role of caspase-3*. J Biol Chem., 2002. **277**(27): p. 24506-14.
64. Persechini, A., J.A. Lynch, and V.A. Romoser, *Novel fluorescent indicator proteins for monitoring free intracellular Ca²⁺*. Cell Calcium. **22**(3): p. 209-16.
65. Mena, M.A., et al., *Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(12): p. 1569-71.
66. Ai, H.W., et al., *Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins*. Biochemistry, 2007. **46**(20): p. 5904-10.
67. Kremers, G.J., et al., *Improved green and blue fluorescent proteins for expression in bacteria and mammalian cells*. 2007. **46**: p. 3775-3783.

68. Shaner, N.C., G.H. Patterson, and M.W. Davidson, *Advances in fluorescent protein technology*. J Cell Sci 2007. **120**: p. 4247–4260.
69. Subach, O.M., et al., *Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mTagBFP and TagRFP fluorescent proteins*. Chem Biol 2010. **17**: p. 333-341.
70. Subach, O.M., et al., *Structural characterization of acylimine-containing blue and red chromophores in mTagBFP and TagRFP fluorescent proteins*. Chem Biol., 2010. **17(4)**: p. 333-41.
71. Subach, O.M., et al., *An enhanced monomeric blue fluorescent protein with the high chemical stability of the chromophore*. PLoS ONE, 2011. **6**: p. e28674.
72. Heim, R., D.C. Prasher, and R.Y. Tsien, *Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci USA, 1994. **91**: p. 12501–12504.
73. Cubitt, A.B., L.A. Woollenweber, and R. Heim, *Understanding structure-function relationships in the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Methods Cell Biol, 1999. **58**: p. 19-30.
74. Rizzo, M.A., et al., *An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET*. Nat Biotechnol, 2004. **22(4)**: p. 445-9.
75. Kremers, G.J., et al., *Improved green and blue fluorescent proteins for expression in bacteria and mammalian cells*. Biochemistry, 2007. **46**: p. 3775–3783.
76. Goedhart, J., et al., *Bright cyan fluorescent protein variants identified by fluorescence lifetime screening*. Nat Methods, 2010. **7(2)**: p. 137-9.

77. Ai, H.W., et al., *Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of Clavularia cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging*. *Biochem J*, 2006. **400**(3): p. 531-40.
78. Topol, I., J. Collins, and A. Nemukhin, *Modeling spectral tuning in monomeric teal fluorescent protein mTFP1*. *Biophys Chem.*, 2010. **149**(3): p. 78-82.
79. Yang, T.T., L. Cheng, and S.R. Kain, *Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein*. *Nucleic Acids Res* 1996. **24**: p. 4592-4593.
80. Zacharias, D.A., et al., *Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells*. *Science*, 2002. **296**(5569): p. 913-6.
81. Matsuda, T., A. Miyawaki, and T. Nagai, *Direct measurement of protein dynamics inside cells using a rationally designed photoconvertible protein*. *Nat Methods*, 2008. **5**(4): p. 339-45.
82. Gurskaya, N.G., et al., *A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants*. *Biochem J.* , 2003. **373**(Pt 2): p. 403-8.
83. Karasawa, S., et al., *A green-emitting fluorescent protein from *Galaxeidae* coral and its monomeric version for use in fluorescent labeling*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(36): p. 34167-71.
84. Kaida, A. and M. Miura, *Differential dependence on oxygen tension during the maturation process between monomeric Kusabira Orange 2 and monomeric Azami Green expressed in HeLa cells*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2012. **421**(4): p. 855-9.

85. Ai, H.W., et al., *Hue-shifted monomeric variants of Clavularia cyan fluorescent protein: identification of the molecular determinants of color and applications in fluorescence imaging*. BMC Biol. , 2008. **6**: p. 13.
86. Subach, O.M., et al., *Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe*. Chem Biol 2008. **15**: p. 1116–1124.
87. Kremers, G.J., et al., *Cyan and yellow super fluorescent proteins with improved brightness, protein folding, and FRET Förster radius*. Biochemistry, 2006. **45(21)**
p. 6570-80.
88. Griesbeck, O., et al., *Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications*. J Biol Chem, 2001. **276(31)**: p. 29188-94.
89. Nagai, T., et al., *A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications*. Nat Biotechnol, 2002. **20(1)**: p. 87-90.
90. Rekas, A., J. Alattia, and A. Miyavaki, *Crystal Structure of Venus, a Yellow Fluorescent Protein with Improved Maturation and Reduced Environmental Sensitivity*. The Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**: p. 50573-50578.
91. Nguyen, A.W. and P.S. Daugherty, *Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET*. Nat Biotechnol, 2005. **23(3)**: p. 355-60.
92. Shcherbo, D., et al., *Practical and reliable FRET/FLIM pair of fluorescent proteins*. BMC Biotechnol. , 2009. **9**: p. 24.

93. Karasawa, S., et al., *Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer*. *Biochem J*, 2004. **381**(Pt 1): p. 307-12.
94. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(12): p. 1567-72.
95. Sakaue-Sawano, A., et al., *Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression*. *Cell*, 2008. **132**: p. 487-498.
96. Shaner, N.C., et al., *Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins*. *Nat Methods*, 2008. **5**(6)(545-51).
97. Gross, L.A., et al., *The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(22): p. 11990-5.
98. Wall, M.A., M. Socolich, and R. Ranganathan, *The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed*. *Nat Struct Biol*, 2000. **7**(12): p. 1133-8.
99. Yarbrough, D., et al., *Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(2): p. 462-7.
100. Wiehler, J., I.J. von Humme, and B. Steipe, *Mutants of *Discosoma* red fluorescent protein with a GFP-like chromophore*. *FEBS Lett.*, 2010. **487**: p. 384-389.
101. He, X., A.F. Bell, and P.J. Tonge, *Synthesis and spectroscopic studies of model red fluorescent protein chromophores*. *Org. Lett.*, 2002. **4**: p. 1523-1526.

102. Bevis, B.J. and B.S. Glick, *Rapidly maturing variants of the Discosoma red fluorescent protein (DsRed)*. Nat Biotechnol, 2002. **20**(1): p. 83-7.
103. Strack, R.L., et al., *A noncytotoxic DsRed variant for whole-cell labeling*. Nat Methods, 2008. **5**: p. 955-957.
104. Campbell, R.E., et al., *A monomeric red fluorescent protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(12): p. 7877-82.
105. Wang, L., et al., *Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(48): p. 16745-9.
106. Shaner, N.C., P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien, *A guide to choosing fluorescent proteins*. Nat Methods, 2005. **2**(12): p. 905-909.
107. Laurent, A.D., et al., *Exploring structural and optical properties of fluorescent proteins by squeezing: modeling high-pressure effects on the mStrawberry and mCherry red fluorescent proteins*. J Phys Chem B, 2012. **116**(41): p. 12426-40.
108. Verkhusha, V.V. and A. Sorkin, *Conversion of the monomeric red fluorescent protein into a photoactivatable probe*. Chem Biol. , 2005. **12**(3): p. 279-85.
109. Wiedenmann, J., et al., *A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from Entacmaea quadricolor (Anthozoa, Actinaria)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(18): p. 11646-51.
110. Kredel, S., et al., *mRuby, a bright monomeric red fluorescent protein for labeling of subcellular structures*. 2009. **4**(2): p. e4391.
111. Merzlyak, E.M., et al., *Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime*. Nat Methods, 2007. **4**(7): p. 555-7.

112. Snaith, H.A., et al., *New and old reagents for fluorescent protein tagging of microtubules in fission yeast; experimental and critical evaluation*. *Methods Cell Biol.*, 2010. **97**: p. 147-72.
113. Pletneva, N.V., et al., *Crystallographic study of red fluorescent protein eqFP578 and its far-red variant Katushka reveals opposite pH-induced isomerization of chromophore*. *Protein Sci*, 2011. **20(7)**: p. 1265-74.
114. Shcherbo, D., et al., *Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging*. *Nat Methods*, 2007. **4(9)**: p. 741-6.
115. Pletnev, S., et al., *A crystallographic study of bright far-red fluorescent protein mKate reveals pH-induced cis-trans isomerization of the chromophore*. *J Biol Chem*, 2008.
116. Morozova, K.S., et al., *Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy*. *Biophys J.* , 2010. **99(2)**: p. L13-5.
117. Piatkevich, K.D., et al., *Extended Stokes shift in fluorescent proteins: chromophore-protein interactions in a near-infrared TagRFP675 variant*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 1847.
118. Martynova, N., et al., *Patterning the forebrain: FoxA4a/Pintallavis and Xvent2 determine the posterior limit of Xanf1 expression in the neural plate*. *Development*, 2004. **131(10)**: p. 2329-38.
119. Shemiakina, I.I., et al., *A monomeric red fluorescent protein with low cytotoxicity*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 1204.

120. Bogdanov, A.M., et al., *Cell culture medium affects GFP photostability: a solution*. Nat Methods, 2009. **6(12)**: p. 859-60.
121. Lin, M.Z., et al., *Autofluorescent proteins with excitation in the optical window for intravital imaging in mammals*. Chem Biol, 2009. **16(11)**: p. 1169-79.
122. Strack, R.L., et al., *A rapidly maturing far-red derivative of DsRed-Express2 for whole-cell labeling*. Biochemistry, 2009.
123. Strack, R.L., R.J. Keenan, and B.S. Glick, *Noncytotoxic DsRed derivatives for whole-cell labeling*. Methods Mol Biol, 2010. **699**: p. 355-70.
124. Shcherbo, D., et al., *Near-infrared fluorescent proteins*. Nat Methods, 2010. **7(10)**: p. 827-9.