

Федеральное государственное учреждение  
«Федеральный исследовательский центр  
«Фундаментальные основы биотехнологии»  
Российской академии наук»  
Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН

*На правах рукописи*

МАРЫНИЧ НАДЕЖДА КОНСТАНТИНОВНА

«Изучение FRET-пар с нефлуоресцирующими акцепторами»

1.5.4. Биохимия

**Диссертация**

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:  
доктор химических наук,  
профессор А.П. Савицкий

Москва – 2024

## Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение.....	6
Глава 1. Обзор литературы.....	11
1.1 Фотопревращения флуоресцентных белков.....	12
1.1.1. Фотоактивируемые флуоресцентные белки .....	13
1.1.2. Фотоконвертируемые флуоресцентные белки .....	14
1.1.3 Фотопереключаемые флуоресцентные белки.....	23
1.1.4. Бифотохромные флуоресцентные белки.....	26
1.2. Роль а.о. цистеина в фолдинге и созревании флуоресцентных белков .....	34
1.3. Хромопротеины .....	35
1.4. Возгорающиеся красные флуоресцентные белки.....	36
1.5. FRET-пары флуоресцентных белков .....	37
1.6. Апоптоз.....	40
1.6.1. Внешний путь .....	42
1.6.2. Внутренний путь.....	43
1.6.3. ЭР стресс-индуцированный путь .....	44
1.6.4 Субстраты каспазы 3 .....	45
1.7. Созревание ФБ в клетках млекопитающих .....	47
Глава 2. Материалы и методы .....	51
2.1 Материалы .....	51
2.2 Общие методики .....	54
2.3 Хроматографические методы .....	63
2.4 Спектральные методы .....	66
Глава 3. Результаты и обсуждение .....	71
3.1 Подбор оптимального хромопротеина в качестве акцептора во FRET-паре.....	71
3.2 Получение бесцистеинового варианта SAASot1 для работы в окислительных условиях клетки.....	77

3.3 Получение варианта moxSAASoti с яркой и стабильной красной формой .....	87
3.4 Улучшение созревания moxSAASoti при 37°C.....	93
3.5 Объединение замен путем случайного одновременного мутагенеза .....	100
3.6 Анализ сенсора moxSAASoti <sup>F97M/H74K</sup> -23-Ultramarine <i>in vitro</i> .....	104
3.7 Кристаллизация moxSAASoti F97M <i>in cellulose</i> .....	108
Заключение.....	116
Выводы .....	117
Список опубликованных работ по теме диссертации.....	118
Список использованной литературы .....	120

## Список сокращений

ФБ – флуоресцентные белки

ФАФБ – фотоактивируемые флуоресцентные белки

ФПФБ – фотопереключаемые флуоресцентные белки

ФКФБ – фотоконвертируемые флуоресцентные белки

ФТФБ – фототрансформируемые флуоресцентные белки

а.о. – аминокислотный остаток

PALM – фотоактивационная локализационная микроскопия  
(photoactivated localization microscopy)

pcSOFI – визуализация стохастических оптических флуктуаций,  
основанная на фотоконверсии (photoconversion stochastic optical fluctuation  
imaging)

RESOLFT – метод обратимых насыщающих оптических  
флуоресцентных переходов (reversible saturable optical fluorescence transitions)

SDS (Sodium dodecyl sulfate) – додецилсульфат натрия;

SMLM – локализационная микроскопия одиночных молекул (single  
molecule localisation microscopy)

STED – микроскопия на основе подавления спонтанного испускания  
(stimulated emission depletion microscopy)

ТАЕ (Tris-acetate-EDTA buffer) – Трис-ацетатный-ЭДТА буфер

ДТТ – дитиотреитол

ПО – программное обеспечение

СФ – спектрофотометр;

ЭР – эндонуклеаза рестрикции

DPBS – фосфатный солевой буфер Дульбекко (Dulbecco's phosphate buffered saline)

ПААГ – полиакриламидный гель

ROI – интересующая область (region of interest)

ФКС – флуктуационная корреляционная спектроскопия

## Введение

**Актуальность темы исследования.** Открытие GFP как генетически-кодируемой метки, получение палитры флуоресцентных белков, применение фототрансформируемых белков в современных методах микроскопии привело к тому, что флуоресцентный имиджинг стал важным подходом в исследовании внутриклеточных процессов. GFP-подобные флуоресцентные белки сами по себе являются интересным объектом исследования, поэтому создание оптимальной метки для применения в требуемом методе является нетривиальной задачей. Явление флуоресцентного резонансного переноса энергии между флуоресцентными белками нашло широкое применение для исследования процессов комплексообразования, фолдинга белков, а также протеазной активности. Создание эффективного, мономерного сенсора для применения во всех компартментах клетки является важной задачей. Обнаружение протеолиза является одним из самых важных применений FRET-сенсоров, поскольку роль различных протеаз в молекулярной онкологии, развитии вирусов (например, SARS-CoV-2), воспалительных процессов находится в стадии тщательного изучения и может способствовать поиску новых лекарственных мишеней.

**Степень разработанности темы исследования.** Использование FRET сенсоров, в которых в качестве донора выступает красный флуоресцентный белок позволяет работать в области спектра с наименьшим поглощением и автофлуоресценцией тканей животных. Применение в качестве акцептора не флуоресцирующих хромопротеинов исключает необходимость спектрального разделения флуоресценции донора и акцептора, что облегчает детекцию изменения FRET. Такие сенсоры позволяют детектировать ферментативную активность не только спектрофотометрически, но и на основании изменения времени жизни флуоресценции донора.

**Цели и задачи исследования.** Целью этого исследования являлась разработка методов создания FRET-сенсоров на основе фотоконвертируемого

белка SAASoti и хромопротеина на примере каспазы 3 для последующего применения в методах субдифракционной микроскопии и флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Для достижения этой цели ставились следующие задачи:

1. Получение бесцистеинового варианта SAASoti для применения в окислительных условиях клетки;
2. Подбор и характеристика хромопротеина в качестве акцептора флуоресценции;
3. Оптимизация свойств фотоконверсии SAASoti для успешного применения его красной формы в качестве донора флуоресценции;
4. Оптимизация созревания при 37 ° C SAASoti для использования его в клетках млекопитающих;
5. Получение кристаллической структуры moxSAASoti для рационального дизайна белков слияния;
6. Создание слитого белка новой формы SAASoti и хромопротеина и характеристика его свойств.

**Научная новизна.** SAASoti является уникальным бифотохромным флуоресцентным белком. Впервые он был обнаружен как фотоконвертируемый белок, затем были открыты свойства фотопереключения в диком типе белка. Это отличает его от других представителей бифотохромных белков, так как в них эти свойства были введены генно-инженерными методами. Ранее в нашей лаборатории была получена мономерная форма этого белка, успешно применявшаяся в методах PALM и ФКС. В этой работе впервые был получен бесцистеиновый вариант SAASoti, а также оптимизированы его свойства фотоконверсии и созревания при 37 ° C. Также подобран и охарактеризован мономерный акцептор флуоресценции – хромопротеин. Получена 3D структура одного из вариантов moxSAASoti.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Понимание и рациональное управлениями свойствами ФБ является важным шагом для

создания оптимальных генетически-кодируемых флуоресцентных меток. Создание мономерного и эффективного FRET-сенсора для применения в субдифракционной микроскопии и методе ФКС является началом в разработке скрининг системы для анализа динамики внутриклеточных процессов в живых клетках.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Все результаты в этой работе получены с использованием современных физико-химических и биохимических методов. Основные результаты работы были представлены в виде тезисов и докладов на следующих всероссийских и международных конференциях:

- Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020», секция «Химия», г. Москва. Марынич Н.К., Создание биосенсора на основе FRET-пары TagRFP-хромобелок: подбор оптимального хромобелка.

- VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021), Марынич Н.К., Савицкий А.П., Хренова М.Г. Выбор оптимального хромобелка в качестве акцептора во FRET паре.

- VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021). Меерович И.Г., Марынич Н.К., Грановский И.Э., Фикслер Д., Савицкий А.П. Получение комплексов на основе золотых наночастиц и FRET-сенсоров каспазы 3 на основе флуоресцентных белков.

- XXXIV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии, г. Москва, 08-11 февраля 2022 г. Марынич Н.К., Гавшина А.В., Савицкий А.П. moxSAASoti: первый бифотохромный флуоресцентный белок, устойчивый в окислительных условиях, для применения в суперразрешающей микроскопии

- VII съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2022), Хренова М.Г., А.В. Гавшина, И.Д. Соловьев, Марынич Н.К., Савицкий А.П.



Влияние динамических свойств фотопереключаемых и фотоконвертируемых белков семейства SAASoti на фотофизические и фотохимические свойства

- OASIS 8. International Conference & Exhibition on Optics & Electro-Optics, Tel-Aviv, Israel 12-13. Тель-Авив, Израиль, 12-13 декабря 2022 г. A Savitsky A.P., Solovyev I.D, Meerovich I.G., Granovsky I.E., Marynich N.K., Tuchina D.K., Konovalov A.B., Vlasov V.V., Tuchin V.V. Multimodal MRI and life-time fluorescence sensors for theranostic applications.

- 13-ая Международная научная конференция «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (БИОКАТАЛИЗ - 2023), г. Суздаль, Россия, 25-29 июня 2023. Марынич Н.К., Грановский И.Э., Савицкий А.П. Создание FRET-сенсоров флуоресцентный белок-хромопротеин для детекции активности каспазы 3 *in vitro* и *in vivo*

**Личный вклад автора.** Все результаты в работе были получены лично автором. Математическое моделирование взаимодействий в SAASoti было проведено д.ф.-м.н. Хреновой М.Г. на химическом факультете МГУ им. М.В. Ломоносова. Генетические конструкции хромопротеинов были получены компанией SynBio Technologies (Китай), конструкция pET22b TagRFP-23-Ultramarine получена к.б.н. Грановским И.Э. в ИБФМ им. Г.К. Скрыбина РАН. Кристалл moxSAASoti<sup>F97M</sup> получен к.б.н. Бойко К.М. в лаборатории инженерной энзимологии.

**Методология и методы исследования.** Все результаты в этой работе получены с использованием генно-инженерных, биохимических и физико-химических методов, подробно описанных в главе 2.

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

1. Получен вариант moxSAASoti с заменами всех пяти аминокислотных остатков цистеина, характеризующийся повышенной скоростью фотоконверсии;

2. Найден оптимальный акцептор FRET пары - мономерный нефлуоресцирующий хромопротеин с высокими значениями интегралов перекрывания с донорами флуоресценции;

3. Замена F97M повысила яркость и фотостабильность красной формы moxSAASoti и позволила получить 3D структуру;

4. Замена H74K улучшила созревание moxSAASoti при 37 ° C;

5. FRET-пары moxSAASoti<sup>F97M/H74K</sup>-23-Ultramarine и TagRFP -23-Ultramarine позволяют детектировать активность каспазы 3 in vitro и могут использоваться в качестве флуоресцентных сенсоров;

**Структура и объем работы.** Работа написана на 135 страницах, библиография 144 источника. Работа содержит 46 рисунков и 20 таблиц. Начинается с введения, с описанием актуальности и значимости работы. Диссертация содержит такие главы как обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение. Завершается работа заключением, содержащим основные выводы о проделанной работе.

### **Публикации**

По результатам данной работы было опубликовано 4 статьи в журналах, которые индексируются в Web of Science, Scopus и РИНЦ, а также 7 тезисов на международных конференциях.

## Глава 1. Обзор литературы

Открытие зелёного флуоресцентного белка и последующая расшифровка кодирующей его последовательности ДНК позволило создать инновационный генетически-кодированный маркер для исследования множества биологических процессов в живых клетках. За это были удостоены Нобелевской премии О. Шимомура, М. Чалфи и Р. Тсиен [1,2]. Флуоресцентные белки (ФБ) позволяют визуализировать широкий спектр биологических процессов, включая экспрессию генов [3], функционирование и динамику белков внутри клеток [4,5]. К настоящему моменту существует огромное разнообразие ФБ с различными спектральными характеристиками и флуоресцентными свойствами, которые просуммированы в базе данных FPbase (fpbase.org). Хотя эти ФБ выделены из разных организмов (медузы, твёрдые и мягкие кораллы и т.д.) и могут значительно отличаться по первичной структуре, их третичная структура является консервативной.

GFP-подобные флуоресцентные белки состоят из 222-230 а.о., образующих 11  $\beta$ -тяжей, формирующих  $\beta$ -цилиндр. В центре этого цилиндра находится  $\alpha$ -спираль, содержащая в себе способный поглощать и в большинстве случаев испускать свет хромофор. Формирование хромофора, называемое также созреванием, происходит автокаталитически в процессе фолдинга белка из трех аминокислот. Для его образования не требуется никаких дополнительных кофакторов, кроме кислорода воздуха [6,7].

Роль аминокислотного триплета, образующего хромофор, хорошо известна [6–8]. Аминокислоты в этом триплете в значительной степени определяют флуоресцентные свойства белка. Последняя аминокислота в триплете – глицин – долгое время считалась абсолютно консервативной, так как отвечает за образование хромофора и её замены приводили к получению белков с незрелым хромофором из-за нарушения этапа циклизации [9,10]. Однако недавно открытая группа GFP-подобных флуоресцентных белков из

ланцетников показала, что в этом положении также может находиться аланин, не нарушающий полное формирование флуоресцирующего хромофора [11]. Вторая аминокислота менее консервативна; во всех GFP-подобных флуоресцентных белках дикого типа этой аминокислотой является тирозин, но это может быть и любая другая ароматическая аминокислота [12]. Тирозин определяет правильное химическое окисление во время созревания хромофора, предотвращая нежелательные побочные реакции, такие как фрагментация остова и гидролиз [13]. Первая аминокислота в хромофоре наиболее переменчива. Она в значительной степени определяет свойства белка. Её замена приводит к существенному изменению свойств флуоресцентных белков [14]. Так, путем замены первой аминокислоты в хромофорах GFP и RFP была получена разноцветная палитра флуоресцентных белков [15,16].

### **1.1 Фотопревращения флуоресцентных белков**

Значительный толчок в изучении процессов в живых клетках внесли фотопревращающиеся флуоресцентные белки, сильно ускорив развитие методов супер-разрешающей микроскопии (PALM [17], RESOLFT [18], STED [19]) благодаря преодолению дифракционного барьера и визуализации биологических процессов с разрешением вплоть до 10 нм.

Фотопревращающиеся флуоресцентные белки претерпевают изменение флуоресцентного состояния под действием возбуждающего света. В настоящее время их можно разделить на несколько групп в соответствии с типом фотопревращений: фотоактивируемые ФБ (ФАФБ), фотопереключаемые ФБ (ФПФБ), фотоконвертируемые ФБ (ФКФБ) и объединяющая фотоконвертируемые и фотопереключающиеся флуоресцентные белки группа – бифотохромные ФБ.

### *1.1.1. Фотоактивируемые флуоресцентные белки*

Фотоактивируемые белки способны необратимо переходить из нефлуоресцентного состояния во флуоресцентное под действием возбуждающего света. Впервые этот переход наблюдался для дикого типа GFP, хромофор которого находился частично в протонированной (нефлуоресцентной) форме, и в меньшей степени в анионной (флуоресцентной форме). Было отмечено, что при облучении белка светом на длине волны поглощения протонированной формы, он практически полностью переходит в стабильную анионную. Чтобы усилить этот эффект, методами генной инженерии был получен фотоактивируемый вариант GFP – PA-GFP [23]. Под действием фиолетового света 400 нм начинает необратимо флуоресцировать с максимумом на длине волны 516 нм. Необратимость процесса фотоактивации связана с тем, что в белках такого типа аминокислотный остаток (а.о.) глутаминовой кислоты 222 в нативном состоянии стабилизирует хромофор в протонированном состоянии и при облучении возбуждающим светом происходит его декарбоксилирование, что смещает равновесие в сторону депротонирования хромофора (Рис. 1). На сегодняшний день известно девять ФАФБ, почти все из которых являются производными ФБ, флуоресцирующих в красной области спектра: PAtagRFP [24], PAmCherry1[25], PAmKate[26], PAtagRFP1297 [24], PAtagRFP1314 [24], PAmCherry2[25], PAmCherry3[25].

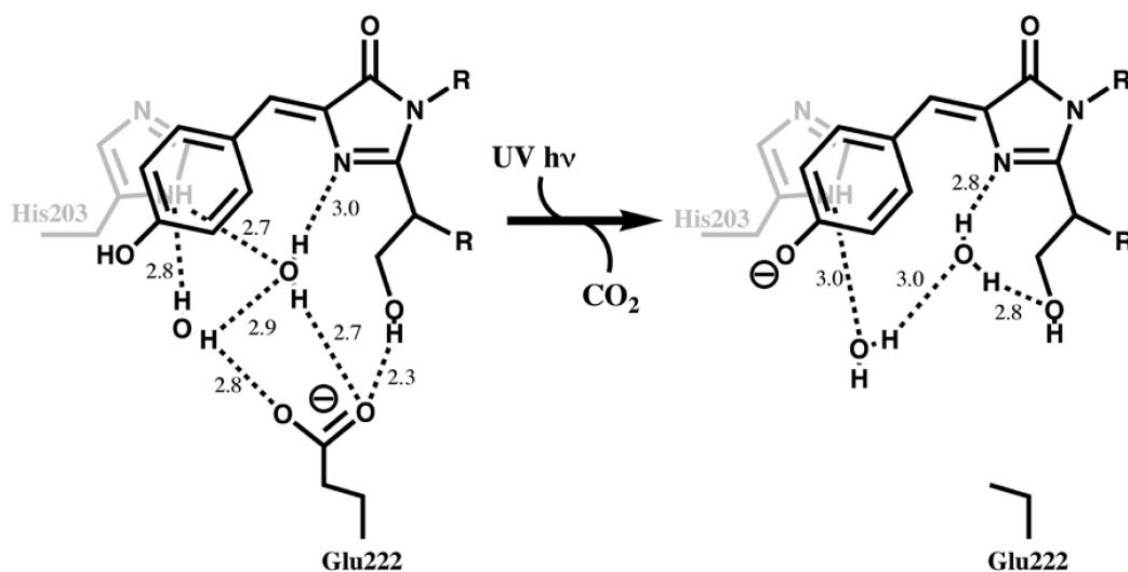


Рисунок 1. Двумерная схема, изображающая окружение хромофора RA-GFP до и после фотоактивации. Пунктирные линии показывают водородные связи с расстояниями, указанными в ангстремах [27].

Отдельно в этой группе фотоактивируемых белков стоит белок asFP595[20] (предок ФАФБ KFP[21]). Он был открыт как нефлуоресцирующий хромопротеин, однако дальнейшие исследования показали, что облучение его зеленым возбуждающим светом низкой и высокой мощности может приводить к появлению у него, соответственно, обратимой или необратимой флуоресценции на длине волны 595 нм[21,22]. Облучение этого белка синим светом приводит к тушению его флуоресценции. Поэтому этот уникальный белок можно отнести сразу к двум классам ФБ – фотоактивируемые и фотопереключаемые ФБ.

### 1.1.2. Фотоконвертируемые флуоресцентные белки

Фотоконвертируемые флуоресцентные белки необратимо изменяют свой спектр флуоресценции под действием возбуждающего света (чаще всего с длиной волны 405 нм). Наиболее обширную группу представляют зелено-

красные ФКФБ, однако существуют также сине-зеленые (PS-CFP, PS-CFP-2[28] – фотоконверсия при возбуждении на 405 нм) и оранжево красные, (PSmOrange, PSmOrange2[29] – фотоконверсия при возбуждении на 480(489) нм) ФКФБ. Также для некоторых красных и дальнекрасных белков Katushka, mKate, HcRed наблюдалось образование зеленой флуоресценции при облучении светом 405 нм, или светом в красной и дальнекрасной области (560, 750 нм)[30].

Первым открытым зелено-красным ФКФБ был Kaede[31]. Под действием света 405 нм он переходил из нативного зелёного флуоресцирующего состояния ( $\lambda_{em}=518$  нм) в красное ( $\lambda_{em}=580$  нм). Благодаря наличию а.о. гистидина в хромофоре при возбуждении светом происходит разрыв ковалентной связи между  $\alpha$ -C и  $\alpha$ -N His62 с последующим депротонированием  $\beta$ -C, в результате чего образуется новая двойная связь между  $\alpha$ -C и  $\beta$ -C, изменяя систему  $\pi$ -сопряжённых связей, порождающую флуоресценцию в красной области спектра. Для Kaede механизм изучен подробно (Рис. 2). На сегодняшний день открыто и получено более двадцати вариантов ФКФБ, которые являются дочерними вариантами таких ФКФБ как: EosFP[32], DendFP[33], mClavGR2[34], mKikGR1[35].

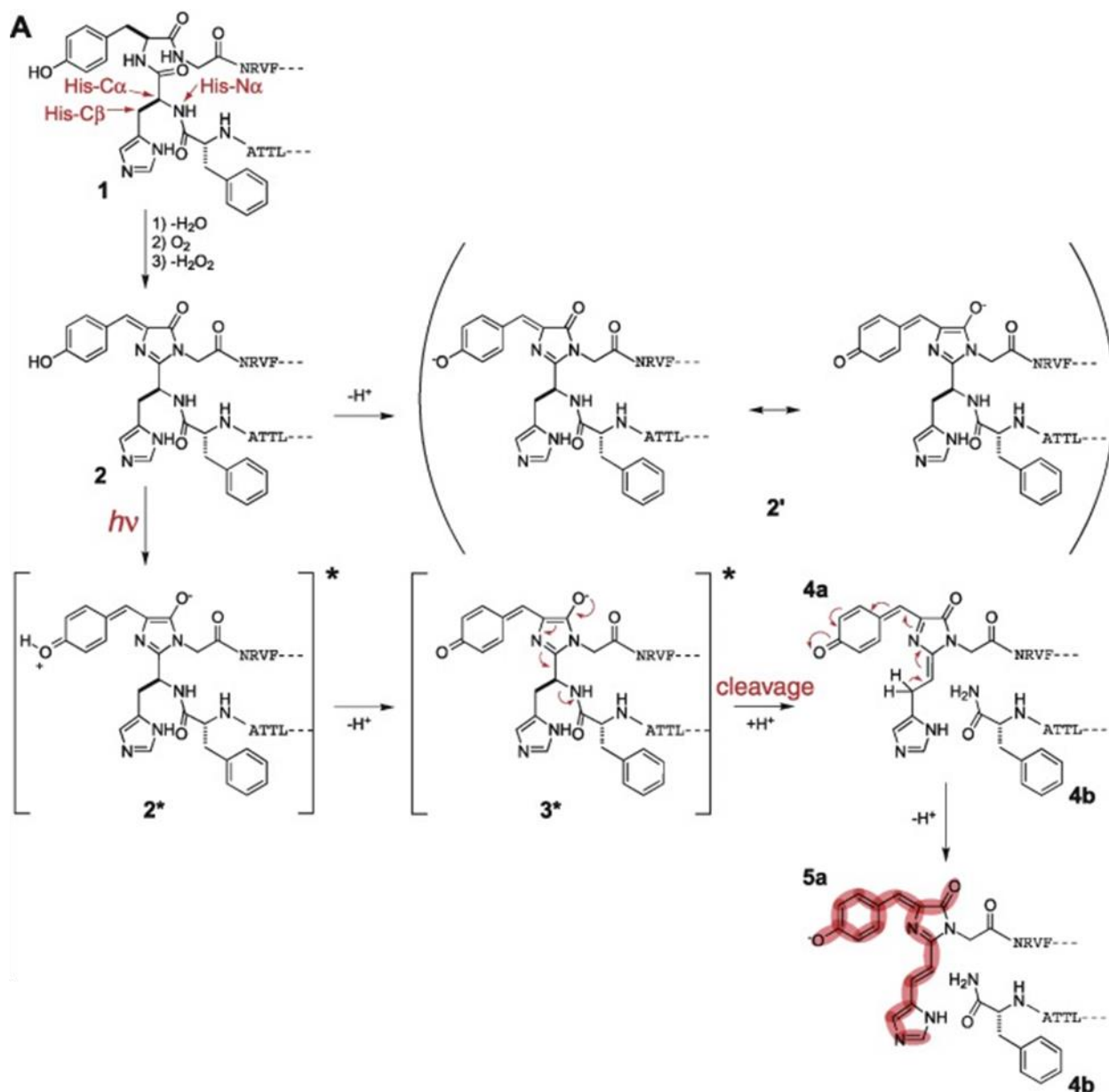


Рисунок 2. Механизм автокаталитического созревания хромофора Kaede и его фото-индуцированное расщепление под действием света с длиной волны 405 нм [36].

Для ФКФБ Dendra2 известен необычный способ фотоконверсии – путем облучения голубым светом ( $\lambda_{ex} = 488$  нм), однако эффективность такой фотоконверсии ниже обычной (при облучении светом  $\lambda_{ex} = 405$  нм) в 25 раз [37]. Позднее для Dendra2, а также для mEos2 был обнаружен необычный феномен праймированной фотоконверсии (primed conversion) [38]. При дополнительном использовании ближнего инфракрасного (ИК) света в



совокупности с «затравочным» (primed) голубым - одновременно или при быстром чередовании - увеличивалась эффективность фотоконверсии на порядок, по сравнению с воздействием только голубого света. При варьировании длин волн ИК света от 700 до 1000 нм, оптимальным оказался спектральный диапазон 700–780 нм. Предложенная схема освещения с двумя лазерами (488 + 730 нм при соотношении интенсивностей примерно 1:100) позволяет избежать необходимости в коротковолновом фиолетовом (405 нм) свете, токсичном для клеток. Но поскольку использование инфракрасного лазера не всегда доступно, была продемонстрирована возможность праймированной фотоконверсии при облучении голубым и красным ( $\lambda_{ex} = 640$  нм) светом в соотношении 1:250 с эффективностью в 7 раз выше[39]. Было установлено, что за наличие такого явления как праймированная фотоконверсия у ФКФБ отвечает а.о. треонина в положении 69 и таким образом получены варианты ФКФБ Kaede, mEos2, mMaple, mKikGR с заменами в этом положении со способностью к праймированной фотоконверсии[40]. Методы с использованием праймированной фотоконверсии предпочтительнее для исследования процессов в живых клетках благодаря меньшей фототоксичности излучения голубого и инфракрасного/красного спектров по сравнению с фиолетовым[39].

Для зелено-красных ФКФБ важным свойством является контрастность фотоконверсии и высокая молекулярная яркость (произведение квантового выхода и коэффициента молярной экстинкции) красной формы белка. Часто красная форма имеет заметно более низкие значения коэффициента молярной экстинкции и квантового выхода по сравнению с зелёной формой белка (Таблица 1). Мутагенез а.о. в микроокружении хромофора позволяет улучшить эти параметры. Так, для двух вариантов семейства EosFP введение идентичных замен позволило значительно улучшить параметры флуоресценции и фототрансформации. pcStar разрабатывался для применения

в качестве метки в методах SMLM, для которого необходима метка с высоким контрастом фотоконверсии и высокой фотостабильностью [41]. Считалось, что среди широко используемых ФКФБ Dendra2 имеет высокую контрастность фотоконверсии, и соответственно высокую плотность мечения белков. Однако применение Dendra2 в визуализации SMLM ограничивается из-за его быстрого фотообесцвечивания при высокой мощности облучения в PALM. mMaple3, несмотря на высокую эффективность сигнала, демонстрирует слабую флуоресценцию зеленой формы, что затрудняет идентификацию меченых белков в клетках или тканях. mEos3.2 успешно применим в SMLM и демонстрирует превосходную визуализацию в PALM, но его контрастность фотоконверсии уступает контрастности Dendra2 и mMaple3. pcStar был получен путем сайт-направленного и сайт-насыщающего мутагенеза ФКФБ mEos3.2. Замены были выбраны на основе выравнивания последовательностей с белками с высокой контрастностью фотоконверсии Dendra2 and mMaple3. На основе скрининга бактериальных колоний по свойствам быстрого появления зеленой флуоресценции и высокой контрастности фотоконверсии был выбран вариант с тремя заменами: D28E, L93M и N166G (нумерация согласно mEos3.2). Фотостабильность зелёной формы pcStar сравнима с mEos3.2 и Dendra2, но уступает mMaple3. В то же время, фотостабильность красной формы pcStar выше, чем у mEos3.2 но уступает Dendra2 and mMaple3. При этом молекулярная яркость pcStar в 2,9, 1,2 и 11,3 раза выше, чем у Dendra2, mEos3.2 и mMaple3 соответственно. Интересно, что в клетках млекопитающих через 16 часов после трансфекции отношение интенсивности флуоресценции pcStar было в 2,1, 2,4 и 5,0 раз выше, чем у Dendra2, mEos3.2 и mMaple3 соответственно, из чего можно сделать вывод, что яркость в клетках не прямо пропорциональна, но коррелирует с яркостью *in vitro*.

Такие же замены (D28E, L93M и N166G), введенные в другой вариант mEos4b, позволили получить новую форму белка EosFP, названную mEosEM, для которой значение молекулярной яркости оказалось выше в 1,9 раз для зеленой формы и в 2,8 раз для красной формы по сравнению с mEos4b [42].

Таблица 1. Спектральные и физико-химические характеристики вариантов ФКФБ dendFP, EosFP, mClavGR2, mKikGR1.

ФКФБ	Олигомерное состояние	Форма, $\lambda_{\text{возб.}}/\lambda_{\text{исп.}}$ , нм	$\epsilon$ , $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\phi$	Яркость, $\phi^* \epsilon/1000$
Варианты dendFP ( <i>Dendronephthya</i> sp.)					
dendFP[33]	Тетрамерное	Зелёная, 492/508	90000	0,65	58,5
		Красная, 557/575	35000	0,68	23,8
Dendra[37]	Мономерное	Зелёная, 488/505	21000	0,7	14,7
		Красная, 556/575	20000	0,72	14,4
Dendra2[37]	Мономерное	Зелёная, 490/507	45000	0,5	22,5
		Красная, 553/573	35000	0,55	22,5
Dendra2-T69A[43]	Мономерное	Зелёная, 502/518	42500	0,56	23,8

		Красная, 563/578	35400	0,64	22,7
Варианты EosFP ( <i>Lobophyllia hemprichii</i> )					
EosFP[32]	Тетрамерное	Зелёная, 506/516	72000	0,7	50,4
		Красная, 571/581	41000	0,55	22,55
d1EosFP[32]	Димерное	Зелёная, 505/516	74800	0,68	50,9
		Красная, 571/581	40000	0,62	24,8
d2EosFP[32]	Димерное	Зелёная, 506/516	84000	0,66	55,4
		Красная, 569/581	33000	0,6	19,8
mEosFP[32]	Мономерное	Зелёная, 505/516	67200	0,64	43,0
		Красная, 569/581	37000	0,62	22,9
mEos2[44]	Слабый димер	Зелёная, 506/519	56000	0,84	47,0
		Красная, 573/584	46000	0,66	30,4

mEos2-A69T[43]	Мономерное	Зелёная, 495/509	24300	0,63	15,3
		Красная, 565/580	11500	0,66	7,6
mEos4a[45]	Мономерное	Зелёная, 505/515	83530	0,86	71,8
		Красная, 571/580	61000	0,71	43,3
mEosFP3.1[46]	Мономерное	Зелёная, 505/513	88400	0,83	73,4
		Красная, 570/580	33500	0,62	20,8
mEosFP3.2[46]	Мономерное	Зелёная, 507/516	63400	0,84	53,3
		Красная, 572/580	32200	0,55	17,7
mEosFP4b[45]	Мономерное	Зелёная, 505/516	78170	0,84	65,7
		Красная, 570/580	55500	0,71	39,4
pcStar[41]	Мономерное	Зелёная, 505/515	74376	0,89	66,2

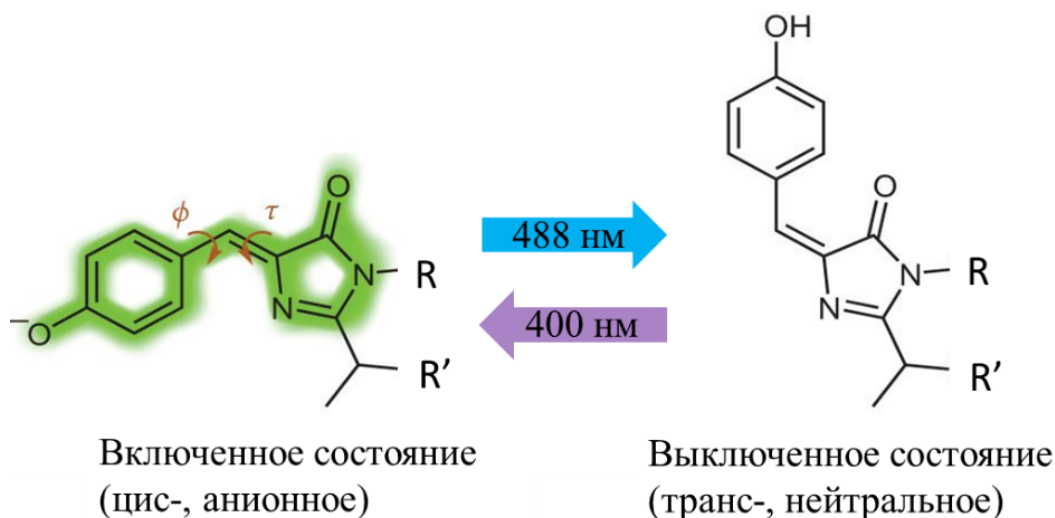
		Красная, 567/579	48403	0,44	21,3
mEosEM[42]	Мономерное	Зелёная, 503/511	155650	0,79	123,0
		Красная, 569/579	170128	0,66	112,28
Варианты mClavGR2 ( <i>Clavularia sp.</i> )					
mClavGR2[34]	Мономерное	Зелёная, 488/504	19000	0,77	14,63
		Красная, 566/583	32000	0,53	16,96
mMaple[47]	Мономерное	Зелёная, 489/505	15000	0,74	11,1
		Красная, 566/583	30000	0,56	16,8
mMaple3[48]	Мономерное	Зелёная, 491/506	15760	0,37	5,83
		Красная, 568/583	23970	0,52	12,46
Варианты mKikGR1 ( <i>Favia fava</i> )					
KikGR1[35]	Тетрамерное	Зелёная, 507/517	53700	0,7	37,6

		Красная, 583/593	35100	0,65	22,8
mKikGR[49]	Мономерное	Зелёная, 505/515	49000	0,69	33,81
		Красная, 580/591	28000	0,63	17,64

### 1.1.3 Фотоперключаемые флуоресцентные белки

ФПФБ способны обратимо переключаться между флуоресцентным и нефлуоресцентным состояниями под действием возбуждающего света. Обратимое фотоперключение было замечено еще у первых вариантов дикого типа GFP [50], однако контрастность этого переключения была достаточно низкой [51]. Одним из первых направленно полученных ФПФБ был Dronpa [52]. Он является зеленым флуоресцентным белком с максимумом поглощения 503 нм и максимумом флуоресценции 518 нм. Его можно отнести к отрицательным ФПФБ, поскольку в нативном состоянии он является флуоресцентным, и при облучении его светом с длиной волны, соответствующей максимуму его поглощения (503 нм), он переходит в нефлуоресцирующее состояние. Этот переход обратим путем термической релаксации или облучением его светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения темной формы белка (400 нм). Механизм этого процесса связывают с цис-транс изомеризацией хромофора и сопутствующим его протонированием-депротонированием (Рис. 3). Методами фемтосекундной спектроскопии на примере ФПФБ rsEGFP2 было показано, что при фотоперключении происходит поворот и сдвиг хромофора вниз по  $\alpha$  - спирали вдоль оси бета-цилиндра. Аналогичный переход в темную форму можно осуществить титрованием раствора белка в сторону кислых значений

pH, поскольку цис-протонированная форма также не является флуоресцентной [53].



*Рисунок 3. Цис/транс изомеризация и протонирование хромофора ФПФБ rsEGFP2 при его облучении светом с длиной волны 488 нм. Процесс обратим при облучении светом с длиной волны 400 нм или термической релаксацией [54]*

К другому виду ФПФБ относятся положительные ФПФБ. Эти белки в нативном состоянии находятся в транс нефлуоресцирующем состоянии, а при облучении их возбуждающим светом, с длиной волны, соответствующей поглощению анионной формы хромофора обратимо переходят в цис-флуоресцентное состояние. При облучении светом с длиной волны, соответствующей поглощению протонированной формы возвращаются в нефлуоресцирующее состояние. Первым белком с подобными свойствами был asFP595 [20], позднее из белка Dronpa был получен Padron[55].

Заметно отличается по механизму фотопереключения ФПФБ Dreiklang [56]. При возбуждении этого ФБ светом с длиной волны 405 нм авторы предположили обратимую гидратацию имидазольной части хромофора, в результате чего нарушается цепь сопряженных  $\pi$ -связей и хромофор переходит в нефлуоресцирующее состояние. При облучении светом с длиной



волны 365 нм происходит дегидратация хромофора и восстановление флуоресценции.

Улучшенный вариант ФБ Dreiklag – SPOON[57] – подвергается обратимому тушению по аналогичному механизму, однако при облучении светом с длиной волны 488 нм (Рис. 4). Восстановление флуоресценции происходит спонтанно при термической релаксации – дегидратации хромофора, что делает его более удобным вариантом для использования во многих техниках супер-разрешающей микроскопии, базирующихся на SMLM.

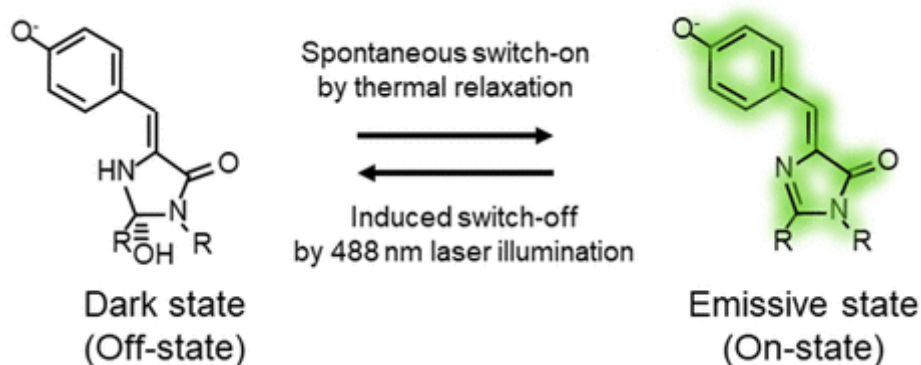


Рисунок 4. Механизм фотоиндуцированного присоединения воды для ФПФБ SPOON[57].

За наличие у ФБ свойства фотопереключения отвечают микроокружение хромофора и сама структура бета-цилиндра, поскольку сами хромофоры у ФПФБ весьма разнообразны (Таблица 2). Интересным примером является семейство mGeos. Это семейство зеленых ФПФБ было получено из зелено-красного ФКФБ белка mEos путем замены гистидина в хромофоре NYG на различные аминокислотные остатки [58]. Введение замен в микроокружении хромофора, а именно добавление замены F173S позволило дополнительно получить быстропереключающиеся варианты mGeos.

Таблица 2. Сравнение триплетов аминокислотных остатков хромофоров и спектральных свойств ФПФБ

ФПФБ	Хромофор	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	$pK_a$	$\epsilon, M^{-1} \cdot cm^{-1}$	$\phi$	Яркость ( $\phi \cdot \epsilon$ )
rsEGFP2 [59]	AYG	478/503	5,8	61 300	0,3	18,39
rsFolder2 [60]	AYG	478/503	5,5	44 000	0,23	10,12
Gamillus [61]	QYG	504/519	3,4	83 000	0,9	74,7
Dronpa3 [62]	CYG	490/515	n,a,	58 000	0,33	19,14
rsFastLime [63]	CYG	496/518	n,a	39 094	0,77	30,1
mGeosC [58]	CYG	505/516	6,0	76 967	0,81	62,34
mGeosF [58]	FYG	504/515	5,0	53 135	0,85	45,16
mGeosM [58]	MYG	503/514	4,7	51 600	0,85	43,86
mGeosL [58]	LYG	501/513	5,0	53 448	0,72	38,48
mGeosE [58]	EYG	501/513	6,0	69 630	0,75	52,22
mGeosS [58]	SYG	501/512	5,0	64 602	0,76	49,1

#### 1.1.4. Бифотохромные флуоресцентные белки

Отдельно следует выделить класс бифотохромных флуоресцентных белков. Они обладают одновременно свойствами обратимого фотопереключения и необратимой фотоконверсии. На сегодняшний день известно всего четыре таких белка: IrisFP[64] и NijiFP[65] – получены генно-инженерным путем из ФКФБ EosFP и Dendra2 путем замены F173S, pcDronpa

– получен генно - инженерным путем из ФПФБ Dronpa путем введения гистидина в триплет аминокислотных остатков хромофора и нескольких дополнительных замен, SAASoti – единственный из этих белков, обладающий бифотохромностью в диком типе. Общим свойством всех бифотохромных белков является наличие гистидина в триплете аминокислотных остатков хромофора, отвечающего за наличие свойства фотоконверсии у этих белков. За наличие свойства фотопереключения отвечает микроокружение хромофора, поэтому для всех белков оно различно. IrisFP и NijiFP обладают фотопереключением в красной и зеленой формах, а SAASoti и pcDronpa переключаются только в зелёной форме. На сегодняшний день существует 2 подхода для получения ФБ с *бифотохромными* свойствами:

#### 1.1.4.1. Метод случайного и сайт-направленного мутагенеза из фотоконвертируемых ФБ.

Например, методом случайного мутагенеза был получен ФБ IrisFP (Iris - греческая богиня, олицетворяющая радугу) – вариант ФКФБ EosFP, содержащий замену F173S, которая привела к появлению дополнительного свойства обратимого фотопереключения для зеленой и красной форм. Для IrisFP необратимая фотоконверсия происходит при интенсивном облучении светом с длиной волны 405 нм. Длины волн для включения/выключения для зеленой и красной форм составляют 405/488 нм и 440/561 нм, соответственно. Для включения зеленой формы требуется очень низкая интенсивность света 405 нм по сравнению с требуемой для фотоконверсии. Новый вариант расширил границы применения ФТФБ, позволяя, например, использовать IrisFP для хранения четвертичных данных [66], а необратимая фотоконверсия из зеленой в красную форму позволяет выделить две субпопуляции одного и того же белка, тогда как обратимое фотопереключение позволяет получать субдифракционные изображения обоих состояний [67]. Практические применения, однако, ограничиваются из-за довольно быстрой скорости

переключения и низкой фотостабильности IrisFP, что резко ограничивает количество фотонов, которые могут быть получены в ходе одного цикла переключения. Кроме того, возможность использования IrisFP в качестве флуоресцентной метки в слитных белках ограничена его олигомерной природой. Хотя сообщалось о мономерном варианте (mIrisFP)[67], он также имеет вышеупомянутые спектральные ограничения и лишь частично фотоконвертируем в красное состояние. Все эти параметры усложняют использование (m)IrisFP в продвинутом флуоресцентном имиджинге[65].

Позднее, основываясь на опыте по получению IrisFP и различных вариантов ФПФБ Dronpa[52]– bsDronpa (V157G/M159C/F173C) и Padron[55], Dronpa-2 (M159T) и Dronpa-3 (V157I/M159A)[5], авторы [65] предположили, что наибольшее влияние на фотохромизм оказывают а.о. в положения 159 и 173. В результате замена F173S была произведена в ФКФБ Dendra2 [37] полученная мутантная форма получила дополнительное свойство обратимого фотопереключения и была названа NijiFP (Niji (от яп.) - радуга). Фотоконверсия и фотопереключение происходят в тех же условиях, что и в случае IrisFP. Было показано, что этот белок более эффективно, чем IrisFP, фотоконвертируется, и, в отличие от IrisFP, является мономерным.

На основании этих данных было предположено, что замена F173S приводит к повороту M159 к S173. Это позволяет молекуле воды (W2188 в IrisFP) войти в  $\beta$  - бочонок и взаимодействовать с S142 (Рис. 5). Данное изменение в окружении хромофора облегчает его *цис-транс* изомеризацию, связанную с процессом обратимого фотопереключения для большинства ФПФБ.

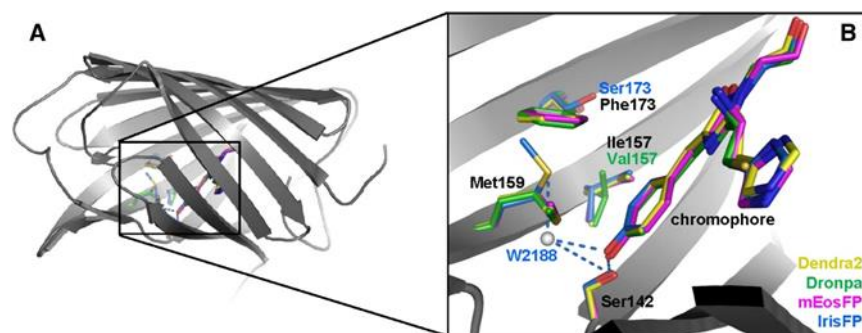


Рисунок 5. Локализация аминокислот, влияющих на фотоизомеризацию хромофора. А - типичная структура  $\beta$ -бочонка флуоресцентных белков. В - суперпозиция хромофора и окружающих остатков в зеленых формах *Dendra2* (желтый, PDB: 2VZX), *Dronpa* (зеленый, PDB: 2Z1O), *mEosFP* (розовый, PDB: 3P8U) и *IrisFP* (синий, PDB: 2VVH). Представлены остатки 142, 157, 159 и 173; каждый из которых помечен цветом, соответствующим белку. W2188-молекула воды, которая взаимодействует с Ser142 в *IrisFP* (специфические водородные связи в *IrisFP*, представленные синей пунктирной линией) [65]

Поскольку а.о. 173 находится на удалении от фенольного фрагмента хромофора, его влияние на фотопереключение скорее аллостерическое. Остаток M159 может влиять более направленно, и его замена приведет к интересным свойствам с точки зрения фотопереключения. Таким образом, M159 замещали на небольшую алифатическую аминокислоту (аланин), которая должна обеспечить конформационную свободу для *цис-транс* изомеризации хромофора, а также для обеспечения большей гибкости хромофора. Алифатический остаток был выбран для того, чтобы избежать непредсказуемых побочных эффектов, возникающих в результате образования Н-связей с новым а.о.

В результате, у белков *mEosFP-M159A* и *Dendra2-M159A* появились свойства обратимого фотопереключения, однако в случае *mEosFP-M159A* исчезла способность к необратимой фотоконверсии. Также у этой формы значительно снизился рКа, что скорее всего является причиной отсутствия фотоконверсии, т. к. она возможно только для протонированной формы хромофора.

#### 1.1.4.2. Введение замен а.о., добавляющих свойство необратимой фотоконверсии в ФПФБ.

Из фотоперключаемого ФБ Dronpa путём введения замен а.о. в 5 положениях (V60A, C62H, N94S, N102I, E218G) получен бифотохромный вариант pcDronpa, а позднее его улучшенный вариант pcDronpa2 [68], имеющий наиболее яркую красную форму среди бифотохромных белков. После введения замены C62H авторы обнаружили отсутствие флуоресценции у нового варианта, поэтому были проведены ещё 2 раунда случайного мутагенеза, давшие в общей сложности 5 новых замен а.о. (V60A, C62H, N94S, N102I, E218G). Полученный вариант был назван pcDronpa (photoconvertible Dronpa). Он находится в тетрамерном олигомерном состоянии несмотря на то, что получен из мономерной формы белка. Также у него отсутствует способность к фотоперключению красной формы.

Уникальным с точки зрения фотохимических свойств является ФБ SAASoti. Он был выделен из коралла *Styloconiella armata* и изначально были известны только его свойства необратимой фотоконверсии [69], путём рационального мутагенеза для SAASoti была введена точечная мутация V127T, которая привела к его мономеризации, что было подтверждено методами флуоресцентной корреляционной спектроскопии и гель-фильтрации [70]. Позднее было открыто его свойство *обратимого фотоперключения* [71]. Также для SAASoti продемонстрирована возможность фотоперключения красной формы при фототушении зелёной формы белка перед фотоконверсией [72]. Таким образом, SAASoti является бифотохромным ФБ без введения дополнительных замен для получения этих свойств. И, в отличие от IrisFP и NijiFP, имеет фенилаланин в положении 173 и метионин в положении 159, замена которых в этих белках и привела к появлению бифотохромных свойств (Рис. 6). Основные оптические свойства бифотохромных ФБ приведены в Таблице 2.

```

SAASoti      MALSKQYIPDDMELIFHMDGCVNGHYFTIVATGKAKPYEGKQNLKATVTKGAPLPFSTDI 60
NijiFP      ----MNLIKEDMRVKVHMEGNVNGHAFVIEGEGKPKPYEGTQTANLTVKEGAPLPFSYDI 56
IrisFP      --HMMSAIKPPDMKINLRMEGNVNGHHFVIDGDGTGKPFEGKQSMDELVEKGGPLPFAFDI 58
pcDronpa    ----MSVIKPPDMKIKLRMEGAVNGHPFAIEGVGLGKPFEGKQSMDLKVKEGGPLPFAFYDI 56
              . * **.: .:.* **** *. * .**:*.*. . *.:*.****: **

SAASoti      LSTVMHYGNRCIVHYPPGIPDYFKQSFPEGYSWERTFAFEDGGFCIVSADIKLKDNCFIH 120
NijiFP      LTTAVHYGNRVFTKPEDIPDYFKQSFPEGYSWERTMTFEDKGICIRSDISLEGDCFFQ 116
IrisFP      LTTAFHYGNRVFAEYPDHIQDYFKQSFPKGYSWERSLTFEDGGICIARNDITMEGDTFYN 118
pcDronpa    LTTAFHYGNRVFAKYPENIVDYFKQSFPEGYSWERSMSYEDGGICIATNDITLDGDCYIN 116
              *.:*.**** .:.* * *****:*****:***:*** *:* **.....: :

SAASoti      TSMFHGTNFPADGFVMQRKTIQWEKSIEKMTVSDGIVKGDITMFLLLEGGGKYRCDSHTS 180
NijiFP      NVRFKGTNFPPNGFVMQKTLKWEPSTEKLHVRDGLLVGNINMALLEGGGHYLCDSKTT 176
IrisFP      KVRFHGVNFPANGFVMQKTLKWEPSTEKMYVRDGVLTGDITMALLEGNAHYRCDSRTT 178
pcDronpa    EIRFDGVNFPANGFVMQKRTVKWEPSTEKLYVRDGVLKGDVNMALSLEGGGHYRCDSKTT 176
              *.:*** :*****:***:*** * **:* **:: *.:* * ****..* *:* :*:

SAASoti      YKAK-KVVEMPQSHYVEHSIERTNDDG--TQFELNEHAVARLNEI----- 222
NijiFP      YKAK-KVVQLPDAHFVDHRIEILGNDSDYNKVKLYEHAVARYSPLPSQVW- 225
IrisFP      YKAKEKGVKLPGYHLVDHCIEILSHDKDYNKVKLYEHAVAHS-GLPDNARR 228
pcDronpa    YKAK-KVVQLPDYHFVDHHIEIKSHDKDYSNVNLHEHAEAHS-GLPRQAK- 224
              **** * *.:* * *:* ** ..* .:.* *** *:* :

```

Рисунок 6. Выравнивание последовательностей бифотохромных ФБ SAASoti, NijiFP, IrisFP, pcDronpa. Хромофор выделен серым цветом. Зелёным-положения, подвергавшиеся замене в ФКФБ EosFP и NijiFP; голубым-в ФПФБ Dronpa. Выравнивание последовательностей выполнено с использованием ПО Clustal Omega [73]

Таблица 3. Оптические свойства бифотохромных ФБ

ФБ	Родитель	Олигомерное состояние	Форма	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , нм	$\epsilon$ , $M^{-1}cm^{-1}$	$\phi$	Яркость, $\phi * \epsilon/1000$	pKa	Необратимая ФК	Обратимое ФП
NijiFP[65] (F173S)	Dendra2	Мономер	Зелёная	490/507	45000	0,5	22,5	6,6	+	+
			Красная	553/573	35000	0,55	22,5	6,9	-	+
IrisFP[64] (F173S)	EosFP	Тетрамер	Зелёная	507/516	63400	0,84	53,3	5,4	+	+
			Красная	572/580	32200	0,55	17,7	5,8	-	+
pcDronpa[68] ]	Dronpa	Тетрамер	Зелёная	504/515	100000	0,83	83,0	5,8	+	+



			Красная	569/583	1050 00	0,6 8	71,4	6,1	-	-
V127T SAASoti[70]	SAASoti	Мономер	Зелёная	509/519	7500 0	0,5 9	44,3	6,4	+	+
			Красная	573/579	2400 0	0,2 7	6,5	6,7	-	+

Также признаки бифотохромности наблюдались у некоторых ФКФБ. Так у белков Kaede и Dendra2 наблюдалось возрастание зелёной флуоресценции при фотоконверсии[30]. Также для Kaede в процессе фотоконверсии наблюдалось появление флуоресценции в голубой области спектра. Механизм этих процессов не выявлен. У белка mClavGR2 наблюдалась возрастание интенсивности флуоресценции анионной зелёной формы хромофора и поглощения на 488 нм при кратковременном облучении светом 405 нм. Авторами было выдвинуто предположение о цис-транс изомеризации хромофора по аналогии с IrisFP, однако подтверждено оно не было[34]. Возможно, это связано с явлением, продемонстрированным на ФПФБ Dronpa, на котором было показано, что цис и транс протонированные формы имеют одинаковые максимумы поглощения, а при возбуждении протонированной формы хромофора может происходить испускание флуоресценции анионной формы[53].

## **1.2. Роль а.о. цистеина в фолдинге и созревании флуоресцентных белков**

Важным свойством GFP-подобных белков как метки является стабильный фолдинг и корректное созревание хромофора. Для различных компартментов клетки, имеющих окислительные условия, таких как эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи, показано ухудшение флуоресцентных свойств ФБ GFP[74]. Такое ухудшение связано с наличием у GFP-подобных ФБ от 2 до 5 реакционноспособных аминокислотных остатков цистеина. В окислительных условиях клетки эти а.о. подвергаются окислению с образованием межмолекулярных дисульфидных связей, нарушающих стабильный фолдинг флуоресцентных белков. Для ослабления этого эффекта была разработана палитра бесцистеиновых вариантов ФБ с постоянной флуоресценцией[75–78], а позднее аналогично получены бесцистеиновые варианты ФКФБ: moxEosFP[79], moxDendra[79], moxMaple[48]. Приставка «mox» (monomeric and oxidative resistant) характеризует эти варианты ФБ как мономерные и устойчивые к окислительным условиям клетки ФБ. Однако, как

было показано для бифотохромного белка SAASoti а.о. цистеинов также оказывают аллостерическое влияние на свойства хромофора. Так, при замене определенных а.о. остатков цистеина для новых вариантов было обнаружено изменение скорости фотоконверсии и фотопереключения, значительный сдвиг рКа для красной и зеленой форм[80].

### **1.3. Хромопротеины**

Хромопротеины представляют собой группу GFP-подобных белков, имеющих высокий коэффициент молярного поглощения в видимой области спектра, но при этом не испускающих флуоресценцию. К первым подобным открытым белкам можно отнести белок asFP595 [20], поскольку этот белок начинает флуоресцировать только при накачке мощным светом, а также при кислых и щелочных значениях рН, что позволило использовать его как нефлуоресцирующий акцептор во FRET-сенсорах [81,82]. На сегодняшний день открыто широкое разнообразие хромопротеинов по всему видимому спектру, поскольку все они выделены из кораллов большая часть из них является димерами или тетрамерами, склонными к агрегации, что ограничивает их применение в методах суперразрешающей микроскопии [83]. Для этого генно-инженерными методами из красных ФБ были получены мономерные хромопротеины для применения в качестве акцепторов во FRET-парах [84,85]. Показано, что несмотря на то, что триплеты аминокислот образующих хромофоры в хромопротеине и флуоресцирующем белка могут совпадать, хромопротеин не проявляет флуоресцентных свойств. Это связано с микроокружением фенольного фрагмента хромофора, а именно с тремя а.о.: в положениях 148, 165 и 203. У хромопротеинов в этих положениях в основном находятся цистеин, аспарагин и аргинин (или лейцин), а у флуоресцирующих белков – серин, валин и гистидин Замена а.о. в 165 положении приводит к появлению флуоресцентных свойств у хромопротеинов. А замена а.о. в 148 положении приводит к исчезновению свойств флуоресценции [22]. Это связано прежде всего с возникновением конического пересечения основного и возбужденного состояния, что приводит

к дезактивации возбужденного состояния в фемтосекундном временном интервале, как это показано для asFP595 [86–89]

#### **1.4. Возгорающиеся красные флуоресцентные белки.**

ФБ KFP является уникальным представителем семейства GFP-подобных белков. Он является фотоактивируемым и фотопереключаемым вариантом фиолетового хромопротеина asFP595 (или asCP) выделенного из коралла *Anemonia sulcata* с заменой A143G[20,90]. asFP595 не флуоресцирует в нативном состоянии, но при облучении светом высокой мощности на длине волны 568 нм, он становится ярко флуоресцирующим с максимумом флуоресценции на длине волны 595 нм. Облучение синим светом на длине волны 450 нм приводит к тушению KFP. Согласно экспериментальным данным [86,91,92], предполагается, что механизм возгорания связан с *цис-транс* изомеризацией хромофора. Наиболее подробно эта схема разобрана в статье [93] и частично подтверждено в работе [94], в которой на кристаллической структуре KFP показано, что в темном состоянии хромофор находится в *транс*-форме, но после облучения мощным светом переходит в *цис*-форму. Этот процесс может быть как обратимым, так и необратимым в зависимости от мощности облучения, поэтому KFP относится одновременно к двум группам ФБ – ФАФБ и ФПФБ.

Также для KFP было продемонстрировано, что при нейтральных значениях pH он является хромопротеином, но при pH выше, чем 9 интенсивность флуоресценции возрастает [92], также, как и при кислых pH [95]. При этом в кислой области pH для KFP было обнаружено несколько максимумов флуоресценции (530 нм и 590 нм) при возбуждении на длине волны, соответствующей поглощению протонированной (нейтральной) формы хромофора (на длине волны 445 нм [22,96,97]). В связи с этим в некоторых работах [98,99] предполагалось, что в основном состоянии хромофор KFP является цвиттерионом, а в работе [100] было рассчитано, что

за максимум на 530 нм может отвечать флуоресцирующая катионная форма хромофора KFP.

### 1.5. FRET-пары флуоресцентных белков

Явление флуоресцентного/ферстеровского резонансного переноса энергии (fluorescence/Förster energy transfer, FRET) приобрело важное значение в исследовании взаимодействия внутриклеточных белков и исследовании ферментативной активности. На сегодняшний день создано большое количество FRET сенсоров на основе флуоресцентных белков для анализа pH, концентрации хлорид-ионов, уровня кислорода, который необходим в процессе формирования хромофора [101].

FRET – это процесс взаимодействия двух хромофоров, при котором происходит безызлучательный перенос энергии возбужденного состояния от донора к акцептору [102]. При таком переносе происходит уменьшение интенсивности и времени жизни флуоресценции донора. В случае флуоресцирующего акцептора при FRET одновременно происходит возбуждение флуоресценции акцептора. Эффективность FRET ( $E_{FRET}$ ) зависит от нескольких факторов, в первую очередь от расстояния между хромофорами (1):

$$E_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}, (1)$$

где  $R_0$  – расстояние, на котором эффективность переноса энергии составляет 50%,  $r$  – расстояние между хромофорами.

Также эффективность FRET можно рассчитать, зная время жизни флуоресценции донора в присутствии и в отсутствии акцептора (2):

$$E_{FRET} = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}, (2)$$

Где  $\tau_{DA}$  – время жизни флуоресценции донора в присутствии акцептора,  $\tau_D$  – в отсутствии

$R_0$  может быть рассчитано для любой пары флуоресцентных молекул по формуле 3:

$$R_0 = [2,8 * 10^{17} * \kappa^2 * \varphi_D * \varepsilon_A * J(\lambda)]^{1/6}, (3)$$

где  $\kappa^2$  характеризует угол между двумя флуоресцентными диполями,  $\varphi_D$  это квантовый выход донора,  $\varepsilon_A$  молярный коэффициент поглощения акцептора ( $\text{моль}^{-1} * \text{см}^{-1}$ ), и  $J(\lambda)$  спектральный интеграл перекрывания между нормированными спектрами эмиссии флуоресценции донора ( $F_D$ ) и поглощения акцептора ( $A_A$ ) (4).

$$J(\lambda) = \int F_D(\lambda) * A_A(\lambda) * \lambda^4 d\lambda, (4)$$

Интеграл перекрывания характеризует степень перекрывания спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора, чем его значение выше, тем больше эффективность FRET.

$\kappa^2$  описывает зависимость FRET от угла между двумя хромофорами. Так, если донор и акцептор расположены параллельно друг другу, эффективность FRET будет выше, чем если они перпендикулярны.  $\kappa^2$  может варьироваться от 0 до 4, обычно принимается за 2/3, что является средним значением, интегрированным по всем возможным углам. Почти для любой реальной системы  $\kappa^2$  близко к 2/3, и обычно ничего нельзя сделать, чтобы отрегулировать это значение (хотя в некоторых случаях флуорофоры жестко прикрепляют к исследуемым белкам, что может привести к заметным эффектам [101,103]).

Поскольку почти все флуорофоры, используемые в экспериментах по визуализации FRET, имеют квантовый выход выше 50% и коэффициент молярной экстинкции более  $50\,000 \text{ см}^{-1} \text{ M}^{-1}$ , диапазон возможных значений  $R_0$  обычно варьируется от 2 до 9 нм, а в среднем FRET пары имеют  $R_0$  5-6 нм [104,105].

На экспериментальные измерения FRET могут оказывать влияние следующие факторы: перекрывание спектров поглощения донора и акцептора, а также «подтекание» флуоресценции донора. в этих случаях может произойти непосредственное возбуждение акцептора светом, выбранным для возбуждения донора. Или же флуоресценция донора может аналогичным образом «подтекать» в канал детекции флуоресценции акцептора. Поскольку эти факторы исходят из фотофизики органических флуорофоров и будут присутствовать для любой FRET пары, их необходимо учитывать при измерении FRET. Выбор спектрально разделенных флуорофоров снижает влияние этих факторов, но также уменьшает интеграл перекрывания,  $J(\lambda)$ , что в большей степени дает затруднение в детекции сигнала FRET, чем помогает в устранении этих факторов[101]. Использование в качестве акцептора нефлуоресцирующих хромопротеинов исключает необходимость спектрального разделения флуоресценции донора и акцептора, что облегчает детекцию изменения FRET [81].

В настоящее время генетически кодируемые FRET-биосенсоры на основе флуоресцентных белков имеют разнообразные приложения: как инструменты медицинской диагностики, так и исследование фундаментальных свойств биомолекул и живых систем. Популярны биосенсоры на различные протеазы, поскольку их легче всего генетически кодировать и экспрессировать под одной рамкой считывания, они состоят из белка-донора, белка-акцептора, соединенных полипептидным линкером, содержащим сайт распознавания и гидролиза выбранной протеазой. Часто, именно от аминокислотного состава и длины линкера зависит получаемая эффективность FRET, эффективность гидролиза, и даже склонность сенсора к агрегации. Такие сенсоры дают возможность измерить не только индукцию или изменение активности протеазы, но и субклеточные локусы, в которых происходит активация протеазы [106]. Биосенсоры на основе FRET были использованы для детекции активности каспазы-3 [107,108], матриксных металлопротеиназ (ММП) [109,110], м-кальпаина [111], папаино-подобной

протеазы вируса SARS-Cov-2 [112], нейтрофильной эластазы (сериновой протеазы, участвующей в воспалительных процессах) [113].

Детекция протеазной активности с помощью FRET-биосенсоров является мощным инструментом для обнаружения и количественного определения ферментативных образцов, поскольку такие биосенсоры обладают высокой чувствительностью, специфичностью и селективностью.

## 1.6. Апоптоз

Апоптоз (происходит от греческого слова «листопад») — это программируемая гибель клеток (PCD), которая играет важную роль в развитии, гомеостазе тканей, воспалении, иммунитете и множественных патофизиологических состояниях. (Green and Lambi 2015). Морфологические проявления апоптоза включают блеббинг клеточной мембраны, сморщивание клетки и образование апоптотических телец. Апоптоз, как правило, может инициироваться по трем различными механизмам, а именно: внешним, внутренним, а также в виде *эндоплазматического ретикулумного стресс – индуцированного (ЭР стресс-индуцированного) пути*. Эти пути включают действие цистеиновых протеаз, называемых каспазами, которые расщепляют целевые белки после остатка аспарагиновой кислоты [114]. Глубокое изучение таких процессов как апоптоз играет важную роль в разработке диагностики и терапии онкологических, аутоимунных и нейродегенеративных заболеваний.

Ранние классификации способов гибели клеток зависели от морфологических и структурных особенностей отдельных тканей и клеток. В соответствии с этим, Швейхель и Меркер в 1973 г определили систему морфологических признаков для классификации гибели клеток по типам I, II и III в пренатальных тканях, обработанных различными эмбриотоксическими веществами. Клеточная смерть типа I соответствующая апоптозу и характеризуется сморщиванием клеток (пикнозом), мембранным блеббингом, формированием апоптотических телец, фрагментацией ДНК (кариорексис) и



конденсацией хроматина. Джон Керр в 1971 году назвал апоптоз «сморщенным некрозом», формой непатологической гибели клеток. Гибель II типа часто называют аутофагийно-зависимой гибелью клеток с образованием крупномасштабных аутофагических вакуолизирующих цитозольных материалов и органелл. Хотя нет никаких сомнений в том, что аутофагия способствует выживанию клеток в большинстве случаев, она также может вызывать гибель клеток, а именно аутофагиозно-зависимую гибель клеток, при определенных обстоятельствах Гибель клеток типа III, а именно некроз, характеризуется потерей целостности мембраны и набуханием субклеточных органелл (онкоз). Некроз долгое время считался неконтролируемым типом гибели клеток. Однако, существуют регулируемые типы некроза, такие как некроптоз, которые осуществляются контролируемым образом. Нынешняя система классификации гибели клеток была обновлена международным Номенклатурным комитетом по клеточной гибели (Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD), который разрабатывает руководящие принципы для определения и интерпретации всех аспектов гибели клеток. NCCD выпустил пять позиционных документов, касающихся классификации гибели клеток (2005 и 2009 годы), молекулярных определений подпрограмм гибели клеток (2012 год), основных и дополнительных аспектов гибели клеток (2015), и молекулярные механизмы гибели клеток (2018). В настоящее время гибель клеток можно в основном разделить на случайную клеточную смерть (accidental cell death, ACD) и регулируемую клеточную смерть (regulated cell death, RCD), основываясь на функциональных аспектах. ACD можно определить как мгновенную и катастрофическую гибель клеток, подвергшихся физическим, химическим или механическим воздействиям. Напротив, RCD включает точные сигнальные каскады, выполняется набором определенных эффекторных молекул и имеет уникальные биохимические, функциональные и иммунологические последствия, и может регулироваться путем фармакологических и генетических вмешательств. RCD также известна

как программируемая клеточная смерть (programmed cell death, PCD), когда она возникает в физиологических условиях [115].

### *1.6.1. Внешний путь*

Внешний путь запускается связыванием лигандов с трансмембранными рецепторами смерти, такими как рецептор 1 фактора некроза опухоли (TNFR1) и рецептор Fas (FasR). Связывание лиганда вызывает кластеризацию цитоплазматических доменов этих рецепторов, которые, в свою очередь, рекрутируют адаптерные белки, содержащие соответствующие домены смерти. Домены смерти этих адаптерных белков служат в качестве сайта связывания для различных предшествующих (инициаторных) прокаспаз (таких как каспаза-8 и каспаза-10) с образованием сигнального комплекса, вызывающего смерть (death-inducing signaling complex, DISC), который активирует эти каспазы. Активированные инициаторные каспазы затем активируют нижестоящие (эффektorные) каспазы (такие как каспаза 3, каспаза-6 и каспаза-7) для запуска гибели клеток. Отличительной чертой апоптоза является отсутствие системного или локального повреждения других клеток вследствие отсутствия воспаления во время его инициации, завершения и удаления мертвых клеток. Апоптотическая клетка достигает этого, осторожно оборачивая клеточную мембрану вокруг фрагментированной клетки, образуя апоптотические тельца. Нуклеотиды, такие как аденозин-5'-трифосфат (АТФ) и уридин-5'-трифосфат (УТФ), которые высвобождаются апоптотической клеткой, служат сигналом «найди меня» для макрофагов. Как только макрофаги оказываются достаточно близко, апоптотические тельца позволяют им поглотить их, выставляя на поверхность фосфатидилсерин (сигнал «съешь меня»). Процесс поглощения апоптотических клеток макрофагами называется эффероцитозом. Апоптоз, в соответствии с эффероцитозом, необходим для благополучия организма. Если апоптотическая клетка не может быть удалена путем эффероцитоза, она подвергается вторичному некрозу. Неэффективный эффероцитоз является

частью патологических процессов таких как муковисцидоз и ревматоидный артрит [116].

### 1.6.2. Внутренний путь

Внутренний путь, также называемый митохондриальным путем, включает высвобождение цитохрома с из митохондрий в цитоплазму в ответ на клеточный стресс. Цитохром с, в сочетании с активирующим апоптотическую протеазу фактором-1 (Araf-1), образует апоптосому. В апоптосоме прокаспаза-9 активируется и превращается в каспазу - 9. Каспаза-9, в свою очередь, активирует нижестоящие эффекторные каспазы. Митохондрии дополнительно высвобождают проапоптотические белки, такие как индуцирующий апоптоз фактор (AIF) и эндонуклеазу G. AIF транслоцируется в ядро и способствует фрагментации ДНК и конденсации хроматина. После этого «стадия I» хроматиновой конденсации (также называемая кольцевой конденсацией) приводит к транслокации эндонуклеазы G в ядро, что приводит к дальнейшему фрагментации ДНК. Наконец, активируемая каспазой ДНКаза (CAD) транслоцируется в ядро, что приводит к «конденсации II стадии» (конденсация ожерелья).

Митохондриальная фаза апоптоза регулируется семейством белков Bcl-2. Проапоптотические белки этого семейства, такие как Bax и Bak, создают поры на митохондриальной мембране в ответ на апоптотические стимулы, облегчая высвобождение цитохрома с. Между тем, другие проапоптотические белки, такие как Bim, сохраняют антиапоптотический белок Bcl-2 неактивным. Высвобожденный цитохром с благодаря взаимодействию с Araf-1 активирует каспазу-9. Между тем, митохондрии высвобождают вторую молекулу, названную, *вторым активатором каспазы, полученным из митохондрий* (SMAC), которая ингибирует белки IAP (ингибиторы апоптоза), предотвращая его деактивацию каспазы-9. Таким образом, полностью активированная каспаза-9 осуществляет гибель клеток путем активации нижестоящих каспаз, таких как каспаза-3 [114,117].

### 1.6.3. ЭР стресс-индуцированный путь

Инфекции, гипоксия, голодание, химические вещества, такие как туникамицин, тапсигаргин, Брефельдин А и не гомеостатические изменения секреторных функций эндоплазматического ретикулума (ЭР) способствуют накоплению в нем развернутых или неправильно свернутых белков, способствуя гибели клеток, вызванной ЭР стрессом. Когда в ЭР происходит неправильное сворачивание белков, инициируется путь *ответа развернутого белка* (unfolded protein response, UPR). UPR останавливает глобальный синтез белка и сосредотачивается на замене развернутых белков правильно свернутыми белками. Тремя основными компонентами этого пути являются *протеинкиназная РНК-подобная киназа эндоплазматического ретикулума* (PERK), *инозитол-требующий фермент 1* (IRE1) и *активирующий фактор транскрипции 6* (ATF6), которые работают в тандеме для восстановления протеостаза в ЭР. Однако, если попытка клетки заменить развернутые белки не удалась, она инициирует апоптоз. IRE1 играет важную роль в индукции этого процесса через *каспаза-12-опосредованный путь*, а также через опосредованные комплексы *TNF-рецептор фактор 2-апоптоза, регулирующий сигнал киназы 1* (TRAF2-ASK1), *cJun N-концевая киназа 1* (JNK) и *сигнальный каскад p38-MAPK*. Активация пути JNK приводит к апоптозу путем ингибирования *антиапоптотического белка Bcl-2* и активации *проапоптотического белка Bim*. Путь p38-MAPK облегчает гибель клеток посредством активации ключевого белка, расположенного ниже путей PERK и ATF6, называемого гомологичным белком C/EBP (CHOP). CHOP облегчает экспрессию многих проапоптотических белков, таких как *гомолог 3-трибл активатора каспазы-3* (TRIB3), *задерживающий рост и повреждающий ДНК белок-34* (GADD-34) и *фактор некроза опухоли* (TNF). рецептор белка, *рецептор смерти 5* (DR5), способствующий каспазо-8-зависимому апоптозу. Кроме того, CHOP, как и JNK, ингибируют транскрипцию Bcl-2 и способствуют экспрессии Bim. Апоптоз, вызванный стрессом ЭР, отмечается при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, пигментный

ретиinit, глаукома, дегенерация желтого пятна, воспалительные заболевания, онкогенез и метаболические заболевания. Наркотики, такие как Withaferin A, могут вызывать ЭР стрессовый апоптоз посредством активации каспазы-4, функционального гомолога каспазы-12. Ингибиторы Вах- 1 (ВI-1 / Tmbim6) и Вcl-2/Вcl-XL являются основными ингибиторами вызванного ЭР стрессом апоптоза.

Два клеточных явления, которые могут вызывать апоптоз, — митотическая катастрофа (МК) и анойкис. МК — возникают, когда клетка не может завершить митоз либо из-за повреждения ДНК, либо из-за нарушения регуляции белков, которые участвуют в митозе. МК также может возникать, когда клетка вступает в митотическую фазу преждевременно с неполным синтезом ДНК. Кроме того, ионизирующее излучение, физический или химический стресс, агенты, которые нарушают стабильность микротрубочек, и дефект контрольных точек клеточного цикла могут привести к МК. Гибель клеток после МК может быть метафазной гибелью клеток или многоядерностью с последующей гибелью клеток. Интересно, что МК может инициировать апоптоз или некроз в зависимости от степени повреждения. Однако иногда попытка клеток выживать и размножаться может привести к потенциально канцерогенным анеуплоидиям. Некоторые из таких клеток также способны уменьшать плоидность путем редуктивного деления (деполиплоидизации) путем использования путей, сходных с мейотическим делением. Анойкис (от греч. «бездомность») возникает, когда клетка отрывается от соседних клеток и внеклеточного матрикса. Этот отрыв от соседних клеток вызывает апоптоз. Анойкис действует как защитный механизм, который вызывает апоптоз в своенравной клетке[114].

#### *1.6.4 Субстраты каспазы 3*

На основе многочисленных исследований как природных субстратов, так и синтетических известно, что сайтом распознавания каспаз 3 и 7, обладающих схожей субстратной специфичностью, является DEXD↓Ф, где в

качестве Ф предпочтительны некрупные, незаряженные а.о. (например, аланин, серин, глицин и т.п.)[118]. Также каспазы предпочитают неупорядоченные петли или альфа-спирали бета-листам, поэтому флуоресцентные белки, представляющие собой β-цилиндры удобно использовать в субстратных сенсорах на каспазы, не опасаясь их возможного гидролизе[119].

На сегодняшний день известно уже несколько сотен природных субстратов каспазы-3. Их гидролиз в процессе апоптоза имеет разное влияние, как, например, усиление функции, так и потеря функции или нефункциональное влияние. К более редкому, первому типу влияния можно отнести процесс гидролиза прокаспаз 3 и 7 для активации каспаз или гидролиз интерлейкина-33, который предположительно активирует его для сенсibilизации иммунного ответа Т-хелперов 2 типа. Ко второму, более частому, можно отнести гидролиз таких популярных субстратов как ингибитор каспаза-активированной ДНКзы (ICAD) и поли (АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) [120]. Интересно, что как при апоптозе каспаза расцепляет PARP, инактивируя её, так и ингибирование PARP инициирует апоптоз клетки, т.е. снижение активности PARP может быть полезным при терапии онкологических заболеваний [121].

Как «объединение» первого и второго, можно рассмотреть удаление неопитопного экзосайта, необходимого для ингибирования каспазы-9, то активация каспазы 9 происходит через инактивацию ингибитора, как некая «дерепрессия». Инициаторная каспаза постмитохондриального внутреннего пути, каспаза-9, расщепляется в двух местах,  $PEPD_{315}\downarrow A$  и  $DQLD_{330}\downarrow A$ , в межцепочечной линкерной области. Хотя эти расщепления не требуются для активации, они играют важную роль в регуляции апоптоза. Расщепление по  $PEPD_{315}\downarrow A$  приводит к образованию нового N-концевого эпитопа, последовательности  ${}_{316}ATPF$ , которая необходима для ингибирования каспазы-9 ее эндогенным регулятором X-сцепленный ингибитор

апоптотического белка (XIAP). Это расщепление производится самой каспазой-9 и, по-видимому, гасит апоптотические реакции за счет прерывания пути на этом решающем этапе. Расщепление по DQLD<sub>330</sub>↓A, опосредованное эффекторными каспазами, устраняет ингибирующее взаимодействие и делает каспазу-9 невосприимчивой к ингибированию XIAP. Таким образом, это событие способствует апоптозу и может рассматриваться как обратная связь, когда каспаза-3 активирует протеолитический потенциал каспазы-9 [118].

### 1.7. Созревание ФБ в клетках млекопитающих

Для использования GFP-подобных белков в исследованиях в клетках теплокровных животных *in vivo* большое значение имеет его эффективное созревание при 37°C. Поскольку все известные на сегодняшний день GFP-подобные белки выделены из морских организмов (кораллов или медуз), для большинства из них оптимальной созревания является температура около 20°C. Хотя, на примере вариантов GFP, известно, что флуоресцентные белки по-разному созревают в прокариотах и в эукариотах [122], и даже в разных штаммах прокариот [123], оптимизация созревания GFP-подобных белков в клетках млекопитающих является важной задачей, однако направленный поиск а.о., отвечающих за этот процесс не проводится. Часто это свойство приобретает белков в результате многих циклов случайного мутагенеза:

1. Синие-зелёный ФКФБ PS-CFP был получен из мономерного нефлуоресцирующего белка aceGFP (*Aequorea coerulea*) при помощи комбинации сайт-насыщающего мутагенеза по положениям 148, 165, 220 и 222 (нумерация по avGFP) и случайного мутагенеза. Сайт-насыщающим мутагенезом были получены два фотоконвертируемых варианта. а случайный мутагенез был проведен для оптимизации фолдинга, яркости и контрастности фотоконверсии. В лучшем варианте результирующими заменами были T62A, N121S, N148T, K158R, I167V, E172K, F221L, G222E и K238Q, а также были добавлены 4 аминокислоты WKLN на C-конце. Полученный белок

эффективно созревает в клетках млекопитающих [124], однако какие именно из замен оказали на это влияние не выяснено.

2. Зелено-красный ФКФБ белок mClavGR2, полученный путем более 15 раундов случайного мутагенеза из голубого ФБ cFP484 путем дизайна, основанного на выравнивании аминокислотных последовательностей известных ФКФБ и дизайне микроокружения хромофора по подобию этих белков также эффективно созревает при 37°C [34].

3. Оранжево-красный ФКФБ PSmOrange был получен из оранжевого флуоресцентного белка mOrange девятью раундами случайного мутагенеза по всей последовательности с результирующими шестью заменами: S21T, Q63L, F100Y, L125M, K166R, P192S, которые привели не только к получению ФКФБ с повышенной яркостью и фотостабильностью, но и повысили скорость созревания этого белка при 37°C в 1.6 раза [29].

4. ФПФБ Dronpa [52] был получен из зеленоватого ФБ 22G путем случайного мутагенеза с результирующими заменами I102N, F114Y, L162S, R194H, N205S, G281E, что привело не только к появлению свойства обратимого фотопереключения, но также дало стабильное созревание при 37°C. Его бифотохромные варианты rcDronpa и rcDronpa2 также эффективно созревают при 37°C [68].

Более точные данные о положениях и заменах, влияющих на созревание при 37°C, были получены в работах с фотоконвертируемыми белками и некоторыми их бифотохромными вариантами:

1. Так, фотоконвертируемый из зелёной в красную форму белок Dendra эффективно созревает при 37°C благодаря единственной замене Y95F, полученной методом случайного мутагенеза [37]. Его бифотохромный вариант NijiFP несет в себе замены F173S, не повлиявшую



на скорость и температурную чувствительность созревания, поэтому можно предположить, что этот вариант также эффективно созревает при 37°C, хотя дополнительные исследования не проводились [65].

2. Бифотохромный белок mIrisFP, отличается от мономерного mEosFP четырьмя введенными заменами A69V, F173S, K145I и Y189A. При разработке этого варианта в первую очередь был получен очень яркий псевдомономерный вариант в виде тандемного димера tdEosFP путем соединения двух копий протомера димерного варианта с помощью гибкого линкера из двенадцати аминокислот. Впоследствии была обнаружена дополнительная замена A69V, идентифицированная при скрининге случайного мутагенеза как устраняющая недостающую термотолерантность; вариант mEosFPthermo и полученный из него вариант mIrisFP (Рис. 7) демонстрирует превосходную экспрессию при 37°C [125].

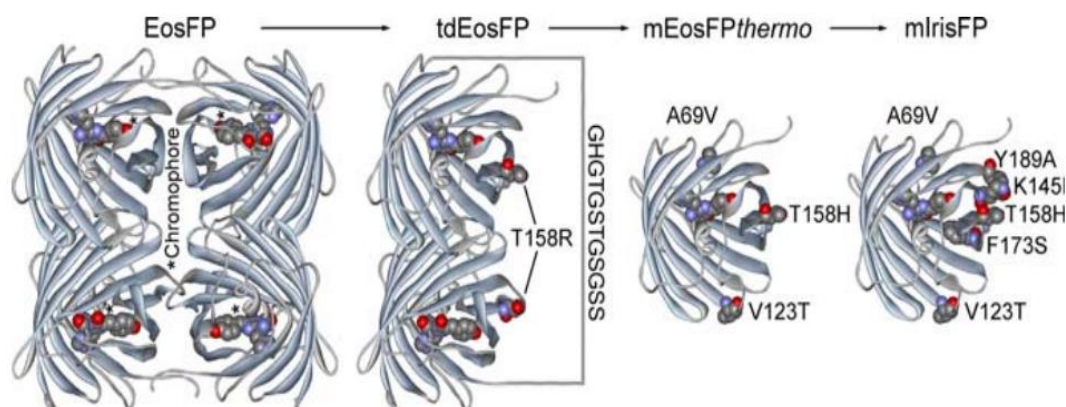


Рисунок 7. Варианты EosFP, демонстрирующие положения замен для получения мономерных термостабильного и бифотохромного вариантов. Модели основаны на рентгеновской структуре EosFP (1ZUX), демонстрирующие ключевые структурные особенности EosFP и его вариантов tdEosFP, mEosFPthermo и mIrisFP. Слева направо: EosFP отображает типичную тетрамерную структуру ФБ, выделенных из кораллов. Четыре хромофора отмечены звездочками. Псевдомономерный tdEosFP содержит два протомера, связанных аминокислотной последовательностью, как показано на рисунке. Истинный мономер mEosFPthermo представляет собой зелено-красный ФКФБ с превосходной экспрессией при 37°C; mIrisFP представляет собой мономерный бифотохромный ФБ А.о., важные для конструирования производных EosFP изображены сферами [125].

Направленные работы по улучшению созревания при 37°C проводились для фотоконвертируемого белка mEosFP [32], в результате которых была получена форма mEos2 [44]. В этой работе были выявлены различия в первичных последовательностях белка mEosFP и белка Dronpa, хорошо созревающего при 37°C. В результате выравнивания аминокислотных последовательностей белков были выявлены и введены 20 замен а.о., из которых результативными оказались три: N11K, E70K и H74N (нумерация по mEos2).

## Глава 2. Материалы и методы

### 2.1 Материалы

**Реактивы:** Трис(гидроксиметил)аминометан (Trizma base, SigmaUltra, 99,8%), натрия хлорид (ДиаМ, Германия, х.ч.), агароза (Agarose Biotechnology Grade, Sigma-Aldrich, США), магния хлорид (ДиаМ, Германия, ч.д.а.), натрий фосфорнокислый двузамещенный (ДиаМ, Германия, ос.ч.), ЭДТА (MP Biomedicals, Германия), триптон Tryptone casein peptone (Amresco, США), дрожжевой экстракт (USBiological, США), агар (Agar Bacteriological, Thermo Scientific, США), ДНК-маркер (GeneRuler 1kb DNA Ladder, 0,5 mg/ml, Fermentas), акриламид(4К Ultrapure, AppliChem, Германия), N,N' – метилен-бис-акриламид (Bio-Rad, США), додецилсульфат натрия (Serva, Германия), персульфат аммония(Biochemica, AppliChem, Германия), TEMED (Bio-Rad, США), PageBlue™ Protein Staining Solution(Thermo Scientific™, США), ампициллин (AppliChem, Германия), RPMI-1640 с глутамином (ПанЭко, Россия), раствор Трипсина-Версена (Gibco, Invitrogen, США), сыворотка крови плодов коровы (Gibco, США), DPBS (Gibco, США), 20x Reducing agent – 2 М ДТТ(Thermo Scientific™, США).

**ДНК:** вектор pET22b (Novagen, США), вектор pcDNA3.1 (Thermo Scientific™, США), вектор pET29a (Novagen, США)

**Ферменты:** Pfu ДНК-полимераза (2,5 ед./мкл, Thermo Scientific™, США), Taq ДНК-полимераза (5 ед./мкл, Евроген, Россия), T4 ДНК-лигаза (100 ед./мкл, Евроген, Россия), ЭР NdeI (10 ед./мкл, Thermo Scientific™, США), ЭР EcoRI (10 ед./мкл, Thermo Scientific™, США), ДНКаза I (100 мг, Boehringer Mannheim GmbH, Германия), РНКаза (Рибонуклеаза–1, марка А, Диаэм, Россия; 10 мг/мл, в буфере: 5mM Tris-HCl, pH 8.0, 15mM NaCl).

#### **Клеточные линии:**

*E. coli* BL21(DE3), впервые полученные в работе [126], любезно предоставленные Ивашиной Т. В. (с.н.с., к.б.н., ИБФМ РАН)

*E. coli* DH5 $\alpha$ , впервые полученные в работе [127], любезно предоставленные Ивашиной Т. В. (с.н.с., к.б.н., ИБФМ РАН)

*HeLa*, бессмертная клеточная линия карциномы шейки матки, впервые описана в работе [128]

**Буферные растворы:**

**ТАЕ (1x):** 40 мМ Tris, 20 мМ CH<sub>3</sub>COOH, 1 мМ ЭДТА, (pH 8,4);

**TGS:** 25 мМ Tris, 192 мМ глицин, 0.1% SDS (pH 8,6);

**Буфер А1** (гидрофобная хроматография): 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 1 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;

**Буфер Б1** (гидрофобная хроматография): 10 мМ Tris-HCl (pH 7,4);

**Буфер А2** (анионообменная хроматография): 20 мМ NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,2);

**Буфер Б2** (анионообменная хроматография): 20 мМ NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,2), 0,5 М NaCl;

**Буфер С:** 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4), 150 мМ NaCl;

**Буфер для нанесения ДНК:** 0,01% ксилен-цианол, 0,01% бромфенол-синий, 0,05% SDS, 0,01М ЭДТА, pH 8.0, 5% глицерин в дистиллированной H<sub>2</sub>O.

**Буфер II:** 0,2 М NaOH, 1% SDS

**Буфер Tris-HCl pH6,8:** 1 М Tris-HCl, pH 6,8

**Буфер Tris-HCl pH 8,8:** 1,5 М Tris-HCl, pH 8,8

**Буфер для нанесения белка** (электрофорез): 0,5 М Tris-HCl, pH 6,8, 10% SDS, 50% глицерин, 0,005% бромфенолового синего, 200 мМ DTT

**Растворы и питательные среды:**

П: 100 мМ RMSF в изопропанол

LB: бактотриптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, хлорид натрия 5 г/л

LB-агар: бактотриптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, хлорид натрия 5 г/л, агар 15 г/л

Ам: ампициллин, 1 г/л (1000х сток)

EtBr: бромистый этидий, 1 г/л

ИРТГ: 100 мМ ИРТГ в воде

АА/бис: 30% раствор акриламида (37,5:1 акриламид: N,N' – метилен-бис-акриламид) в воде

SDS 10%: 10% раствор додецилсульфата натрия в воде

ПСА: 10% раствор персульфата аммония в воде

25% глицерин: 25% раствор глицерина в воде

Лизис буфер для колоний: 0,25% SDS NaOH

### **Приборы**

Автоматические дозаторы Eppendorf и Ленпипет, настольная центрифуга с охлаждением Sigma 3-18K (Sigma Laborzentrifugen, Германия), центрифуга (Optima XPN-100 Ultracentrifuge, Beckman Coulter, Германия), спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian), спектрофотометр Cary 60 (Agilent, США), pH-метр (MP 225, Mettler Toledo), термоциклер (Progene, Techne), твердотельный термостат (TDB-120, Biosan), термостат (Biosan, Cooling-Heating thermostat CH-100) шейкер-инкубатор термостатируемый (10-60°C) Excella E24 Incubator Shaker Series (New Brunswick Scientific, США), весы аналитические лабораторные (Adventure™, Ohaus), весы лабораторные прецизионные (Explorer, Ohaus), хроматографическая система ÄKTA Purifier (GE HealthCare, Германия), ячейка для электрофореза (Mini-PROTEAN® II, Bio-Rad; Mini-SUB® Cell GT, Bio-Rad), источник тока (PowerPac Basic, Bio-Rad; PowerPac 1000, Bio-Rad, США), NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США), настольная центрифуга (MiniSpin, Eppendorf), электропоратор MicroPulser (Bio-Rad, США), кювета для электропоратора MicroPulser, 0,2 см (Bio-Rad, США), CO<sub>2</sub>-инкубатор (Binder, Германия), бокс микробиологической безопасности БМБ-II-«Ламинар-С»-0,9 (Lamsystems, Россия), ламинарная система II класса биобезопасности Jouan MSC-12 (Thermo Fisher Scientific, США), флуоресцентный визуализатор клеток ZOE (BioRad, США), ультразвукового гомогенизатора Qsonica Q125 (Qsonica, США)

## 2.2 Общие методики

### Сайт-направленный и сайт-насыщающий мутагенез

Сайт-направленный мутагенез был осуществлён методом «Overlap-extension PCR» с использованием ДНК-полимеразы Pfu[129].

1. Синтез двух ПЦР-фрагментов: фрагмент I с заменой на 3' конце (праймеры: SAP12\_Nde и «обратный» праймер с заменой), фрагмент II с заменой на 5' конце (праймеры SAP12\_RI и «прямой» праймер с заменой) и в качестве матрицы использовалась ДНК SAASoti wt или SAASoti V127T.
2. Объединяющий ПЦР, в качестве матрицы фрагменты I и II, с использованием «внешних праймеров» SAP12\_RI и SAP12\_Nde.

Общая схема процесса представлена на Рис. 8:

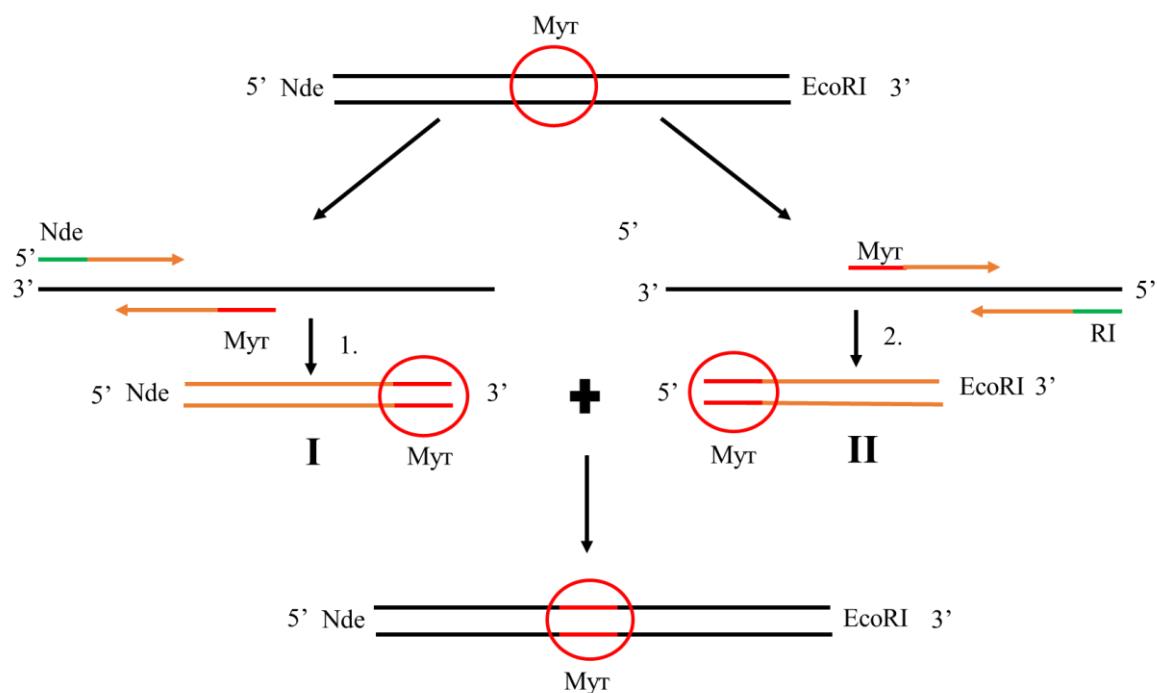


Рисунок 8. Схематическое представление введения точечной замены методом «Overlap extension PCR». синтез ПЦР-фрагментов I и II и объединяющий ПЦР.

Для синтеза фрагментов I и II и объединяющего ПЦР использовали ДНК-полимеразу Pfu, для проверки наличия вставок после лигирования и трансформации – Taq ДНК – полимеразу. Составы ПЦР смесей представлены в Таблице 4.

Таблица 4. Состав полимеразной смеси

	<b>Конечная концентрация (Pfu ДНК- полимераза)</b>	<b>Конечная концентрация (Taq ДНК- полимераза)</b>
<b>ДНК-матрица</b>	0,5-5 нг/мкл	0,5-5 нг/мкл
<b>dNTP</b>	0,2 мМ	0,2 мМ
<b>Pr1</b>	1 мкМ	0,4 мкМ
<b>Pr2</b>	1 мкМ	0,4 мкМ
<b>10x буфер</b>		
<b>Полимераза</b>	0,125 ед/мкл	0,125 ед/мкл
<b>H<sub>2</sub>O</b>	до 20 мкл	до 20 мкл

Праймеры для ПЦР составляли вручную, синтез проведен компанией Евроген, Россия. Для сайт-насыщающего мутагенеза использовались вырожденные праймеры со случайным набором дезоксинуклеотидов в кодоне заменяемой аминокислоты, обозначенном как NNN. Последовательности праймеров приведены в Таблице 5.

Таблица 5. Последовательности праймеров, используемых при проведении ПЦР.

<b>Название</b>	<b>Последовательность праймера</b>	<b>T<sub>пл</sub>, °C</b>
SAP12_Nde	TTA TTT CAT ATG ATG GCG CTT TCA AAG C	63
SAP12_RI	TTG AAT TCT CAA ATT TCG TTT AAA CG A GC	61,7
SAASotiC106 X_fw	GAT GGC GGA TTT <u>NNN</u> ACA GTC AGT GCA	66,6-71,5
SAASotiC106 X_rev	TGC ACT GAC TGT <u>NNN</u> AAA TCC GCC ATC	66,6-71,5
SAASotiC117 X_fw	CTT AAA GAC AAC <u>NNN</u> TTC ATT CAC ACA	60,8-65,3

SAASotiC117 X_rev	TGT GTG AAT GAA <u>NNN</u> GTT GTC TTT AAG	60,8-65,3
moxSAASotiF 97M_fw	AAGAACAAT <u>GGC</u> CTTTGAAGATGGC	64,1
moxSAASotiF 97M_rev	GCC ATC TTC AAA GGC <u>CAT</u> TGT TCT T	64,1
moxSAASotiF 97X_fw	AAGAACAN <u>NNG</u> CCTTTGAAGATGGC	62,5-67,4
moxSAASotiF 97X_rev	GCC ATC TTC AAA GGC <u>NNN</u> TGT TCT T	62,5-67,4
moxSAASoti H74K_fw	GTAACAGAGGGATTGTC <u>AAAT</u> ACCCTC	66,6
moxSAASoti H74K_rev	GAG GGT ATT <u>TGA</u> CAA TCC CTC TGT TAC	66,6
moxSAASoti H74X_fw	GTAACAGAGGGATTGTC <u>NNNT</u> ACCCTC	66,6-71,5
moxSAASoti H74X_rev	GAG GGT AN <u>NGA</u> CAA TCC CTC TGT TAC	66,6-71,5
moxSAASoti H125Y_fw	CAT CCA TGT TTT ACG GTA CAA ACT TTC	63,7
moxSAASoti H125Y_rev	GAA AGT TTG TAC CGT AAA ACA TGG ATG	63,7
moxSAASoti G78N_fw:	TAC CCT CCC <u>AAC</u> ATC CCC GAC TA	66,6
moxSAASoti G78N_rev:	TAG TCG GGG ATG TTG GGA GGG TA	66,6
moxSAASotiI 15K_fw:	TGG AAT TAA <u>AGT</u> TTC ACA TGG ATG GCA A	64,4



moxSAASotiI 15K_rev:	TT GCC ATC CAT GTG AAA <u>CTT</u> TAA TTC CA	64,4
moxSAASotiT 32E_fw:	GCT <u>GAA</u> GGCAAAGCGAAGCCTTA	64,6
moxSAASotiT 32E_rev:	TAA GGC TTC GCT TTG CCT TCA GC	64,6
SH-Xba_rev	TGC TCT AGA TCA GAT CTC GTT CAG TCT GGC	72,1
moxSH_K_Hi ndIII	TAA AGC TTG CCA CCA TGG CTC TGA GCA AG	71,9
moxSH_HindI II	TAA AGC TTA TGG CTC TGA GCA AGC AGT AC	69,1

Амплификацию фрагментов ДНК проводили в термоциклере по следующей схеме:

1. 95°C, 5 минут (денатурация ДНК)
2. 95°C 15 сек (денатурация ДНК)
3. 59°C, 30 сек (отжиг праймеров)
4. 72°C, 1000 п.о./мин (Taq полимераза); 500 п.о./мин (Pfu полимераза) (элонгация)
5. Повтор пунктов 2 -4 20 раз.
6. 72°C, 10 минут (элонгация)

Полученные ПЦР-фрагменты анализировали в 1% ТАЕ агарозном геле, затем проводили очистку ДНК из геля с помощью набора QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, США).

#### **Получение конструкций для введения гена SAASoti в клетки млекопитающих**

Для введения гена ФБ в клетки млекопитающих использовался вектор рсDNA3.1. Ген moxSAASoti с оптимизированными кодонами для экспрессии

в клетках млекопитающих синтезирован Synbio Technologies (Китай) с добавочными сигнальными последовательностями для локализации в компартментах: для локализации в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) добавлены сигнальная последовательность пролактина на 5'конце и AAGGATGAGCTG (KDEL) на 3' конце, для аппарата Гольджи сигнальная последовательность GalT на 5'конце. Конструкции были синтезированы в векторе pUC57-Kan и субклонированы в pcDNA3.1 по сайтам HindIII/XbaI. Ген moxSAASoti без сигнальных последовательностей был клонирован с помощью ПЦР из вышеописанных конструкций (праймеры moxSH\_K\_HindIII, moxSH\_HindIII и SH-Xba\_rev) в pcDNA3.1 по сайтам HindIII/XbaI.

#### **Выделение ДНК из геля**

Проводилось с помощью набора QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, США) в соответствии с рекомендацией производителя

#### **Рестрикция ДНК**

moxSAASoti клонировали в вектор pET22b по сайтам NdeI/EcoRI, обрабатывая плазмидную ДНК и ПЦР-фрагменты последовательно эндонуклеазами рестрикции NdeI и EcoRI, инкубировали в течение 16 часов. Состав реакционной смеси соответствовал рекомендации производителя.

moxSAASotiH(humanized) клонировали в вектор pcDNA3.1 по сайтам HindIII/XbaI, обрабатывая вектор и ПЦР фрагменты одновременно эндонуклеазами рестрикции FDHindIII и FDXbaI. Состав реакционной смеси и время инкубации соответствовали рекомендации производителя.

После каждого этапа рестрикции ДНК анализировали в 1% ТАЕ агарозном геле, затем проводили очистку ДНК из геля с помощью набора QIAquick gel extraction kit (QIAGEN, США). Полученные ДНК-фрагменты использовали для лигирования.

#### **Лигирование ДНК-фрагмента в вектор**

Добавляли вектор и вставку в молярном соотношении 1:3 (1:10 для сайт-насыщающего мутагена), концентрацию ДНК определяли с помощью NanoDrop One; 10x буфер для лигазы, ДНК-лигазу и доводили H<sub>2</sub>O mQ до конечного объема 20 мкл (согласно протоколам производителя). Смесь инкубировали при 14 °С в течение 16 часов, после чего использовали для трансформации компетентных клеток *E. coli* DH5α или *E. coli* BL21(DE3). Для последующей трансформации методом электропорации также добавлялся этап инкубирования 5 мин при 95 °С.

**Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК, содержащей гены рекомбинантных белков (метод «теплового шока»)**

К 100 мкл компетентных клеток добавляли 10-100 нг плазмидной ДНК в лигазном буфере. Смесь инкубировали в ледяной бане в течение 30 минут, затем подвергали тепловому шоку (2 мин при 42 °С и ещё 2 мин в ледяной бане). Добавляли к клеткам 900 мкл среды LB и инкубировали 1 час при 37 °С. Полученную суспензию клеток высевали на селективную среду и выращивали при 37 °С.

**Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК, содержащей гены рекомбинантных белков (метод электропорации)**

К 50 мкл компетентных клеток добавляли 1 мкл лигазной смеси или 10-100 нг плазмидной ДНК. Смесь переносили в охлажденную 0,2 см кювету для электропорации (BioRad, США). Помещали в электропоратор (BioRad, США), проводили электропорацию по программе E02. Добавляли к клеткам 950 мкл среды LB, переносили в стерильную пробирку 1,5 мл и инкубировали 1 час при 37 °С. 50 мкл полученной суспензии клеток высевали на селективную среду и выращивали при 37 °С.

**Анализ клонов на наличие ДНК, содержащей ген рекомбинантного белка**

Полученные после лигирования и трансформации клоны анализировали методом ПЦР с использованием внешних праймеров. Для получения матрицы ДНК отдельную колонию помещали в 10 мкл лизис буфера для колоний,

инкубировали 5 мин при 95 °С, затем добавляли 25 мкл воды и центрифугировали 1 мин при 5000 об./мин. 1 мкл полученного раствора использовали в качестве матрицы ДНК. ПЦР проводили согласно методике, описанной ранее, конечную смесь анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле.

При наличии ДНК, кодирующей ген рекомбинантного белка в плазмидной ДНК, её отправляли на секвенирование (Евроген, ИБХ РАН). После подтверждения наличия замены в ДНК рекомбинантного белка проводили трансформацию в клетки *E. coli* BL21(DE3) для последующей экспрессии полученных вариантов, содержащих замены соответствующих а.о.

#### **Приготовление компетентных клеток для метода «теплового шока»**

Для приготовления компетентных клеток для всех типов трансформации использовали свежую ночную культуру *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) или *E. coli* (BL21(DE3)) по методике, описанной в [130,131].

Для этого, предварительно, в жидкую LB-среду вносили несколько колоний бактериальных клеток *E. coli*, взятых с агаризованной LB, и выращивали в термостатируемом шейкере при 37°С на 220 об/мин в течение ночи (16 часов).

Ночную культуру обновляли в свежей LB-среде и выращивали при 37°С на 220 об/мин до оптической плотности OD<sub>600</sub>=0,375. Далее культуру охлаждали во льду (4 °С) в течение 10 мин и затем осаждали центрифугированием при 4 °С на 1600 об/мин в течение 7 минут.

Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 10 мл охлаждённого стерильного 60 мМ CaCl<sub>2</sub> и центрифугировали 5 минут при 1100 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали в 10 мл охлаждённого стерильного 60 мМ CaCl<sub>2</sub> и инкубировали во льду (4°С) в течение 30 минут.

После инкубации клетки осаждали центрифугированием при 4°C на 1100 об/мин, в течение 7 минут, сливали надосадочную жидкость и добавляли 200 мкл свежего холодного CaCl<sub>2</sub> с 25% глицерином. Клетки хранили при -70°C. Все процедуры проводили в стерильных условиях.

### **Приготовление компетентных клеток для метода электропорации**

Для этого, предварительно, в жидкую LB-среду вносили несколько колоний бактериальных клеток *E. coli*, взятых с агаризованной LB, и выращивали в термостатируемом шейкере при 37°C на 220 об/мин в течение ночи (16 часов).

1,5 мл ночной культуры вносили в 150 мл свежей LB-среды и выращивали при 37°C на 220 об/мин до оптической плотности OD<sub>600</sub>=0,5-0,6. Далее культуру охлаждали во льду (4 °C) в течение 10-15 мин и затем осаждали центрифугированием при 2 °C на 5000 об/мин в течение 20 минут.

Надосадочную жидкость удаляли, а осадок ресуспендировали в 150 мл охлаждённой стерильной воды и центрифугировали 20 минут при 5000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали в 150 мл охлаждённой стерильной воды центрифугировали повторно.

Надосадочную жидкость удаляли и добавляли 150 мкл свежей воды. Клетки использовали для электропорации сразу по 50 мкл суспензии клеток на реакцию.

### **Анализ колоний *E. coli*, содержащих плазмидные ДНК с геном рекомбинантного белка на наличие созревшего флуоресцентного белка**

Трансформированные клетки *E. coli* (DH5α или BL21(DE3)), содержащие плазмидные ДНК с генами рекомбинантных белков, высевали на агаризованную LB-среду с селективным антибиотиком (Ap в конечной концентрации 1 мг/л) и IPTG в конечной концентрации 100 мкМ, выращивали в течение ночи (16 часов). Методика анализа колоний на наличие флуоресценции и фототрансформаций описана в части «2.4 Спектральные методы».

## **Выращивание трансформированных клеток и индукция биосинтеза белков**

Для биосинтеза белков использовали свежую ночную культуру клеток *E. coli* (BL21(DE3)). Для этого предварительно в жидкую LB-среду с селективным для данного штамма антибиотиком (Ap) в конечной концентрации 1 мг/л вносили несколько колоний бактериальных клеток *E. coli*, взятых с агаризованной LB и выращивали на качалке при 37°C на 220 об/мин в течение ночи (16-18 часов). Ночную культуру обновляли в свежей LB-среде с Ap и выращивали при 37 °C на 220 об/мин до оптической плотности  $OD_{550}=0,6\div 0,8$ .

Затем вносили индуктор транскрипции IPTG (100 мМ) до конечной концентрации 0,1 мМ, снижали температуру до 20 °C и инкубировали культуру клеток в течение 24 часов при перемешивании 220 об/мин. После клетки осаждали центрифугированием при 4700 об/мин в течение 20 минут. Полученную биомассу хранили при -20°C и использовали для дальнейшего выделения белков.

Оценка степени индукции проводилась путём отбора 1 мл суспензии клеток после добавления индуктора в определённый момент времени и измерения их оптической плотности ( $OD_{600}$ ) и интенсивности флуоресценции на  $\lambda_{em}=519$  нм. Полученные пробы сохраняли и анализировали методом ПААГ-электрофореза в денатурирующих условиях.

### **Выделение плазмидной ДНК методом щелочного лизиса**

Для выделения плазмидной ДНК использовали набор для выделения плазмидных ДНК (QIAprep MiniPrep Kit, Qiagen, США)

### **Горизонтальный электрофорез фрагментов ДНК в агарозном геле**

ПЦР-продукты и плазмиды разделяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле в TAE-буфере с 0,001 мг/мл бромистого этидия (ДиАМ). Образец ДНК наносили на гель в буфере для нанесения ДНК.

Электрофорез проводили в горизонтальной камере Mini-SUB® Cell GT, Bio-Rad с буфером TAE при напряжении 60 В. Для определения размера ДНК-фрагментов использовали 1 kb ДНК-маркер (Евроген, Россия). Визуализацию проводили при помощи трансиллюминатора (TCP-15 MX, Vilber Lourmat) на длине волны 365 нм.

### **Выделение белков**

1. К клеткам *E. coli* BL21(DE3), содержащим экспрессированный рекомбинантный белок, добавляли буфер С, раствор П до конечной концентрации 1 мМ и ДНКзу I до конечной концентрации 10 мкг/мл, затем разрушали клетки с помощью ультразвукового гомогенизатора Qsonica Q125 (Qsonica, США) в режиме 10/10(УЗ/пауза), в течение 20-40 минут при 50% мощности.
2. Полученный клеточный лизат отделяли центрифугированием на 10000 об/мин в течение 30 мин (настольная центрифуга с охлаждением Sigma 3-18K (Sigma Laborzentrifugen, Германия)).
3. Супернатант насыщали  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  до 50 % и оставляли для осаждения на 16 часов.
4. Высоленные белки отделяли центрифугированием 4700 об/мин. в течение 20 мин (настольная центрифуга с охлаждением Sigma 3-18K (Sigma Laborzentrifugen, Германия)).
5. Окрашенный осадок растворяли в буфере А и далее очищали хроматографическими методами.

### **Гидролиз сенсоров каспазой 3 *in vitro***

Реакцию проводили с использованием PorcCasp3 WT в буфере для расщепления (20 мМ HEPES pH 7,4; 2 мМ EDTA; 0,1% CHAPS, 5 мМ DTT; 1 мг/мл BSA) при 37 °С в течение ночи.

## **2.3 Хроматографические методы**

### *Гидрофобная хроматография*

- Носитель: HiPrep Butyl FF 16/10, GE Healthcare (Германия)

- Буфер для нанесения: буфер А1

- Элюирующий буфер: буфер Б1

- скорость подачи элюента 2-10 мл/мин

Элюирование производили по схеме:

1. 30% буфера Б

2. градиент 30-100% буфера Б

За ходом элюирования следили спектрофотометрически на длинах волн 280 нм и 509 нм.

#### *Анионообменная хроматография*

- Носитель: MonoQ 5/50 GL, GE Healthcare (Германия)

- Буфер для нанесения: буфер А

- Элюирующий буфер: буфер Б

- скорость подачи элюента 0,5-3 мл/мин

Элюирование производили в градиенте буфера Б1 0-50%. За ходом элюирования следили спектрофотометрически на длинах волн 280 нм и 509 нм.

#### *Гель - фильтрация*

- Носитель: Superdex 200 100/20 GL, GE Healthcare (Германия)

- Буфер: буфер С

- скорость подачи элюента 0,5-1 мл/мин



Элюирование проводили со скоростью 0,7 мл/мин. За ходом элюирования следили спектрофотометрически на длинах волн 280 нм и 509 нм. Молекулярные веса определяли согласно калибровочной кривой (Рис. 9). Калибровку проводили с использованием стандартов для гель-фильтрации (BioRad (Тиреоглобулин (бычий) – 670 кДа  $\gamma$ -глобулин (бычий) – 158 кДа; Овальбумин (куриный) – 44 кДа; миоглобулин (лошадиный) – 17 кДа; витамин В12 – 1,35 кДа)). Калибровочная кривая была получена путем построения зависимости коэффициента распределения  $K_{av} = (V_e - V_0)/(V_t - V_0)$  от десятичного логарифма молекулярного веса ( $M_w$ ) стандартов, где  $V_e$  – объем элюирования,  $V_0$  – мертвый объем и  $V_t$  – общий объем элюента.

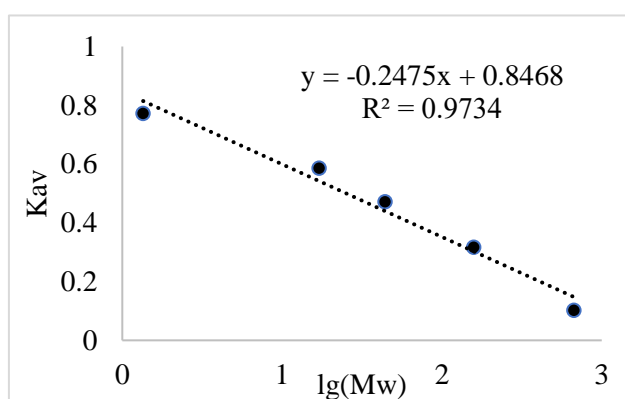


Рисунок 9. Калибровочная кривая гель-фильтрации на носителе Superdex 200 100/20 GL.

**Определение олигомерного состояния методом динамического светорассеяния (ДСР)** проводили на приборе DynaPro Titan (Wyatt Technology Corporation, США) при 25 °С в 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4 при лазерном освещении 800 нм в кварцевой кювете 1,5 мм (Hellma, Германия).

**Электрофорез белков и клеточных лизатов в полиакриламидном геле (по Лэммли [71])**

Проводили в ПААГ (10×10×0,1 см), содержащем 0,1% (m/V) SDS (точный состав геля приведен в Таблице 6), в электродном буфере TGS в ячейке Mini-PROTEAN® II (Bio-Rad) при напряжении 90/180 В. Клеточные лизаты и белки наносили на гель в **буфере для нанесения белков**. Перед

нанесением на гель пробы прогревали в течение 5 мин при 95 °С и центрифугировали 5 мин при 14500 об/мин. Белковые полосы визуализировали с использованием PageBlue™ Protein Staining Solution (согласно протоколам производителя).

Таблица 6. Состав геля для денатурирующего электрофореза белков

	<b>Разделяющий слой, 15% (нижний)</b>	<b>Концентрирующий слой, 5% (верхний)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	0,92 мл	1,36 мл
<b>Tris-HCl</b>	1 мл (pH 8,8)	0,25 мл (pH 6,8)
<b>AA/бис</b>	2 мл	0,34 мл
<b>SDS 10%</b>	40 мкл	20 мкл
<b>TEMED</b>	3 мкл	3 мкл
<b>ПСА</b>	60 мкл	30 мкл
<b>V<sub>общ</sub>, мл</b>	4 мл	2 мл

## 2.4 Спектральные методы

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра (СФ) Cary 60.

Концентрации белков оценивали по закону Бугера-Ламберта-Бера в логарифмическом виде (5):

$$D = \epsilon lc, \quad (5)$$

где  $D$  – оптическая плотность раствора, о.е.;  $\epsilon$  – молярный коэффициент поглощения,  $M^{-1}cm^{-1}$ ;  $l$  – длина оптического пути, см;  $c$  – концентрация поглощающего вещества,  $M$ .

Молярные коэффициенты поглощения  $\epsilon$  новых вариантов при pH 7,4 (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl) рассчитывали, используя известные значения  $\epsilon_{280}$  (на основании последовательности SAASoti с помощью ПО ExPASy ProtParam),  $D_{280}$  (по спектру поглощения) и  $l$  (характеристика кюветы).

**Спектры флуоресценции** регистрировали с помощью спектрофлуориметра Cary Eclipse в микрокувете Hellma (Германия), оптический путь 3 мм

**Измерения кинетики фотопревращений** на колониях и в микрообъемах растворов белков регистрировали на установке на базе микроскопа Olympus BX-43. 4 Thorlabs LEDs были коллимированы ахроматическими конденсорными линзами Thorlabs ACL2520-A и объединены с 3 дихроическими зеркалами Thorlabs DMLP425R, DMLP490R и Edmund Optics #67-078, с отсекающими фильтрами на длине волны возбуждения 458 нм. Спектральные полосы пропускались полосовыми фильтрами Thorlabs MF390/18 и Chroma ET448/19x, ET470/24m, ZET561/10x или ET560/25x. Была использована схема Köhler для получения более гомогенного пучка света после объектива микроскопа. Пучок света после коллиматорных линз фокусировался на задней плоскости объектива ахроматическими линзами (Thorlabs AC254-125-A). Затем ахроматический свет отражался разделителем светового луча 50/50 на объектив. Флуоресцентное изображение проецировалось на CCD камеру после разделителя светового луча через трубчатые линзы после Chroma 500LP и ZET562NF Notch фильтра. Камера использовалась для фокусировки и ориентирования образца. При этом ахроматический объектив фокусировал изображение на входной щели спектрометра Avesta ASP-75 через второй разделитель светового луча 70/30. Светодиоды управлялись с помощью Thorlabs LEDD1B драйвера и собственноручно спроектированный USB DAC с самописным программным обеспечением Python, позволяющим управлять светодиодами с временным разрешением 1 мс. Полученные световые плотности мощности имели максимальные значения 282.4, 528.4, 706.1, 45.6 (ZET561/10x) мВатт/см<sup>2</sup> для длин волн 390, 450, 470 и 560 нм соответственно после объектива 20x/0.4 NA Olympus PlanApo.

**Определение константы кислотности хромофора вариантов SAASoti**

Константу кислотности возбужденного состояния хромофора измеряли по изменению интенсивности флуоресценции образца белка при различных значениях рН. Для этого готовили растворы ФБ в буферах с рН 4-9 с шагом 0,5 и измеряли интенсивность флуоресценции каждого образца. Для приготовления серии буферных растворов с рН<6 использовали 200 мМ цитрат натрия, рН>6 – 200 мМ фосфат натрия.

Расчет проводили с использованием формулы Хендерсона-Хассельбальха (6),

$$H^+ + Chrom^- \rightleftharpoons CromH \quad I([H^+]) = \frac{I_0 K}{K + [H^+]} + C, \quad (6)$$

где I – интенсивность флуоресценции образца, I<sub>0</sub> – максимальная интенсивность флуоресценции при высоких значениях рН, K – константа кислотности хромофора в возбуждённом состоянии, [H<sup>+</sup>] – концентрация ионов водорода.

### Определение квантового выхода

Относительный квантовый выход определяли, используя в качестве раствора сравнения V127T SAASoti. Для этого для каждой мутантной формы готовили 5 образцов и 5 растворов сравнения (V127T SAASoti) с оптической плотностью на длине волны возбуждения, не превышающей значения A<sub>450</sub> = 0,1. Далее измеряли их оптические плотности на длине волны возбуждения и спектры флуоресценции. Для расчета площади спектров использовали приборные поправочные коэффициенты флуоресценции. Квантовый выход рассчитывали по формуле 7:

$$\phi_{SAASoti} = \phi_{V127T} * \frac{S_{SAASoti} * A_{V127T}}{S_{V127T} * A_{SAASoti}}, \quad (7)$$

где  $\phi_{SAASoti}$ ,  $S_{SAASoti}$ ,  $A_{SAASoti}$  – квантовый выход, площадь под спектром флуоресценции, оптическая плотность вариантов C21N/V127T и C106V/V127T SAASoti;  $\phi_{V127T}$ ,  $S_{V127T}$ ,  $A_{V127T}$  – квантовый выход,

площадь под спектром флуоресценции, оптическая плотность V127T SAASoti.

**Время жизни флуоресценции** регистрировали с помощью FluoTime 200 (PicoQuant, Германия) и рассчитывали с помощью FluoFit 4.2 (PicoQuant, Германия).

**Возгорание флуоресценции** регистрировали для растворов белков с оптической плотностью на длине волны поглощения 0,1 в буфере 20 мМ Tris-HCl (pH 7,4) 150 мМ NaCl с помощью установки SpectrCluster, источника света Lumencor Spectra X LED в термостатируемой (25 °C) микроювете Hellma (Германия), оптический путь 3x3 мм. Возбуждение флуоресценции проводилось на длине волны 550±15 нм мощностью 0,5 мВатт/см<sup>2</sup>. Интенсивность флуоресценции регистрировалась для KFP на длине волны 600 нм[88] Ultramarine 626 нм[84], anm2CP 597 нм[132], для gfasCP и spisCP максимум флуоресценции не определен[83] и в эксперименте флуоресценция полностью отсутствовала на длинах волн от 580 до 630 нм.

**Интегралы перекрывания** были рассчитаны с использованием программного обеспечения а|е - UV-Vis-IR Spectral Software 2.2 (FluorTools). Фёстеровские радиусы вычислялись по формуле (8)

$$R_0 = 0.211 \left[ \frac{\kappa^2 \phi_D J(\lambda)}{n^4} \right]^{1/6}, \quad (8)$$

где  $\kappa^2$  – коэффициент, описывающий взаимную ориентацию дипольных моментов переходов донора и акцептора и равный 2/3 для свободно вращающихся диполей;  $\phi_D$  – квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора ( $\phi_D$  (TagRFP) = 0,48);  $J(\lambda)$  – интеграл перекрывания нормированных спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора;  $n$  – показатель преломления растворителя (для воды равен 1,33).

### **Ведение культуры и трансфекция клеток HeLa *in vitro***

Клетки HeLa выращивались монослоем на флаконах 25 мл в полной среде (RPMI-1640 с глутамином+сыворотка+антибактериальный агент) до

конфлюэнтности 80-90% в течение 1-2 пассажей. Затем производился пересев клеток на планшеты для последующей трансфекции. Клетки снимали раствором трипсина-Версена по стандартной методике[133]. Трансфекция плазмидной ДНК проводилась через 24 ч после посева клеток на планшеты с помощью реагента для трансфекции по технологии активированного дендримера PolyFect (QIAGEN, США). Трансфекция проводилась с применением пропорций согласно рекомендациям производителя. Для этого рекомбинантная ДНК смешивалась со средой без сыворотки и антибактериального агента, затем добавлялся реагент PolyFect для образования комплекса с ДНК. Смесь инкубировали 5-10 минут при комнатной температуре. С клеток удаляли старую среду, промывали DPBS и добавляли свежую полную среду. К смеси ДНК с реагентом PolyFect добавляли полную среду, пипетировали 2 раза и переносили смесь к клеткам. Планшет со смесью осторожно покачивали для распределения реагента и убирали в CO<sub>2</sub> инкубатор на 37°C. Эффективность трансфекции анализировали через 24-48 ч.

Экспрессию белка в клетках HeLa анализировали на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse TE2000-U. Для возбуждения флуоресценции использовали ртутную лампу (Super High Pressure Mercury Lamp power supply (Nikon, Japan)) с фильтром GFP-L ex460-500, DM 505, BA 510 (Nikon, Japan). Изображения были получены с помощью ПО NIS-Elements F.

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1 Подбор оптимального хромопротеина в качестве акцептора во FRET-паре

Для создания пары «красный флуоресцентный белок-хромопротеин» необходимо выбрать пару с максимальным перекрытием спектров флуоресценции и поглощения. В качестве донора был выбран яркий красный флуоресцентный белок TagRFP [134] (молекулярная яркость составляет 48 000), который ранее успешно применялся в качестве донора во FRET-сенсорах [82,135]. На роль нового нефлуоресцирующего акцептора были отобраны несколько хромопротеинов: Ultramarine [84], anm2CP [132], gfasCP [83], spisCP [83], спектральные и физико-химические характеристики которых приведены в Таблице 7.

Таблица 7. Спектральные и физико-химические характеристики хромопротеинов описанные в литературных источниках

Хромопротеин	Олигомерное состояние*	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	$\epsilon, M^{-1}cm^{-1}$
Ultramarine	Мономер	586/626(QY=0.001)	64 000
gfasCP	Тетрамер	580/н.о.	205 000
anm2CP	Мономер	566/н.о.	120 000
spisCP	Тетрамер	564/н.о.	61 000

Все выбранные хромопротеины имеют высокие значения коэффициентов молярного поглощения, а также высокие значения интегралов перекрытия спектров поглощения со спектром флуоресценции TagRFP, количественно демонстрирующие потенциальную эффективность переноса энергии в этих парах. Также для полученных пар рассчитаны ферстеровский радиусы, показывающие расстояние, на котором эффективность переноса энергии будет составлять 50% (Таблица 8).

Таблица 8. Теоретические значения интегралов перекрытия и ферстеровских радиусов для пар TagRFP-хромопротеин

	TagRFP- Ultramarine	TagRFP- gfasCP	TagRFP- anm2CP	TagRFP- spisCP
$J(\lambda)^1$ , $\text{нм}^4/\text{М} \cdot \text{см}$	$4,511 \cdot 10^{15}$	$1,208 \cdot 10^{16}$	$6,233 \cdot 10^{15}$	$2,537 \cdot 10^{15}$
$R_0$ , Å	59	69	62	53

Все 4 FRET-пары имеют высокие значения этих параметров, что делает их перспективными кандидатами для создания FRET-сенсоров. Также экспериментально показано, что выбранные хромопротеины не флуоресцируют при возбуждении мощными световыми потоками на длине волны 530 нм, в отличие от ранее применявшегося во FRET-сенсоре с TagRFP белка KFP [82] (Рис. 10). Таким образом, ещё одним преимуществом новых FRET-пар является отсутствие фоновой флуоресценции.

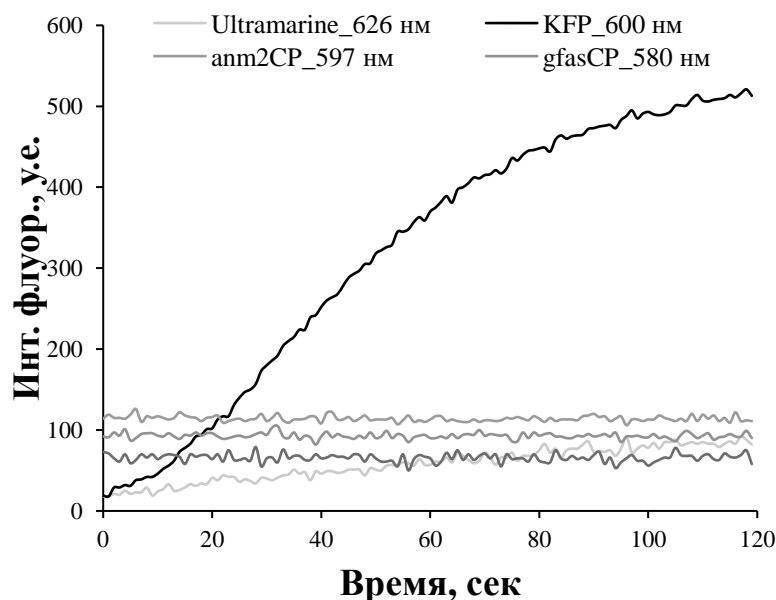


Рисунок 10. Кинетика возгорания флуоресценции хромопротеинов при облучении их светом с длиной волны 530 нм (мощность 0,5 Вт/см<sup>2</sup>). Образцы находились в растворе 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4.

Гены всех 4 хромопротеинов были экспрессированы в клетках *E. Coli* BL21(DE3), выделены и очищены, их олигомерное состояние



охарактеризовано методами гель-фильтрации (ГФ) и динамического светорассеяния (ДСР). Полученные результаты отличались от данных, приведенных в литературных источниках. anm2CP присутствовал в растворе в димерной форме с примесью тетрамерной фракции, белки gfasCP и spisCP имели только димерную форму, Ultramarine – мономерную (Таблица 9). При очистке хроматографическими методами новых хромопротеинов было замечено, что их связывание с носителями отличается от других GFP-подобных белков: с гидрофобным носителем связывание слабее, в то время как с анионообменным сильнее. Поскольку с носителем для гель-фильтрации у белков может быть слабое электростатическое взаимодействие, результаты гель-фильтрации могут немного искажаться. Однако данные ДСР согласуются с данными гель-фильтрации, подтверждая полученные значения. Отличие полученных результатов от литературных данных может быть связано с различием методов, использованных для определения олигомерного состояния и концентраций белковых растворов. В случае gfasCP и spisCP в работе [83] олигомерность была определена методом электрофореза в полунативных условиях. Для anm2CP использовалась гель-фильтрация, однако, отличался носитель.

*Таблица 9. Результаты характеристики олигомерного состояния хромопротеинов методами ГФ на носителе Superdex 200 и ДСР.*

Белок	V <sub>эл</sub> , мл	Mw расч (ГФ)	R, нм	Mw расч (ДСР), кДа
Ultramarine	17,35	11	2,2	20
gfasCP	15,04	42	3,4	58
spisCP	15,40	34	3,1	47
anm2CP	15,04	42	4,0	89
	12,94	144		

Таким образом, в первую очередь, был получен FRET-сенсор TagRFP-23-Ultramarine (TR-23-U), в котором 23 обозначает гибкий линкер из 23 аминокислот, содержащий сайт распознавания каспазы-3 DEVD [82].

Подобраны условия оптимального созревания сенсора. После добавления индуктора IPTG клетки *E. coli*, экспрессирующие сенсор, инкубировали при 20°C в течение 20 часов для созревания TagRFP, затем при 37°C в течение 4 часов для созревания белка Ultramarine. Сенсор выделили и очистили последовательными гидрофобной и анионообменной хроматографиями как описано ранее [80]. На этапе гидрофобной хроматографии было отмечено разделение образца на две фракции (Рис. 11 А), при элюировании которых было видно, что в первой фракции отсутствует поглощение, соответствующее белку Ultramarine (586 нм). На спектрах поглощения фракций также видно, что у фракции 2 присутствует плечо на 586 нм, а у фракции 1 оно отсутствует (Рис. 11 Б). Таким образом, метод гидрофобной хроматографии позволяет отделить сенсор с созревшим белком Ultramarine от фракций с незрелым.

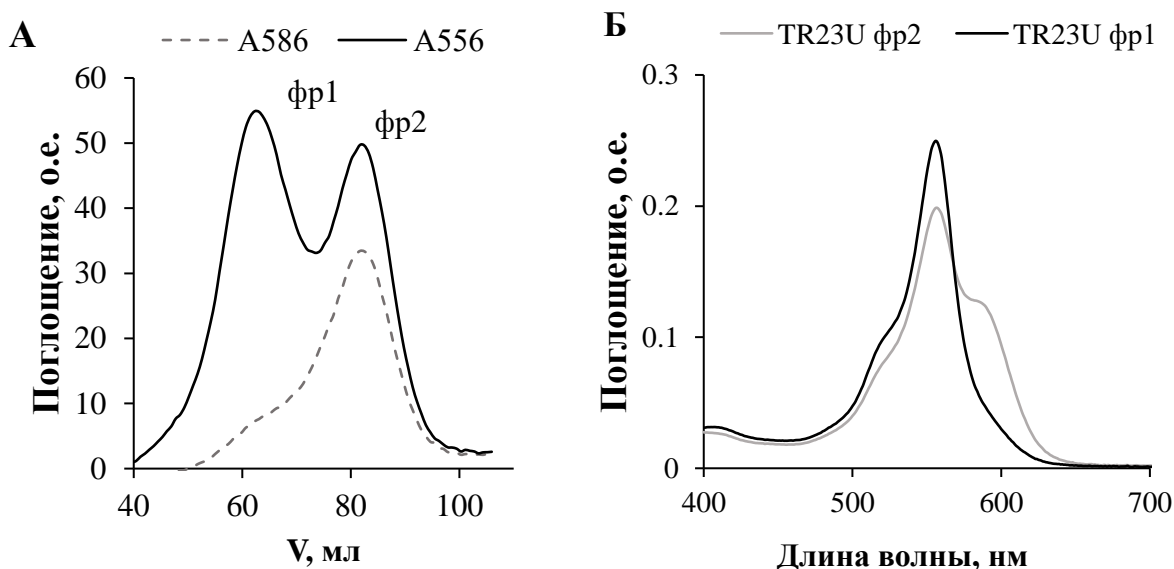


Рисунок 11. А – профили элюирования сенсора TR23U гидрофобной хроматографии, зарегистрированные на длинах волн 556 и 586 нм. Б – спектры поглощения, соответствующие собранным фракциям 1 и 2.

Методами гель-фильтрации и ДСР показано, что полученный сенсор является димером, то есть оба белка в сенсоре находятся в мономерном состоянии (Таблица 10).

Таблица 10. Данные гель-фильтрации и средний размер ДСР. В скобках приведены расчетные молекулярные веса.

	ГФ V, мл (Mw, кДа)	ДСР R, нм (Mw, кДа)
TR-23-U	15,5(32)	2,8±0,2 (37±8)

Свойства новой конструкции в качестве FRET-сенсора были подтверждены на основании измерений времени жизни и интенсивности флуоресценции TagRFP до и после инкубации сенсора с каспазой-3 *in vitro*. Сенсор инкубировали с каспазой-3 в буфере (20 mM HEPES pH 7,4; 2 mM ЭДТА; 0,1% CHAPS, 5 mM дитиотреитола; 1 мг/мл БСА) в течение ночи при 37°C. После инкубации интенсивность флуоресценции TagRFP возросла более чем в 2 раза (Рис. 12), что свидетельствует об эффективном гидролизе сенсора каспазой-3.

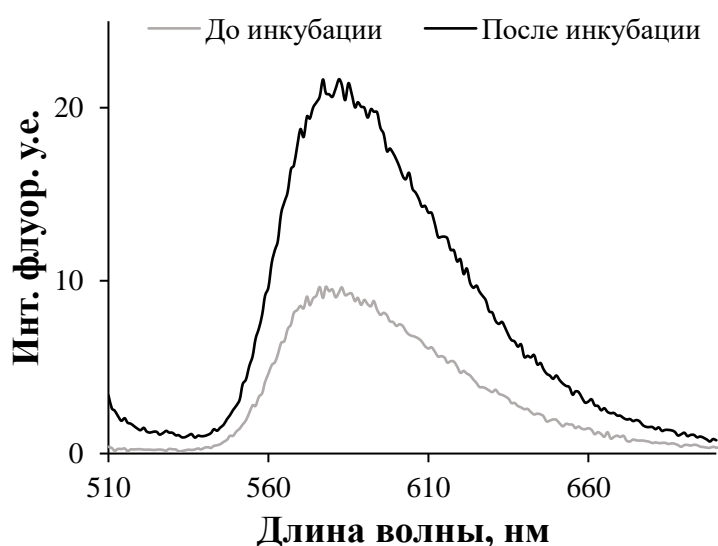


Рисунок 12. Спектры флуоресценции сенсора TR23U до и после инкубации с каспазой-3 в течение ночи

Время жизни флуоресценции TagRFP в сенсоре TR-23-U описывается биэкспоненциальной зависимостью (9):

$$I = I_1 * \exp(-t/\tau_1) - I_2 * \exp(-t/\tau_2) + c \quad (9)$$

где  $\tau_1 = 2,4$  нс соответствует времени жизни флуоресценции свободного TagRFP,  $\tau_2 = 1,1$  нс характеризует TagRFP в паре с акцептором Ultramarine, поскольку наличие FRET снижает время жизни [135]. Так, рассчитанная эффективность FRET по сокращению времени жизни донора (2) составляет 54%. Наличие долгоживущей компоненты для TagRFP-23-Ultramarine может свидетельствовать о наличии белковой конформации сенсора с минимальным FRET. Соотношение времени жизни свободного TagRFP и TagRFP-23-Ultramarine, в котором есть FRET, после ночной инкубации с каспазой-3 изменилось более чем в 5,8 раза (Таблица 11), а фракции с высоким FRET ( $A_2$  до и после) уменьшилось в 7 раз.

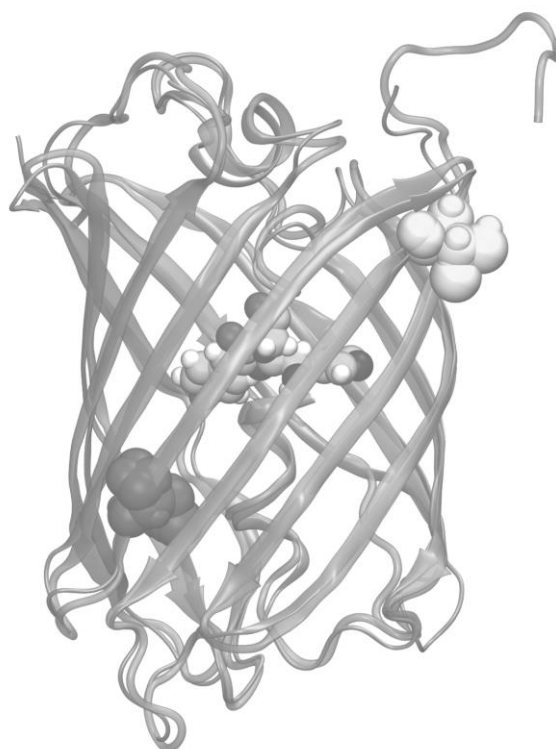
*Таблица 11. Параметры времени жизни флуоресценции белка TagRFP в сенсоре TR-23U до и после инкубации с каспазой-3.*

	$A_1$	$\tau_1$ , нс	$A_2$	$\tau_2$ , нс	$A_1/A_2$
<b>До инкубации</b>	17200	2,4	30200	1,1	0,57
<b>После инкубации</b>	14400	2,4	4300	1,1	3,35

После инкубации интенсивность флуоресценции TagRFP возросла более чем в 2 раза, а соотношение времен жизни флуоресценции свободного и связанного TagRFP изменилось в 5,8 раз в сторону свободного TagRFP. Возрастание этих двух показателей говорит о нарушении FRET между TagRFP и Ultramarine, то есть об эффективном расщеплении сенсора каспазой-3.

### 3.2 Получение бесцистеинового варианта SAASoti для работы в окислительных условиях клетки

Ранее, в работе [80] получены варианты mSAASoti с индивидуальными заменами всех пяти а.о. цистеина, а также путем сайт-направленного и случайного мутагенеза получен вариант с одновременной заменой трёх а.о. цистеина mSAASoti-3C (содержит C21N/C71G/C176A). Этот вариант использовали в качестве матрицы для получения полностью бесцистеинового варианта путем введения замен в 105 и 117 положениях. Добавление замен, которые были успешны в одиночном варианте, привело к получению нефлуоресцирующих вариантов белка. Согласно 3D-модели SAASoti остатки в позициях 105 и 117 располагаются на соседних бета-цепях бочонка (Рис. 13).



*Рисунок 13. 3D-выравнивание mSAASoti и Dendra2. Остаток C105 окрашен в темный цвет, внешний C117 — в светлый (нумерация остатков соответствует SAASoti). Изображение создано в программе VMD 1.9.3 (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/vmd-1.9.3/>)*

Вероятно, что объединение двух замен в этих положениях, работающих по отдельности, нарушает взаимодействие бета-цепей и разрушает структуру белка, что приводит к нефлуоресцентным вариантам. Поэтому путем сайт-

насыщающего мутагенеза одновременно по положениям 105 и 117 была получена библиотека клонов, из которых отобраны два наиболее ярко флуоресцирующих. Эти клоны содержали глицин в положении 105 и треонин или валин в положении 117. Новые варианты SAASoti были экспрессированы в *E. coli* BL21(DE3) и очищены по стандартной схеме [80]. Новые варианты были названы moxSAASoti-V и moxSAASoti-T, что соответствует различиям в заменах в положении 117 – валин или треонин, соответственно. Ход введения замен и названия новых вариантов представлены в Таблице 12.

*Таблица 12. Ход введения замен в бифотохромный белок SAASoti и названия новых вариантов.*

<b>Исходный белок</b>	<b>Замены</b>	<b>Название нового варианта</b>	<b>Источник</b>
SAASoti	V127T	mSAASoti	[70]
mSAASoti	C21N/C71G/C175A	mSAASoti-3C	[80]
<b>mSAASoti-3C</b>	<b>C105G/C117V</b>	<b>moxSAASoti-V</b>	Эта работа[136]
<b>mSAASoti-3C</b>	<b>C105G/C117T</b>	<b>moxSAASoti-T</b>	Эта работа [136]

Поскольку а.о. в положении 117 ориентирован наружу бочонка, его замена может привести к усилению агрегации новой формы белка. Поэтому методом гель-фильтрации было проанализировано олигомерное состояние новых вариантов. Объемы элюирования (Таблица 13) для обоих вариантов позволили получить расчетную молекулярную массу 25,7 кДа, что соответствует мономерной форме moxSAASoti. Это может свидетельствовать о том, что остаток 117 не играет существенной роли в олигомеризации вариантов moxSAASoti.

Таблица 13. Объем элюирования и молекулярная масса белков, рассчитанная по результатам гель-фльтрации на колонке Superdex 200. Буфер для элюирования 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4

“mox” вариант	V, мл	Mw, кДа
moxSAASoti-T	16,8	25,7
moxSAASoti-V	16,8	25,7

Было проанализировано влияние замен на фотохимические и фотофизические свойства. Кинетика фототушения зеленой формы белка описывается биэкспоненциальной моделью (уравнение (10)):

$$I = I_1 * \exp(-k_1 t) + I_2 * \exp(-k_2 t) + c \quad (10)$$

Биэкспоненциальное затухание флуоресценции ранее объяснялось существованием двух субпопуляций в возбужденном состоянии, которые затухают с разной скоростью[71,137].

Величины констант скорости фототушения новых вариантов имеют близкие значения и выше, чем у mSAASoti-3C и исходного mSAASoti, но при этом фотодеструкция меньше, чем у mSAASoti-3C. (Рис. 14)

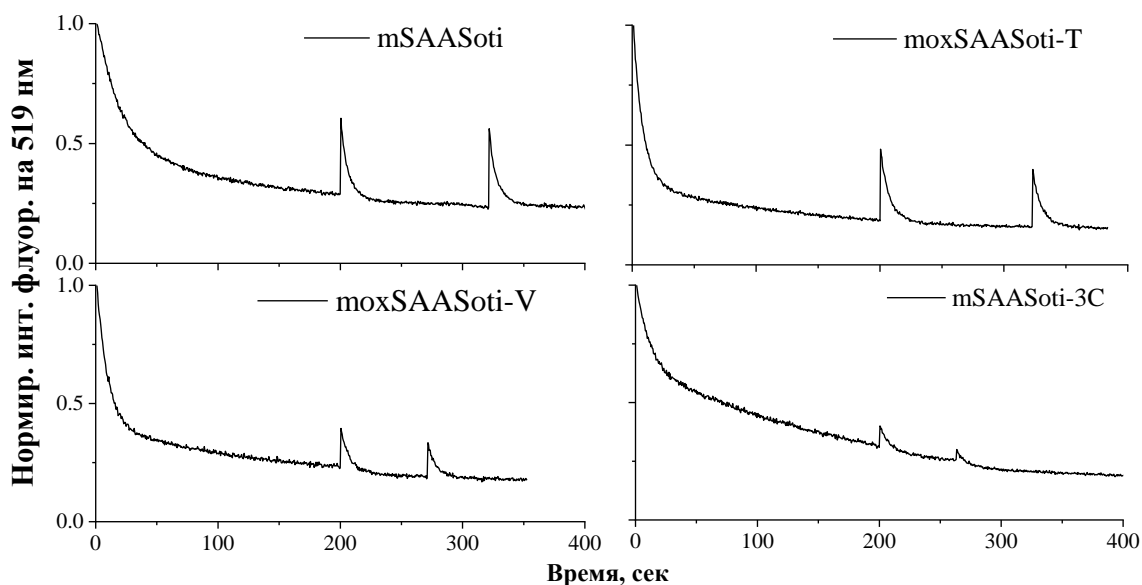


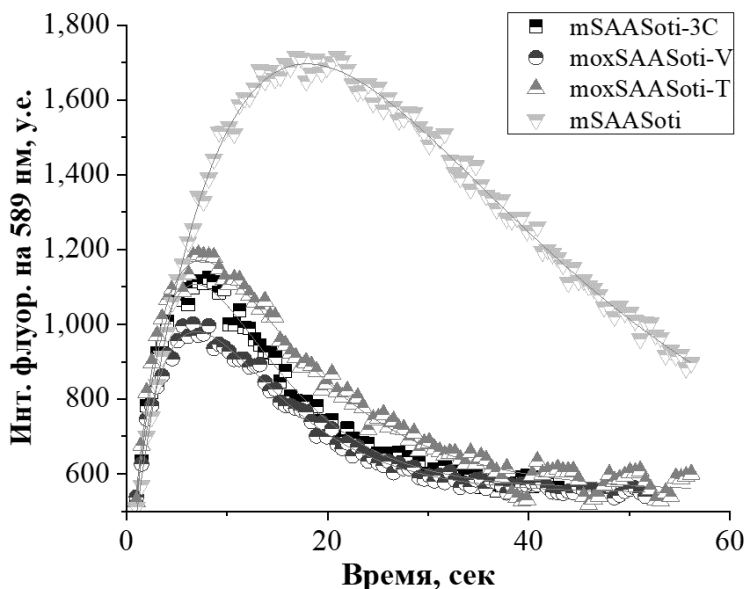
Рисунок 14. Кинетика трех циклов фотопереключения вариантов *mSAASoti*. Фототушения проводилось под действием света с длиной волны 470 нм, релаксация флуоресценции проводилась путем кратковременного облучения светом 400 нм низкой мощности. Буфер 20 мМ  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9,2.

Вариант *moxSAASoti-V* показал более низкую степень восстановления флуоресценции после фототушения, чем *moxSAASoti-T* (30% и 20% исходной интенсивности флуоресценции восстанавливались после первого цикла фототушения в случае *moxSAASoti-T* и *moxSAASoti-V*, соответственно), в то время как кинетические константы для обоих вариантов очень близки и характеризуют высокую скорость фототушения (Таблица 14). Восстановление флуоресценции после второго цикла фототушения более полное, что, вероятно, свидетельствует об одновременной реакции фотодеструкции в первом цикле фототушения. *moxSAASoti-T* демонстрирует наиболее высокое отношение предэкспоненциальных интенсивностей  $I_1/I_2$ , что свидетельствует о том, что быстропереклюющийся компонент ( $k_1$ ) вносит максимальный вклад в общую кинетику.

Также была проанализирована способность новых вариантов к зелено-красной фотоконверсии. Варианты *mox*, так же как их ближайший предок *mSAASoti-3C*, показали высокую скорость фотоконверсии, но низкую интенсивность получаемой красной формы (рис. 15). Возможно несколько



причин этого явления: 1) малая яркость и 2) высокая фотохимическая активность красной формы. Это, безусловно, может быть сочетанием обеих причин, что является предметом дальнейших исследований.



*Рисунок 15. Кинетика фотоконверсии вариантов mSAASoti. Фотоконверсия проводилась путем облучения образцов светом 400 нм в сочетании с 550 нм для возбуждения флуоресценции красной формы. Экспериментальные данные представлены точками, аппроксимация - серыми линиями. Буфер 200 мМ Tris-HCl, pH 7,4.*

Процесс фотоконверсии регистрировался по изменению интенсивности флуоресценции красной формы ( $\lambda_{em}=589$  нм). Он описывается биэкспоненциальной моделью (уравнение (11)):

$$I = -I_1 * \exp(-k_1 t) + I_2 * \exp(-k_2 t) + c \quad (11)$$

где первая компонента отвечает за образование красной формы, а вторая характеризует ее фотодеструкцию,  $c$  – фоновый и остаточный сигнал. Соответствующие кинетические параметры (Таблица 14) для вариантов mox близки к исходному mSAASoti-3C, что может свидетельствовать о том, что остатки в положениях 105 и 117 не влияют на фотоконверсию.

Таблица 14. Кинетические параметры фотовыключения, фотоконверсии, рассчитанные для вариантов mSAASoti

Мутантная форма	Параметры фотовыключения зелёной формы <sup>a</sup>			Параметры фотоконверсии <sup>b</sup>	
	$k_1 \cdot 10^3, c^{-1}$	$k_2 \cdot 10^3, c^{-1}$	$I_1/I_2$	$k_1 \cdot 10^3, c^{-1}$	$k_2 \cdot 10^3, c^{-1}$
mSAASoti	55,5±1,0	8,3±0,7	1,9	62 ±1	55±1
mSAASoti-3C	95,2±2,0	5,0±0,2	0,7	273±16	106±4
moxSAASoti-T	131,6±0,9	7,5±0,3	3,7	278±16	79±2
moxSAASoti-V	113,6±1,3	7,3±0,4	2,9	270±14	107±4

<sup>a</sup> параметры получены при анализе кинетики согласно уравнению (10)

<sup>b</sup> параметры получены при анализе кинетики согласно уравнению (11)

Основываясь на параметрах фотопревращений новых вариантов, в качестве единственного moxSAASoti был выбран вариант moxSAASoti-T, так как у него выше скорость фотовыключения, более полное восстановление флуоресценции после фотовыключения и выше скорость фотоконверсии, чем у moxSAASoti-V.

Проанализирована кинетика термической релаксации для moxSAASoti путем измерения интенсивности флуоресценции на 520 нм. Величина кинетической константы релаксации составляет  $0,021 \pm 0,001 \text{ мин}^{-1}$ , что до 8 раз больше, чем для других вариантов с заменами цистеинов и того же порядка, что и для mSAASoti[80].

Были измерены и проанализированы основные физико-химические и спектральные свойства (максимумы возбуждения/испускания  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , значения рКа хромофора, молярный коэффициент экстинкции ( $\epsilon$ ) и квантовый выход ( $\phi$ )) moxSAASoti и других вариантов mSAASoti с заменами а.о. цистеинов (Таблица 15). Максимумы возбуждения и эмиссии для зеленой и красной форм

не изменились. Молярный коэффициент экстинкции уменьшился, однако для зеленой формы он по-прежнему остается одним из самых высоких среди цистеиновых вариантов mSAASoti, а пониженное значение коэффициента экстинкции для красной формы может быть связано со снижением ее стабильности. Квантовый выход флуоресценции зеленой формы также снизился на 0,1, а молекулярная яркость нового варианта практически совпадает с C117S и C21N/C175A mSAASoti. Интересно, что наибольшее влияние новые замены оказывают на pKa красной формы mSAASoti. Ранее все цистеиновые замены приводили к более высоким значениям pKa (за исключением mSAASoti C117S, который имеет такое же значение pKa mSAASoti). Мы предполагаем, что это может быть аллостерический эффект от T117, потому что предыдущий вариант с одной заменой C117S показал самую низкую pKa красной формы всех других мутантов с одиночными заменами цистеиновых остатков.

*Таблица 15. Физико-химические и спектральные характеристики вариантов mSAASoti*

	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	pKa	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ , M <sup>-1</sup> ·cm <sup>-1</sup>	$\phi$	Яркость ( $\phi \cdot \epsilon$ )	Источни к
mSAASoti	509/519	6.3±0.1	75.0	0.59±0.0 2	44.3	[80]
	573/579	6.6±0.1	24.0			
C21N	509/519	6.4±0.1	82.4	0.61±0.0 2	50.3	
	579/590	7.5±0.1	25.4			
C105V	509/519	6.5±0.1	61.0	0.60±0.0 2	36.6	
	576/589	7.1±0.1	16.4			

C71V	509/519	6.5±0.1	65.1	0.63±0.0 4	41.0	
	577/590	7.0±0.1	12.3			
C175A	509/519	6.7±0.1	80.1	0.55±0.0 5	44.0	
	580/587	7.8±0.1	22.9			
C117S	509/519	6.2±0.1	66.3	0.54±0.0 3	35.8	
	580/590	6.7±0.1				
C21N/C7 1V	509/519	6.3±0.1	48.9	0.58±0.0 2	28.4	
	577/589	7.0±0.1				
C21N/C1 75A	509/519	6.3±0.1	65.4	0.55±0.0 3	36.0	
	580/590	7.4±0.1	12.7			
mSAASo ti-3C	509/519	6.4±0.1	83.8	0.60±0.0 2	50.3	
	577/589	7.2±0.2	14.8			
moxSAA Soti	509/519	6.1±0.1	71.8	0.50±0.0 2	35.9	Эта работа[1 36]
	577/589	6.3±0.1	11.3			

Мы предполагаем, что изменения в окружении хромофора, приводящие к увеличению скорости фотопереклочения, в свою очередь, могут ухудшать фотоконверсию. Это может быть связано с тем, что дополнительное пространство в окружении хромофора, способствующее цис-транс-изомеризации, затрудняет стабилизацию красной формы хромофора, что снижает эффективность фотоконверсии. Точечные замены в mSAASoti в

основном влияют на значения рКа (Таблица 15) красной формы и скорость фотопереключения зеленой формы. Примечательно, что одиночные и тройные замены, присутствующие в moxSAASoti-T, существенно изменяют эти два макроскопических свойства. Однако замены всех остатков цистеина приводят к восстановлению свойств mSAASoti. Неясно, какие именно микроскопические структурные особенности ответственны за эти изменения макроскопических параметров. Ранее [80] было показано, что гибкость а.о. F177 определяет скорость фотопереключения из выключенного состояния во включенное и что изменение расстояния C–O фенильного фрагмента хромофора ответственно за сдвиг рКа. Здесь мы проверяем эти представления на пяти белках семейства mSAASoti: mSAASoti, его одиночных мутантов C21N и C175A и тройного мутанта mSAASoti-3C, и самом moxSAASoti-T. При использовании классической молекулярной динамики (МД) в течение 200 нс для каждой модельной системы, проанализировано конформационное поведение боковой цепи F177. В качестве меры конформационного разнообразия мы выбрали двугранный угол C–C $\alpha$ –C $\beta$ –C $\gamma$  в остатке F177 (рис. 16 А, Б).

Варианты mSAASoti и moxSAASoti-T преимущественно демонстрируют конформации со значениями двугранных углов между 140 ° и 180 °. Для более медленных белков, одиночных и тройных мутантов mSAASoti, двугранные углы распределяются между 20° и 100°. Эта конформация менее благоприятна для фотопереключения («выкл-вкл»), так как карман связывания хромофора в этом случае более плотный, что затрудняет изомеризацию (рис. 16).

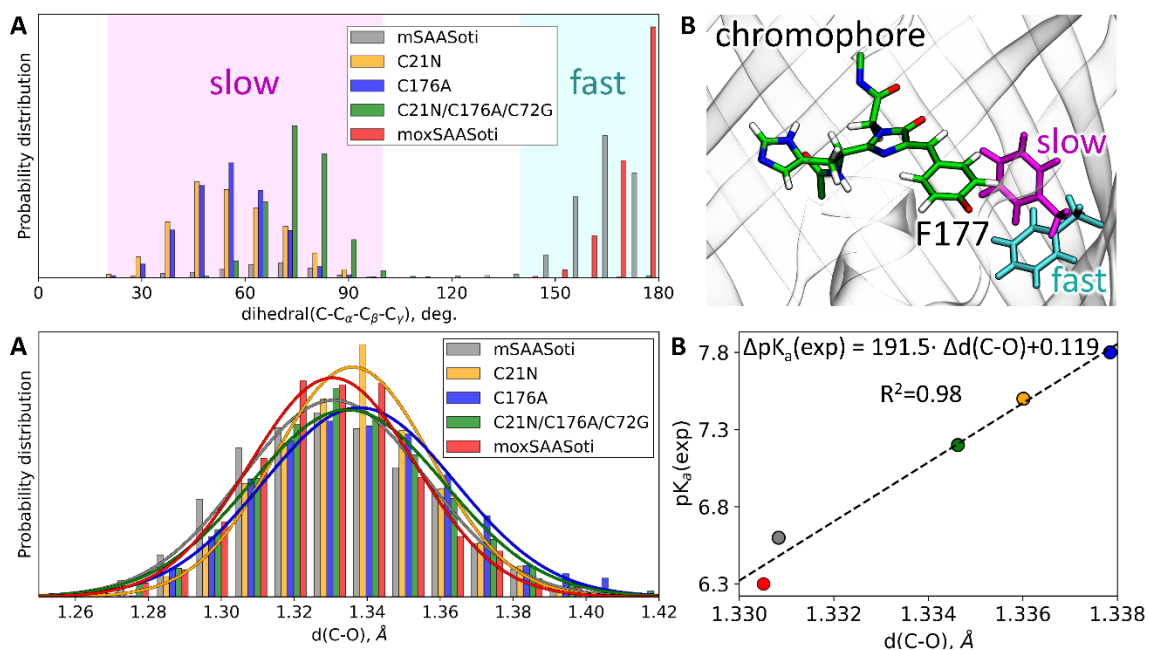


Рисунок 16. (А) Распределение диэдра  $C-C_{\alpha}-C_{\beta}-C_{\gamma}$  Phe177 в mSAASoti, его вариантах C21N, C176A, mSAASoti-3C и moxSAASoti-T. (Б) Для хромофора и двух различных конформаций остатка F177 голубая конформация соответствует более быстрой изомеризации из выключенного состояния в включенное, а пурпурный соответствует более медленной изомеризации из выключенного состояния в включенное. Изображения нарисованы в программе VMD 1.9.3 (<https://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/vmd-1.9.3/>). (В) Распределение расстояний связей  $C-O$  в фенильном фрагменте нейтральной красной формы хромофора для разных вариантов mSAASoti. (Г) Связь между расчетными сдвигами средних значений  $d(C-O)$  и экспериментальными сдвигами  $pK_a$  относительно варианта mSAASoti.

Таким образом, конформационная гибкость боковой цепи F177 может быть основной причиной изменений скорости фотопереключения из выключенного состояния во включенное и может быть дополнительно использована в качестве меры скорости фотопереключения. Известно, что длины связей  $C-O$  в замещенных фенолах коррелируют с их значениями  $pK_a$ . Здесь мы используем этот подход для более сложных систем: один и тот же хромофор в несколько разных белковых средах из-за точечных мутаций. Мы выполняем КМ/ММ МД модели, содержащие нейтральные красные хромофоры, и анализируем распределения  $d(C-O)$  (рис. 16В). Хотя хромофоры во флуоресцентных белках обладают большим количеством межатомных взаимодействий, удлинение расстояния  $C-O$ , являющееся расчетным параметром, воспроизводит экспериментально наблюдаемое

увеличение значения рКа (рис. 16 Г). Этот результат имеет большое значение, поскольку демонстрирует, что, хотя мы не можем различить влияние каждого аминокислотного остатка и его замены, мы можем оценить значения d (C–O) вдоль траекторий МД и использовать его в качестве расчетного параметра для предсказать значение рКа.

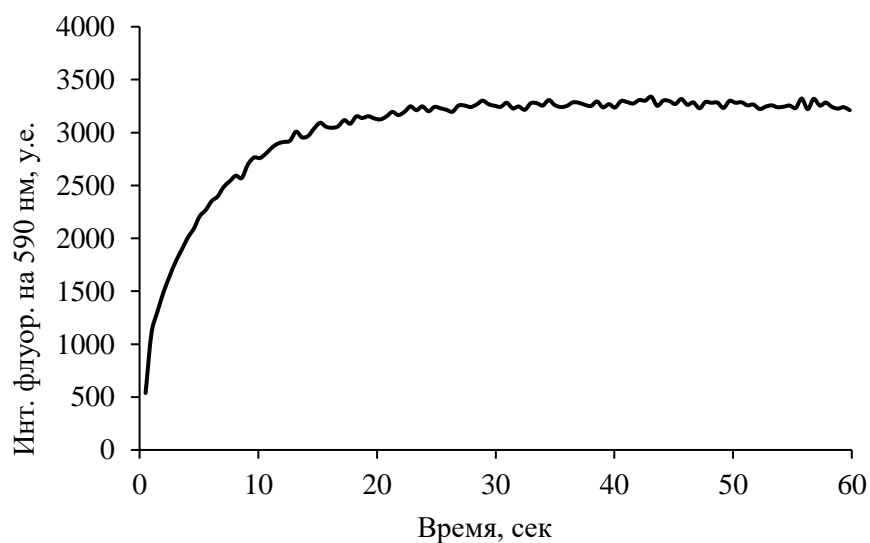
### 3.3 Получение варианта toxSAASoti с яркой и стабильной красной формой

При исследовании влияния отдельных замен на свойства фотоконверсии и красной формы у ФКФБ было обнаружено, что при введении замен D28E, L93M и N166G (нумерация по EosFP) был получен вариант mEosEM, характеризующийся увеличением яркости зеленой формы в 1,8 раза, красной – в 2,8 раза. При выравнивании последовательности mEosEM с toxSAASoti отмечено, что в положениях соответствующих 28 и 93 находятся треонин и фенилаланин соответственно. В положении 166 находится глицин, соответствующий аминокислоте в mEosEM. (рис. 17)

toxSAASoti mEosEM mEos4b	1 10 20 30 40 50 60 MALSKQYIPDDMELIFHMDGNVNGHYFTIVATGKAKPYEGKQNLKATVTKGAPLPFSTDI ---MVSAIKPDMRIKLRMEGNVNGHHFVIDGGGTGKPYEGKQTMDLVKEGGPLPFAFDI ---MVSAIKPDMRIKLRMEGNVNGHHFVIDGGGTGKPYEGKQTMDLVKEGGPLPFAFDI
toxSAASoti mEosEM mEos4b	70 80 90 100 110 12 LSTVMHYGNRGI VHYPPGIPDYFKQSFPEGYSWERTFAFEDGGFGTVSADIKLDNTFIH LTTAFHYGNRVFVKYPDNIQDYFKQSFPGYSWERSMTFEDGGICNARNDITMEGDTFY LTTAFHYGNRVFVKYPDNIQDYFKQSFPGYSWERSLTFEDGGICNARNDITMEGDTFY
toxSAASoti mEosEM mEos4b	0 130 140 150 160 170 18 TSMFHGTNFPADGPVMQRKTIQWEKSIEKMTVSDGIVKGDITMFLLEGGGKYRAQFHTS KVRFYGTNFPANGPVMQKTKLWEPSTEKMYVRDGVLTGDIEMALLLEGGAHYRCDFRTT KVRFYGTNFPANGPVMQKTKLWEPSTEKMYVRDGVLTGDIEMALLLEGGAHYRCDFRTT
toxSAASoti mEosEM mEos4b	0 190 200 210 220 YKAKK-VVEMPQSHYVEHSIERTNDDGT--QFELNEHAVARLNEI YKAKEKGVKLPGAHFVDHAIEILSHDKDYNKVKLYEHAVAHSGLPDNARR YKAKEKGVKLPGAHFVDHAIEILSHDKDYNKVKLYEHAVAHSGLPDNARR

Рисунок 17. Выравнивание аминокислотных последовательностей ФБ toxSAASoti, mEos4b, mEosEM. Серым выделены положения, в которые вводили замены в mEos4b для получения mEosEM.

В белке toxSAASoti были введены соответствующие замены T23E и F97M. При анализе флуоресценции колоний была обнаружена яркая флуоресценция для варианта с заменой F97M, а также заметное отличие кинетики фотоконверсии (рис. 18). Для варианта с заменой T32E отличий заметно не было.



*Рисунок 18. Кинетика фотоконверсии, зарегистрированная на колониях, экспрессирующих toxSAASoti F97M при облучении их светом 400 нм для фотоконверсии и 560 нм для возбуждения флуоресценции красной формы.*

При анализе кинетики фотоконверсии на очищенных препаратах белков также видно, что более интенсивная и стабильная флуоресценция красной формы образуется для варианта с заменой F97M. (Рис. 19)



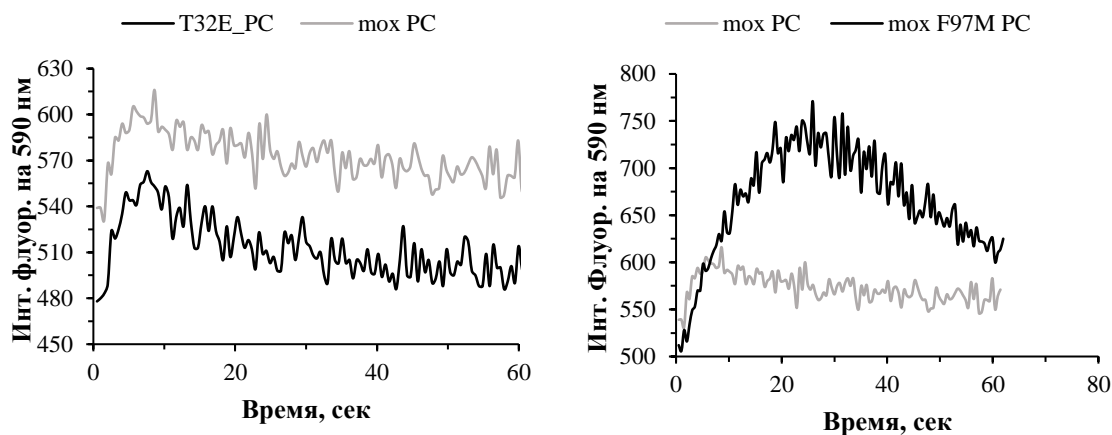


Рисунок 19. Кинетика фотоконверсии *moxSAASoti* и его вариантов с заменами T32E и F97M. Регистрация велась на длине волны 590 нм. Облучение проводилось одновременно светом 400 нм для фотоконверсии и 560 нм для возбуждения флуоресценции красной формы. Буфер 250 мМ Tris-HCl, pH 7,4

Для варианта F97M *moxSAASoti* характерна более низкая скорость фотовыключения во всех циклах фотопереключения и повышенная остаточная интенсивность зелёной флуоресценции. Для варианта T32E скорость фотовыключения значительно не изменилась, остаточная флуоресценция ниже (Рис. 20).

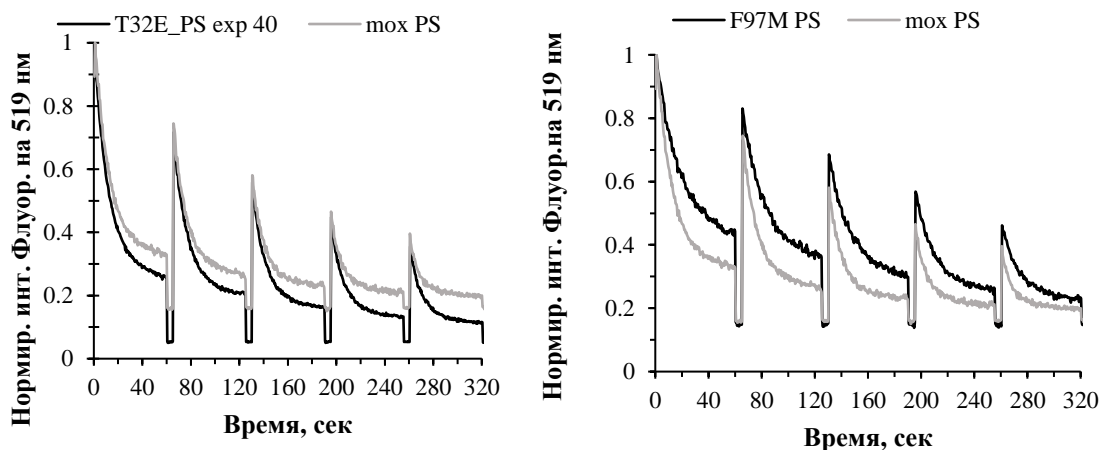


Рисунок 20. Нормированная кинетика фотопереключения *moxSAASoti* и его вариантов с заменами T32E и F97M. Регистрация велась на длине волны 520 нм. Облучение проводилось одновременно светом 470 нм для фотушения и для возбуждения флуоресценции зелёной формы. Между циклами проводилось облучение светом 400 нм на 10% мощности для релаксации флуоресценции. Буфер 250 мМ Tris-HCl, pH 7,4

Дальнейшая характеристика проводилась для варианта F97M moxSAASoti как для более перспективного варианта. Были охарактеризованы его спектральные свойства. Для F97M moxSAASoti характерны как возрастание коэффициента экстинкции и квантового выхода зелёной формы, так и возрастание коэффициента экстинкции почти в два раза и квантового выхода в 4 раза для красной формы (Таблица 16).

Таблица 16. Физико-химические и спектральные характеристики вариантов moxSAASoti

	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	pK <sub>a</sub>	$\epsilon, M^{-1} cm^{-1}$	$\phi$	Яркость ( $\phi*\epsilon$ )
moxSAASoti (зел.)	509/519	6.1±0.1	71800	0.50±0.02	35900
moxSAASoti (красн.)	577/589	6.3±0.1	11300	0,10 ± 0,03	1130
<b>moxSAASoti F97M (зел.)</b>	<b>509/519</b>	<b>6,1±0,1</b>	<b>95360</b>	<b>0,61±0,02</b>	<b>58170</b>
<b>moxSAASoti F97M (красн.)</b>	<b>578/590</b>	<b>6,5±0,1</b>	<b>20000</b>	<b>0,40±0,01</b>	<b>8000</b>

Также показано, что новая форма имеет высокую фотостабильность красной формы. При облучении возбуждающим светом интенсивность флуоресценции не снижается в течение 5 минут (Рис. 21).

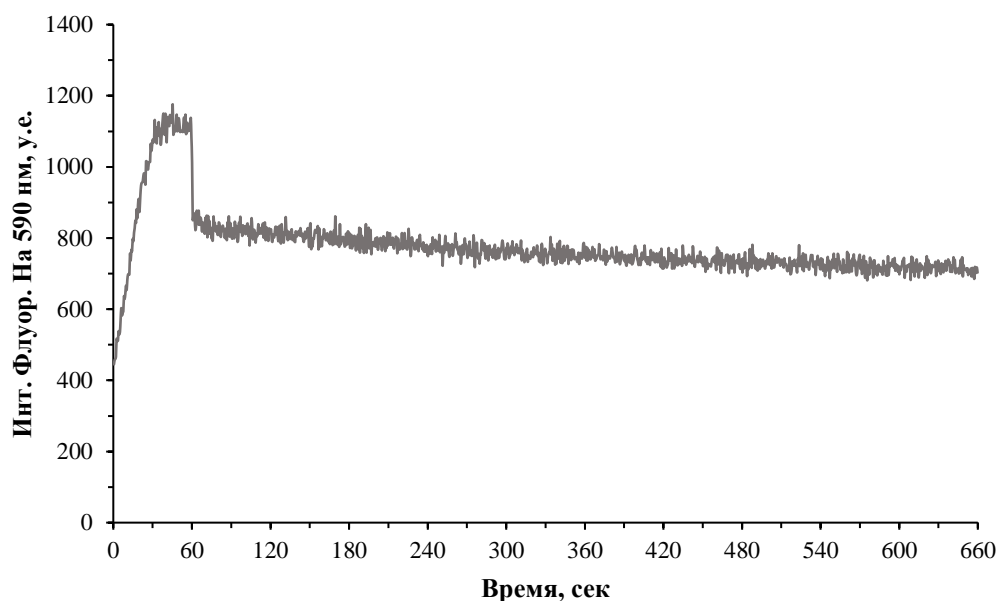


Рисунок 21. Кинетика фотостабильности F97M SAASoti. От 0 до 60 секунд показана фотоконверсия при облучении одновременно светом 400 и 560 нм, затем свет 400 нм выключали и облучали только светом 560 нм в течение 600 секунд.

Был проведен сайт-насыщающий мутагенез по 97 положению. В результате анализа колоний были отобраны клоны– 16, 19 - с отличающейся кинетикой фотоконверсии – наблюдалась стабильная и яркая красная форма (Рис. 22).

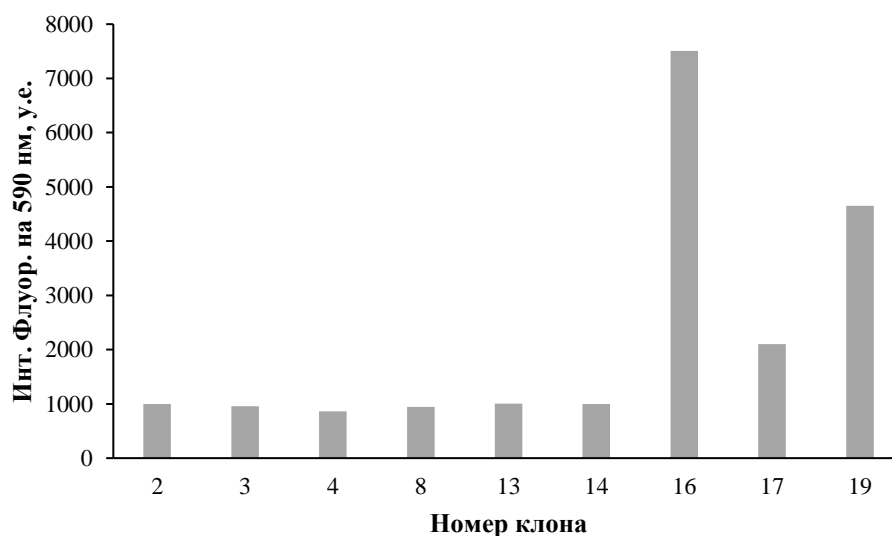
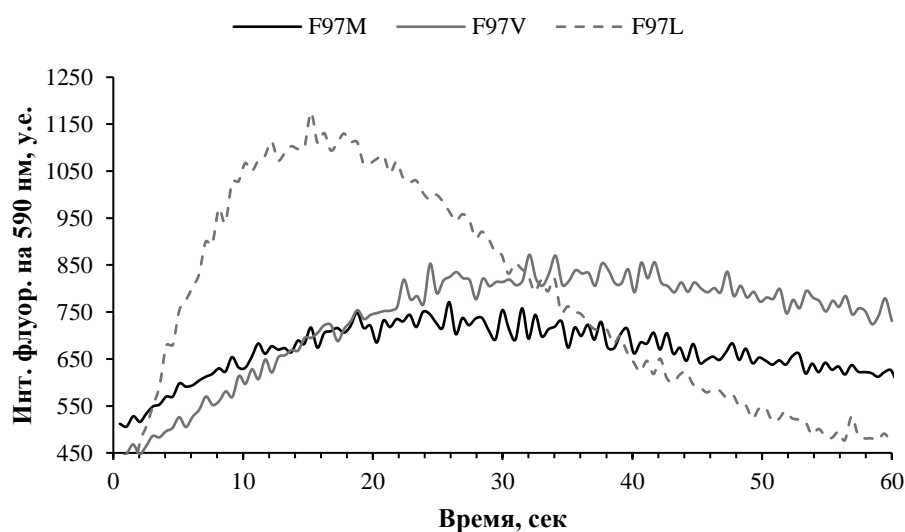


Рисунок 22. Интенсивность флуоресценции красной формы белка, полученная на колониях через 60 секунд обучения их одновременно светом 400 и 560 нм.

Секвенированием показано, что варианты содержат замены F97V и F97L, соответственно. Варианты moxSAASoti F97L и F97V были выделены и охарактеризованы. Для варианта F97L характерна одна из самых быстрых скоростей образования красной формы (быстрее только для исходного moxSAASoti), а также визуально более высокая интенсивность флуоресценции красной формы, а для варианта F97V наименьшая скорость фотодеструкции (Рис. 23).



*Рисунок 23. Кинетика фотоконверсии вариантов moxSAASoti с заменами F97M, F97L и F97V. Регистрация велась на длине волны 590 нм. Облучение проводилось одновременно светом 400 нм для фотоконверсии и 560 нм для возбуждения флуоресценции красной формы. Буфер 250 мМ Tris-HCl, рН 7,4*

Также были охарактеризованы параметры фотопереключения новых вариантов. Константы скоростей фотопереключения новых вариантов близки к moxSAASoti F97M, однако глубина фототушения варианта F97V значительно ниже. Также для всех вариантов moxSAASoti сохраняется моноэкспоненциальность во втором цикле тушения (Рис. 24).

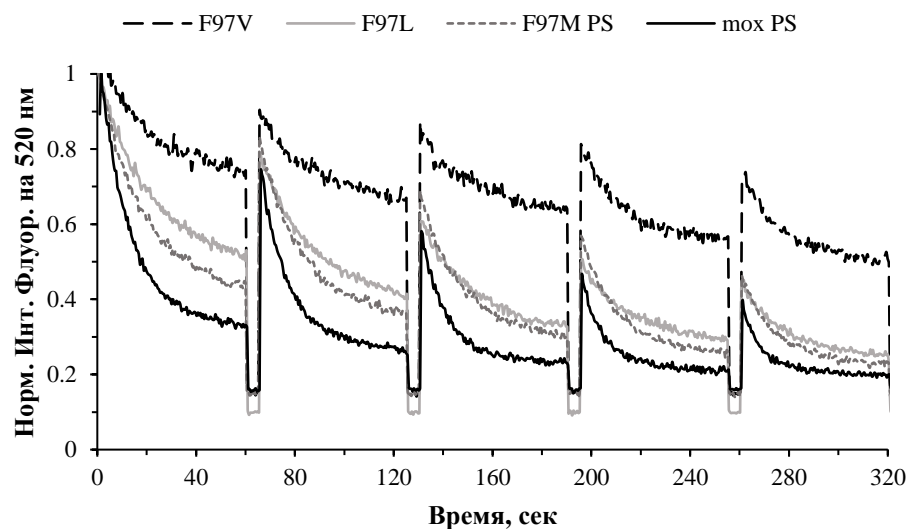


Рисунок 24. Кинетика фотопереключения вариантов MoxSAASoti и его вариантов с заменами F97M, F97L и F97V. Регистрация велась на длине волны 520 нм. Облучение проводилось одновременно светом 470 нм для фотовыключения и для возбуждения флуоресценции зелёной формы. Между циклами проводилось облучение светом 400 нм на 10% максимальной мощности для релаксации флуоресценции. Буфер 250 мМ Tris-HCl, pH 7,4

Очевидно, что а.о. в положении 97 оказывает значительное влияние не только на параметры фотоконверсии, но и на параметры фотопереключения moxSAASoti. Путем варьирования аминокислотного остатка в этом положении возможен подбор оптимальных свойств белка для соответствующих приложений.

### 3.4 Улучшение созревания moxSAASoti при 37°C

В литературных данных мало изучено влияние определенных а.о. на улучшение созревания флуоресцентных белков при 37 °С, чаще всего это свойство возникало случайно в процессе случайного мутагенеза. Однако, в работе [44] при введении трех замен: N15K, E74K, H78N, улучшилось созревание mEos2 при 37 °С.

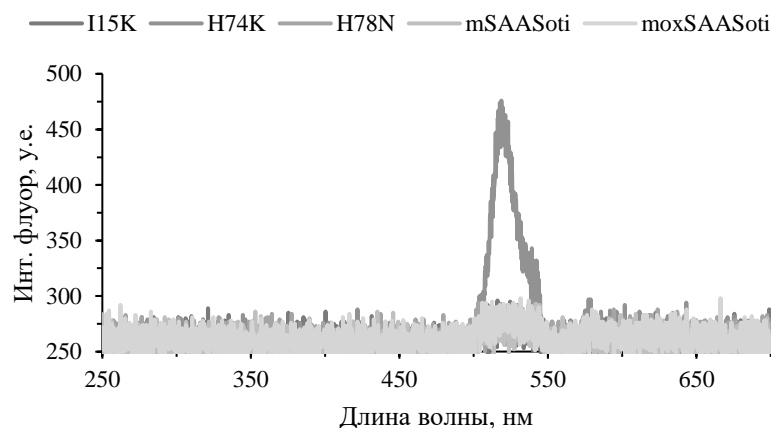
Также при анализе выравнивания последовательностей SAASoti и других фотоконвертируемых и бифотохромных белков стало заметно, что у большинства в положениях 15 и 74 находятся лизины (Рис. 25).

	1	10	20	30	40	50
SAASoti	-----	MALSKQYIPDDMELI	FHMDGCVNGHYFTIVATGKAKPYEGKQNLKATVTKGAPLP			
mSAASoti	-----	MALSKQYIPDDMELI	FHMDGCVNGHYFTIVATGKAKPYEGKQNLKATVTKGAPLP			
Dendra2	----	MNTPGINLIKEDMRVK	VHMEGTVNGHAFVIEGEGKPKPYEGTQTANLTVKEGAPLP			
NijiFP	----	MNTPGINLIKEDMRVK	VHMEGTVNGHAFVIEGEGKPKPYEGTQTANLTVKEGAPLP			
Kaede	-----	MSLIKPEMKIK	LLMEGTVNGHQFVIEGDGKGHPFEGKQSMDLVVKEGAPLP			
moxEos3.2	-----	MVSAIKPDMKIK	LRMEGTVNGHHFVIDGDGTGKPFEGKQSMDLVKEGGPLP			
mMaple		MVSKGEETIMSVIKPDMKIK	LRMEGTVNGHAFVIEGEGSGKPFEGIQITIDLEVKEGAPLP			
mKikGR	-----	MSVITSEMKIE	LRMEGTVNGHKFVITGKGSGRPYEGTQTVDLTVIEGGPLP			
Dronpa	-----	MSVIKPDMKIK	LRMEGAVNGHPFAIEGVGLGKPFEGKQSMDLKVKKEGGPLP			
pcDronpa	-----	MSVIKPDMKIK	LRMEGAVNGHPFAIEGVGLGKPFEGKQSMDLKVKKEGGPLP			
	60	70	80	90	100	110
SAASoti	FSTDILSTVMHYGNRCIV	HYPPI	IPDYFKQSFPEGYSWERTFAFEDGGFCTVSADIKLKD			
mSAASoti	FSTDILSTVMHYGNRCIV	HYPPI	IPDYFKQSFPEGYSWERTFAFEDGGFCTVSADIKLKD			
Dendra2	FSYDILTTAVHYGNRVFT	KYPED	IPDYFKQSFPEGYSWERTMTFEDKGICTIRSDISLEG			
NijiFP	FSYDILTTAVHYGNRVFT	KYPED	IPDYFKQSFPEGYSWERTMTFEDKGICTIRSDISLEG			
Kaede	FAYDILTTAFHYGNRVFAK	YPDHI	IPDYFKQSFPKGFSWERSLMFEDGGVC IATNDITLKG			
moxEos3.2	FAFDILTTAFHYGNRVFAK	YPDNI	QDYFKQSFPKGYSWERSLTFEDGGIANARNDITMEG			
mMaple	FAYDILTTAFHYGNRVFT	KYPED	IPDYFKQSFPEGYSWERSMTEYEDGGIC IATNDITMEE			
mKikGR	FAFDILTTAFHYGNRVFV	EYPEI	IVDYFKQSFPEGYSWERSMSYEDGGICLATNNITMKK			
Dronpa	FAYDILTTVFCYGNRVFAK	YPENI	VDYFKQSFPEGYSWERSMNYEDGGICNATNDITLDG			
pcDronpa	FAYDILTTAFHYGNRVFAK	YPENI	VDYFKQSFPEGYSWERSMSYEDGGIC IATNDITLDG			

Рисунок 25. Выравнивание последовательностей SAASoti и других фототрансформируемых и бифотохромных белков

Были индивидуально введены замены I15K и H74K, G78N в последовательность moxSAASoti.

Для анализа созревания, ДНК новых форм были трансформированы в *E. coli* BL21(DE3) и высеяны на агаризованную среду с индуктором транскрипции ИПТГ. Колонии инкубировались при 37°C в течение ночи, а затем анализировалась интенсивность флуоресценции колоний на 520 нм. Показано, что флуоресценция возросла только для варианта с заменой H74K (Рис. 26).



*Рисунок 26. Спектры флуоресценции колоний вариантов SAASoti. Спектры регистрировались при возбуждении светом 470 нм.*

Анализ влияния новых замен на фотоконверсию и фотопереклечение показал, что новые формы сохранили эти свойства такими же, как у moxSAASoti. Наиболее перспективным вариантом был выбран moxSAASoti Н74К.

Был проведен сайт-насыщающий мутагенез по положению 74. На одной из чашек получено 62 колонии, которые были пересеяны на среду с ИПТГ и инкубировались в течение ночи при 37°C. Измерялась интенсивность флуоресценции на длине волны 520 нм при возбуждении на 470 нм. (Рис. 27)

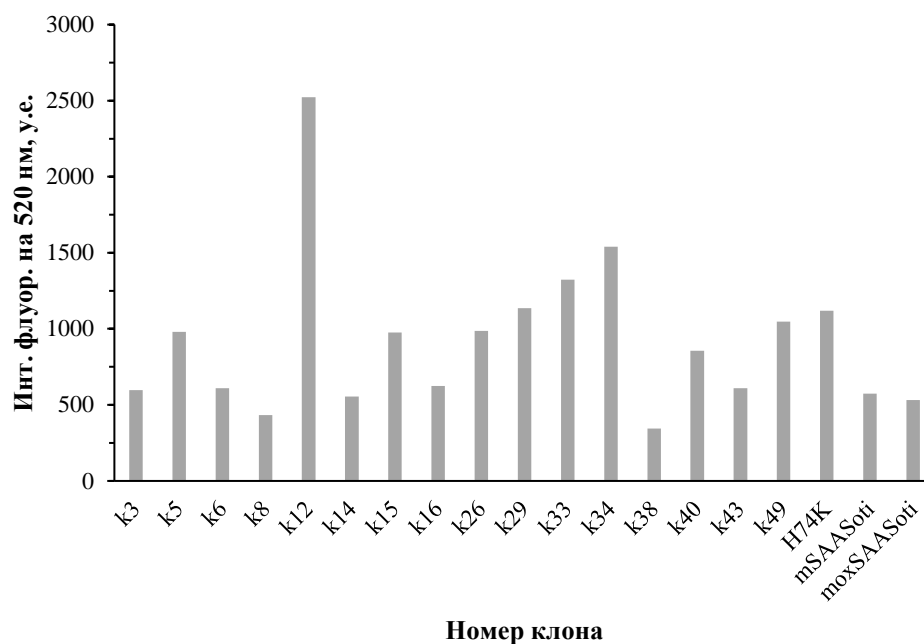


Рисунок 27. Интенсивности флуоресценции на 520 нм колоний, содержащих клоны *toxSAASoti* со случайной заменой в 74 положении.

Наиболее высокая интенсивность флуоресценции характерны для клона 12, более чем в 2 раза превышающая интенсивность для варианта H74K. Секвенирование ДНК показало, что этот клон содержит замену H74A.

Для нового варианта характерны высокие значения интенсивности флуоресценции бактерий по сравнению с *toxSAASoti* (Рис. 28). Возможно, это связано с улучшением фолдинга нового варианта.

Кинетика процессов фотопереключения и фотоконверсии не изменились (Рис. 29).



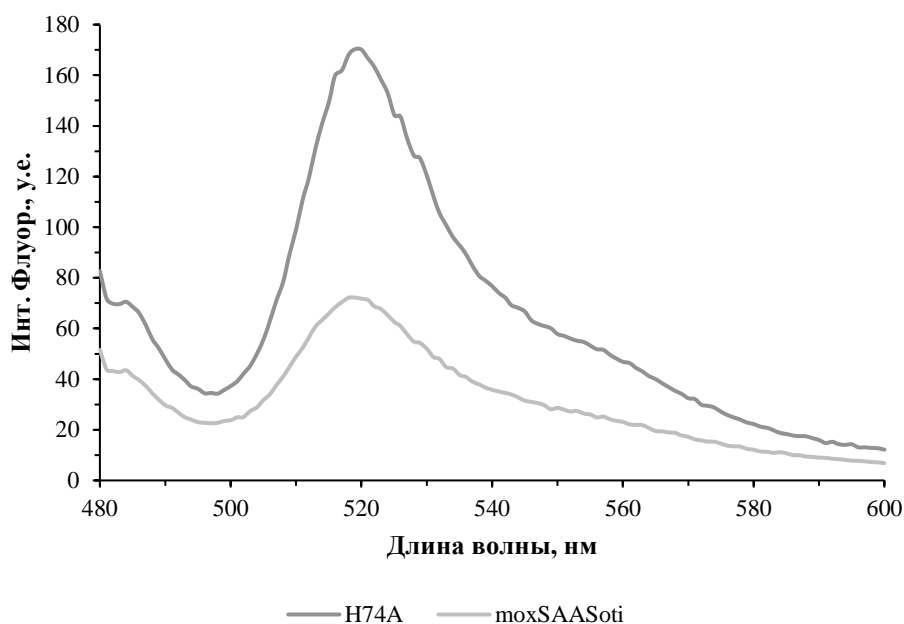


Рисунок 28. Флуоресценция суспензии клеток *E. coli* после 22 ч индукции при 20°C

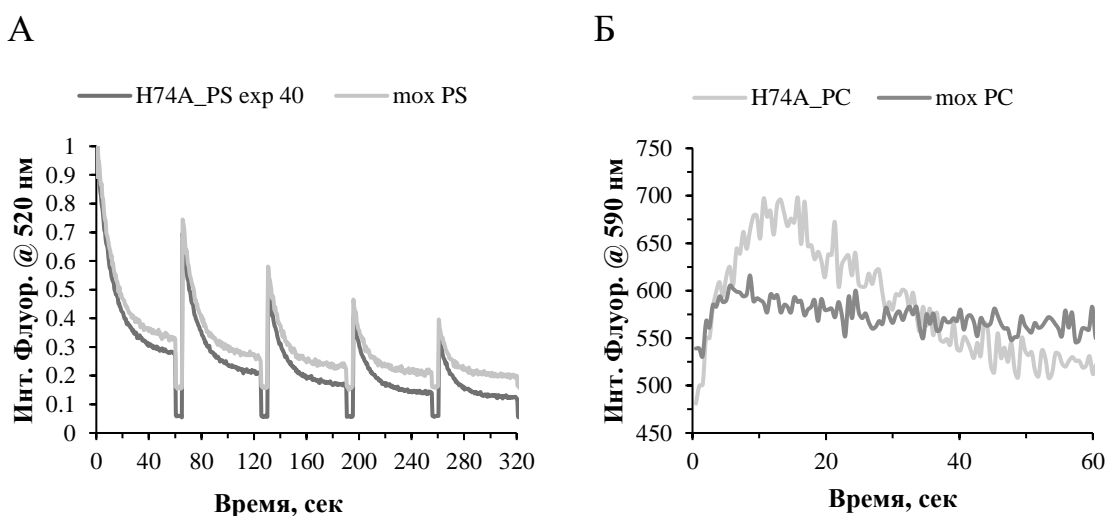


Рисунок 29. Нормированные кинетики фотопереключения (А) и кинетики фотоконверсии (Б) *moxSAASoti* и *moxSAASoti* H74A.

Положение 74 играет важную роль в параметрах созревания *moxSAASoti*, возможно, участвуя в электростатических взаимодействиях при фолдинге.

Также при анализе статьи [44] была обнаружена «счастливая» замена, также приведшая к улучшению созревания белка mEos2 – N121Y (Рис. 30).

Было решено проверить является ли это положение горячей точкой и у moxSAASoti, поскольку у него в этом положении тоже находится а.о. гистидина.

```

.....120.....130.....140.....150.....160.....170..
moxSAASoti .....--NTFIHTSMFHGTFNFPADGPFVMQRKTIQWEKSIEKMTVSDGIVKGDITMFLLEGGGK
Dendra2 .....--DCFFQNVRFKGTNFPNGPFVMQKRTLKWEPESTEKLHVRDGLLVGNINMALLEGGGH
mKikGR .....--DGSNTFVNEIRFDGTNFPANGPFVMQRKTVKWEPESTEKMYVRDGVVLKGDVEMALLEGGGH
Dronpa .....--DCYIYEIRFDGVNFPANGPFVMQRKRTVKWEPESTEKLYVRDGVVLKGDVNMALSLEGGGH
mMaple .....--DSFINKIHFKGTNFPNGPFVMQKRTVGVWEVSTEKMYVRDGVVLKGDVVKMKLLKGGSH
mEos2 .....--DTFYNKVRFYGTNFPANGPFVMQKRTLKWEPESTEKMYVRDGVLTGDIHMALLEGNAN
Kaede .....--DTFFNKVRFDGVNFPNGPFVMQKRTLKWEASTEKMYLRDGVLTGDI TMALLLKGDVH

```

Рисунок 30. Выравнивание аминокислотных последовательностей moxSAASoti и других фотопревращающихся белков.

Клетки *E. coli*, экспрессирующие moxSAASoti H125Y был пересеяны на твердую среду с добавлением индуктора транскрипции IPTG и инкубировались в течение ночи при 37°C. На следующий день были проанализированы интенсивности флуоресценции белка в клетках.

Для варианта moxSAASoti H125Y характерно многократное возрастание флуоресценции клеток по сравнению с предыдущими вариантами (Рис. 31).

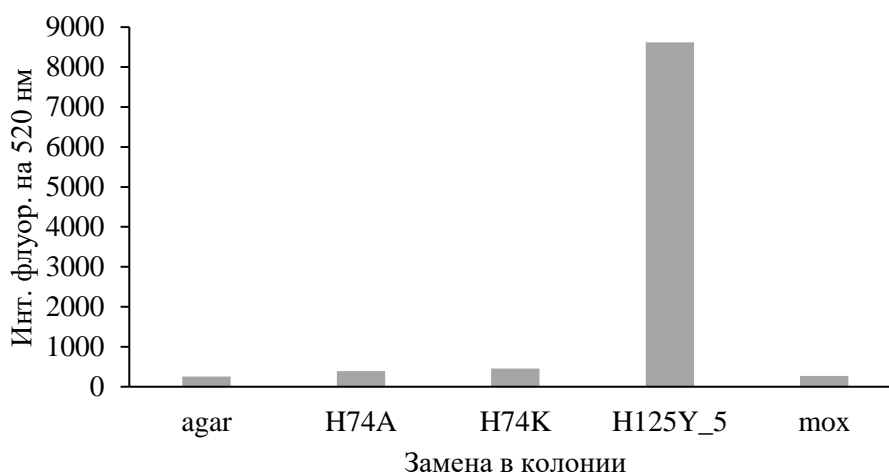


Рисунок 31. Интенсивность флуоресценции колоний, содержащих варианты moxSAASoti.

При расположении всех положений, описанных в разделе 1.7 на модели SAASoti можно выделить некоторые группы вокруг положений, замены в которых повлияли на созревание SAASoti (рис. 32).

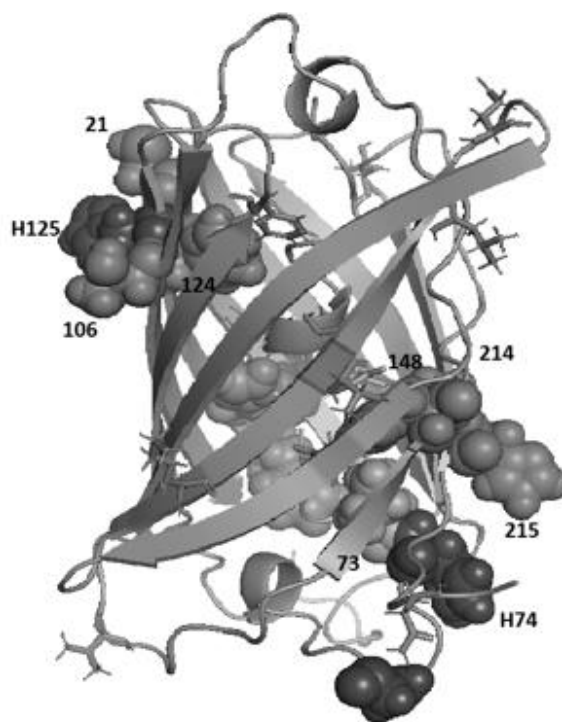


Рисунок 32. Трехмерная модель *toxSAASoti* с обозначением аминокислотных остатков, которые повлияли на созревание в других белках. Сфероидными моделями обозначены остатки, находящиеся в близком контакте. Темно-серым – остатки, замененные в *toxSAASoti*, светло – серым – в других белках.

Так, в тесном контакте с положением 125 находятся также 21 и 124, обнаруженные у PSmOrange и 106, обнаруженное у Dronpa, что может говорить, взаимодействии аминокислотных остатков в некоторых областях в бочонке отвечает за фолдинг и созревание при 37 и каждая из замен изменяет взаимодействие между аминокислотными остатками. Вблизи от 74 положения находится целая группа: 73 от mIrisFP, 148, 214, 215 от PS-CFP и 197 от Dronpa. Можно предположить, что при подборе замены необходимо также анализировать область контактов аминокислотного остатка и сравнивать с контактами в «успешных» белках подобного типа.

### 3.5 Объединение замен путем случайного одновременного мутагенеза

Было решено объединить замены в положениях 97, 74, 125 путем одновременного случайного мутагенеза по этим положениям.

Получено и проанализировано около 500 колоний, флуоресценция была обнаружена у 12 (Рис. 33 А). Колонии облучались светом 470 нм для анализа наличия флуоресценции. Затем облучались одновременно светом 400+560 нм для определения наличия фотоконверсии (Рис. 33 Б).

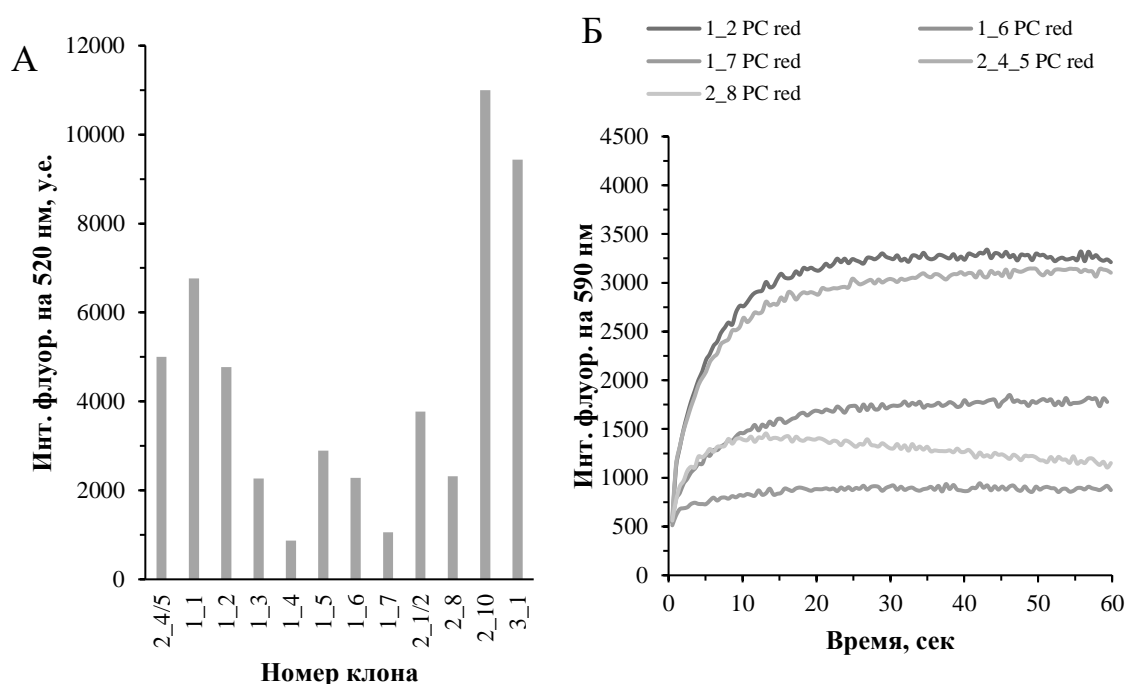
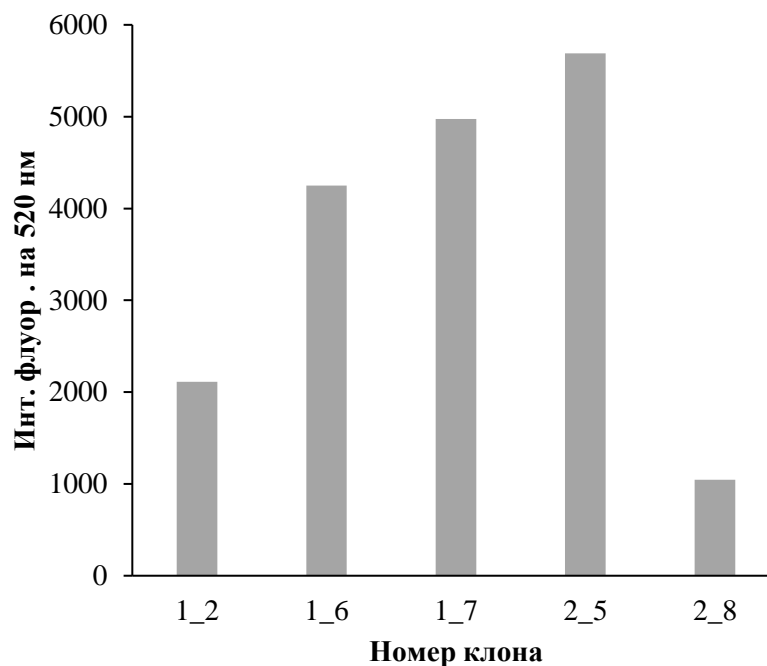


Рисунок 33. А – Интенсивности флуоресценции колоний со случайными заменами в положениях 74, 97 и 125. Б – Кинетика фотоконверсии выбранных колоний.

По кинетикам фотоконверсии отобраны варианты, у которых кривые выходят на плато, а не ниспадают, то есть красная форма наиболее стабильна. Это 5 вариантов: клоны 1\_2, 1\_7, 1\_6, 2\_4, 2\_8.

Все клоны флуоресцировали после инкубации в течение ночи при 37°C, однако клон 2\_8 имел низкую интенсивность флуоресценции, также как и низкую эффективность фотоконверсии, по сравнению с остальными вариантами (Рис. 34). Этот клон было решено исключить из выборки.



*Рисунок 34. Интенсивность флуоресценции колоний со случайными заменами в положениях 74, 97 и 125.*

Результаты секвенирования показали, что все клоны содержат одинаковые замены в положениях 74 – это H74K и 97 – это F97M. В положении 125 замен не обнаружено.

Новая форма была выделена и охарактеризована. Для нее характерны повышенные значения рKa и сниженная молекулярная яркость красной формы по сравнению с F97M moxSAASoti (Табл. 17).

Получена кинетика фотоконверсии при постоянном облучении светом 400+560 нм в течение 60 секунд (Рис. 35). Скорость образования красной формы moxSAASoti F97M/H74K выше, чем у F97M, так же, как и скорость фотодеструкции (Табл. 17). По-видимому, это происходит под влиянием света 400 нм, поскольку фотостабильность при облучении светом 560 нм у новой формы выше (Рис.36).

Таблица 17. Спектральные и физико-химические характеристики вариантов SAASoti

	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	pKa	$\epsilon, M^{-1} cm^{-1}$	$\phi$	Яркость ( $\phi*\epsilon$ )
<i>toxSAASoti (зел.)</i>	509/519	6.1±0.1	71800	0.50±0.02	35900
<i>toxSAASoti(красн.)</i>	577/589	6.3±0.1	11300	0,10±0,03	1130
toxSAASoti F97M (зел.)	509/519	6,1±0,1	95360	0,61±0,02	58170
toxSAASoti F97M (красн.)	578/590	6,5±0,1	20000	0,40±0,06	8000
<b>toxSAASoti F97M/H74K (зел.)</b>	<b>509/519</b>	<b>6,5±0,1</b>	<b>73260</b>	<b>0,60±0,01</b>	<b>43956</b>
<b>toxSAASoti F97M/H74K(красн)</b>	<b>576/589</b>	<b>7,0 ±0,1</b>	<b>17615</b>	<b>0,33±0,07</b>	<b>5812</b>

— tox F97M PC    — tox F97M\_H74K PC

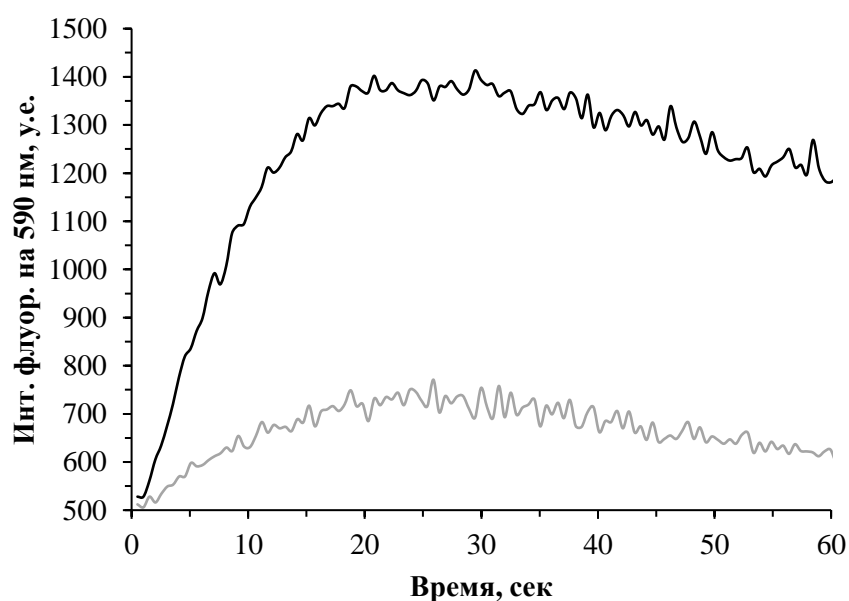


Рисунок 35. Кинетика фотоконверсии вариантов toxSAAsoti F97M и F97M\_H74K.

Таблица 18. Константы скорости фотоконверсии, рассчитанные на основании уравнения 8

	k1	k2
<b>moxSAASoti F97M</b>	0,043	0,035
<b>moxSAASoti F97M_H74K</b>	0,058	0,054

Образцы предварительно облучали светом 400 нм для инициации фотоконверсии и светом 560 нм для возбуждения флуоресценции до достижения максимума флуоресценции на 590 нм. Затем свет 400 нм выключали и продолжали облучение образца светом 560 нм в течение 10 минут.

Несмотря на то, что скорость фотодеструкции новой формы при облучении 400+560 нм выше, при постоянном облучении светом 560 нм снижение интенсивности флуоресценции красной формы в течение 10 минут не наблюдается, в отличие от формы moxSAASoti F97M.

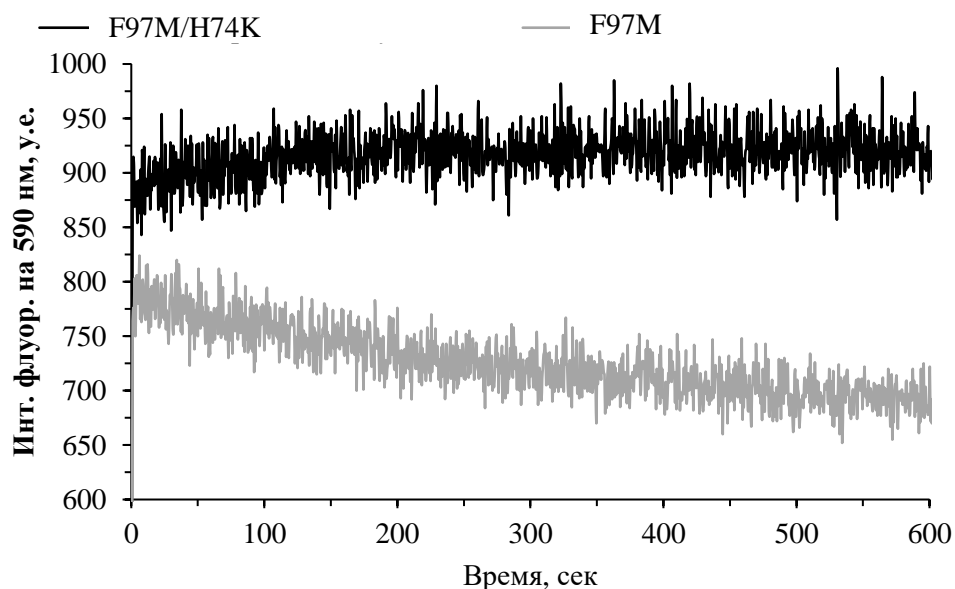


Рисунок 36. Кинетика флоресценции красной формы вариантов moxSAASoti F97M и F97M/H74K, полученная при постоянном облучении светом 560 нм в течение 10 минут.

Кинетики фотопереключения регистрировались при облучении светом 470 нм в течение 60 секунд, восстановление флуоресценции проводилось при облучении светом 400 нм 5 сек. Константы скорости для обеих форм почти равны в пределах погрешностей, однако глубина фототушения *moxSAASoti* F97M\_H74K немного ниже в первых трех циклах фотопереключения (Рис. 37).

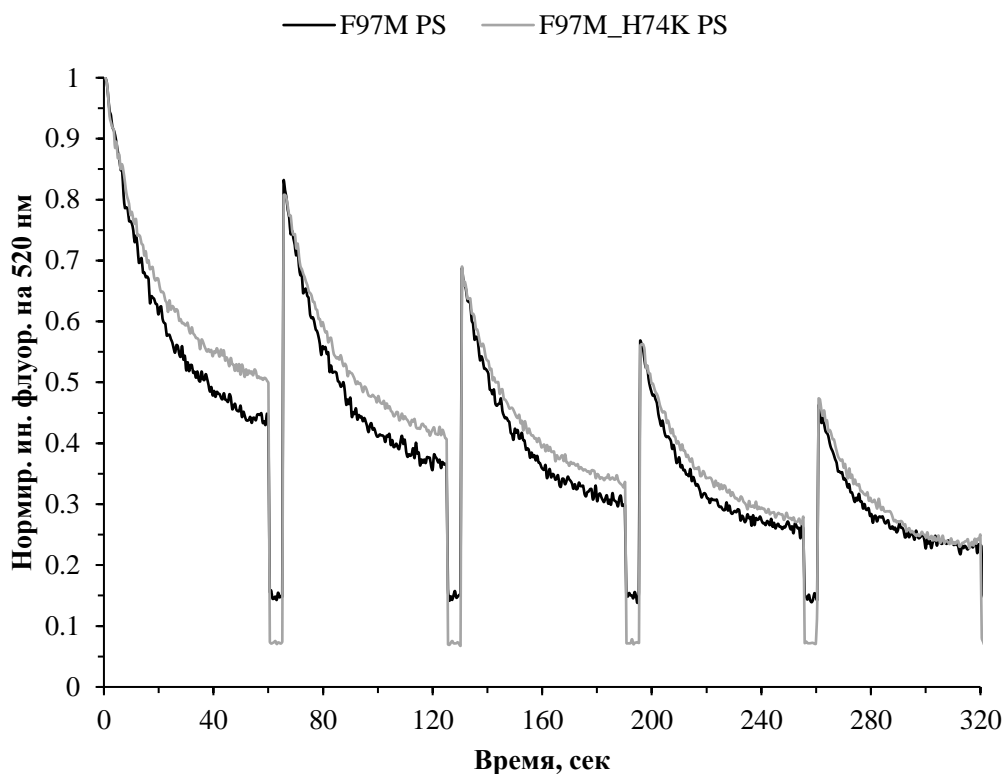


Рисунок 37. Кинетика фотопереключения зелёных форм вариантов *moxSAASoti*.

Далее был сконструирован сенсор *moxSAASoti*<sup>F97M/H74K</sup>-23-Ultramarine и проанализирован *in vitro*.

### 3.6 Анализ сенсора *moxSAASoti*<sup>F97M/H74K</sup>-23-Ultramarine *in vitro*

Получена конструкция, кодирующая сенсор *moxSAASoti*<sup>F97M/H74K</sup>-23-Ultramarine в векторе pET22b для экспрессии в клетках *E. coli*. Однако сенсор созрел значительно медленнее индивидуальных белков. Были подобраны условия для оптимальных экспрессии и созревания сенсора, в качестве вариативных параметров брали время после запуска индукции, температуру и концентрацию ИПТГ, оценивали не только уровень экспрессии (методом



ПААГ электрофореза), но и количество белка слияния с созревшими хромофорами (по интенсивности флуоресценции и спектрам поглощения) (Таблица 19 и Рис. 38).

*Таблица 19. Параметры биосинтеза сенсора в клетках E. coli*

<b>№ дорожки</b>	<b>Время индукции, ч</b>	<b>Температура индукции, °С</b>	<b>Концентрация ИПТГ, мкМ</b>	<b>Созревание</b>
1	0	-	-	-
2	20	4	100	-
3	70	4	200	Созрели оба белка
4	20	20	500	Не созрел Ultramarine
5	48	4	100	-
6	48	4	100	-
7	20	20	100	-

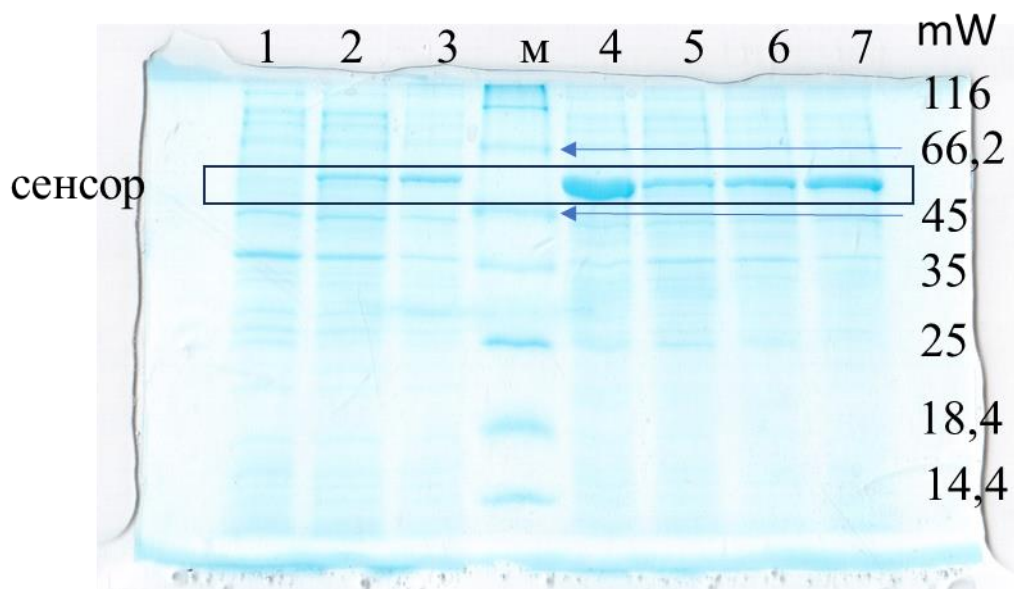


Рисунок 38. ПААГ-электрофорез лизатов *E. coli* до и после индукции экспрессии сенсора *toxSAASoti<sup>F97M/H74K</sup>-23-Ultramarine*

Увеличение количества ИПТГ значительно повышает уровень экспрессии, наиболее высокие уровни экспрессии при 20°C. Однако оптимальным для созревания обоих белков в сенсоре оказалось увеличение времени индукции и снижение температуры до 4°C. Общее количество сенсора относительно других бактериальных белков оказывалось ниже, однако в очищенной фракции наблюдались пики поглощения обоих белков, что говорит об успешном фолдинге и созревании хромофоров (Рис. 39).

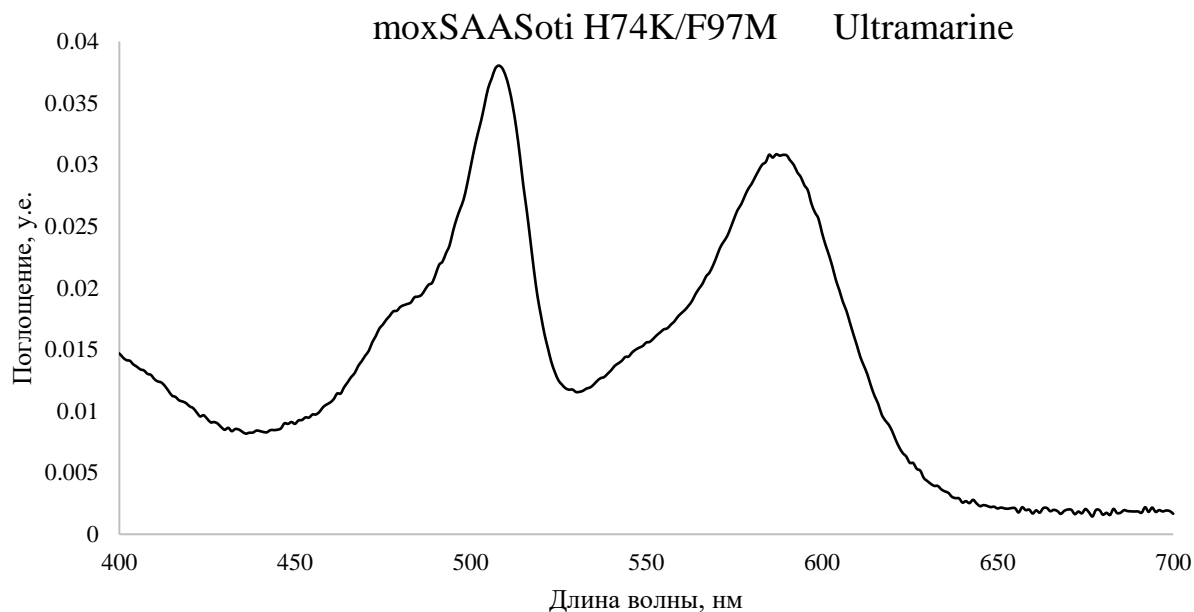


Рисунок 39. Спектр поглощения очищенной фракции белка слияния  $\text{moxSAASoti}^{\text{F97M/H74K}}\text{-23-Ultramarine}$

Полученную фракцию фотоконвертировали (100 % 400 нм, 3 мин) и определили эффективность FRET путем измерения времен жизни флуоресценции свободного  $\text{moxSAASoti}^{\text{F97M/H74K}}$  и в белке слияния (Таблица 20).

Таблица 20. Значения времен жизни и эффективности FRET для  $\text{moxSAASoti}^{\text{F97M/H74K}}$

	Время жизни флуоресценции
$\text{moxSAASoti}^{\text{F97M/H74K}}$ (красная форма)	3,3 нс
$\text{moxSAASoti}^{\text{F97M/H74K}}\text{-23-Ultramarine}$	2,7 нс
Эффективность FRET (%)	18%

Затем был проведен гидролиз сенсора каспазой 3 для оценки эффективности сенсора как субстрата. Через час инкубации при 37°C время

жизни moxSAASoti<sup>F97M/H74K</sup> возросло с 2,7 нс до 3,3 нс, что говорит об эффективном гидролизе.

Свободный белок и сенсор были экспрессированы в клетках HeLa для дальнейшего анализа.

### 3.7 Кристаллизация moxSAASoti F97M *in cellulo*

При экспрессии moxSAASoti<sup>F97M</sup> в клетках HeLa обнаружено необычное поведение белка: он образует структуры, напоминающие игольчатые кристаллы с ярко-зеленой флуоресценцией (Рис. 40А). Чтобы доказать кристаллическую природу этих игл, была проанализирована анизотропия флуоресценции одной "иглы" непосредственно в клетке (Рис. 40Б). В этом эксперименте измерения проводились через 48 часов после трансфекции, к этому моменту уже сформировались длинные и яркие иглы. Выбиралась одна клетка, и флуоресценция всей клетки измерялась в Т-режиме многократно, с каждой итерацией клетку поворачивали против часовой стрелки. (Рис. 40В). Затем один из кристаллов клетки был выбран в качестве области интереса (ROI, region of interest) для расчета статической анизотропии. Значение этого параметра сильно зависит от ориентации белковой "иглы" и плоскости поляризации возбуждающего света (Рис. 40 Г). На основании полученных результатов можно утверждать, что "игла" сильно упорядочена в одном направлении и с большой вероятностью имеет кристаллическую структуру.

Известно много случаев, когда кристаллизация белков происходит не только *in vitro*, но и внутри живых клеток (*in cellulo*) [138]. В некоторых случаях природные кристаллы белка выполняют дискретные биологические функции, например, хранение белка в семенах растений и полиэдриновая оболочка вирионов в клетках насекомых, инфицированных вирусом. В других случаях образование патологических белковых агрегатов или амилоидов при нейродегенеративных заболеваниях имеет сходство с образованием кристаллов. Сообщалось об искусственном кристаллическом образовании гетерологично экспрессируемых белков в клетках насекомых [139,140].

Внутриклеточная кристаллизация белков наблюдалась реже, чем можно было бы ожидать, исходя из огромного разнообразия физико-химических свойств белков, возможно, потому что кристаллизация обычно требует строгих ограничений окружающей среды, многие из которых редко встречаются в живых клетках. Эволюция также может сыграть свою роль: хотя сложные механизмы самосборки биомолекул необходимы для различных клеточных функций, примером которых являются цитоскелет и фотосинтетический аппарат, прогрессивная самосборка посредством каталитической упаковки может вызывать пагубные последствия в клетках-хозяевах, подверженных отрицательному давлению отбора. Таким образом, белки, которые образуют кристаллы внутри клетки, возможно, были подвергнуты негативному отбору под давлением генетической элиминации в течение эволюционного периода времени. Соответственно, наши знания о том, как живые клетки реагируют на кристаллообразующий белок, очень ограничены, и было бы особенно интересно узнать, существует ли активный клеточный механизм обработки, размещения или удаления новых белковых кристаллов. Для флуоресцентных белков также известны случаи кристаллизации белка непосредственно в клетке. В одном случае, довольно крупные ромбовидные кристаллы рекомбинантного белка Хра (кристаллизуемого и фотоактивируемого белка) - мутантной формы фотоконвертируемого mKikGR - были успешно получены в клетках HEK293 [141]. Однако расчетная скорость нуклеации для Хра составила около 0,1% по сравнению с более чем 80% в случае mCherry. При этом рост кристаллов Хра длился несколько минут, в то время как для mCherry небольшие кристаллы появлялись через 24 часа после трансфекции, а еще через 24 часа иглы увеличивались в длину.

Интересно, что кристаллизация флуоресцентных белков *in cellulo* наблюдалась и в нативной форме родительских кораллов *Zoanthus* [142]. Можно предположить, что кристаллизация флуоресцентных белков в тканях кораллов не носит патогенного характера, а используется кораллами для хранения некоторых белков, которые уже не растворимы в цитозоле.

Механизмы кристаллизации флуоресцентных белков *in cellulo* до сих пор остаются неясными.

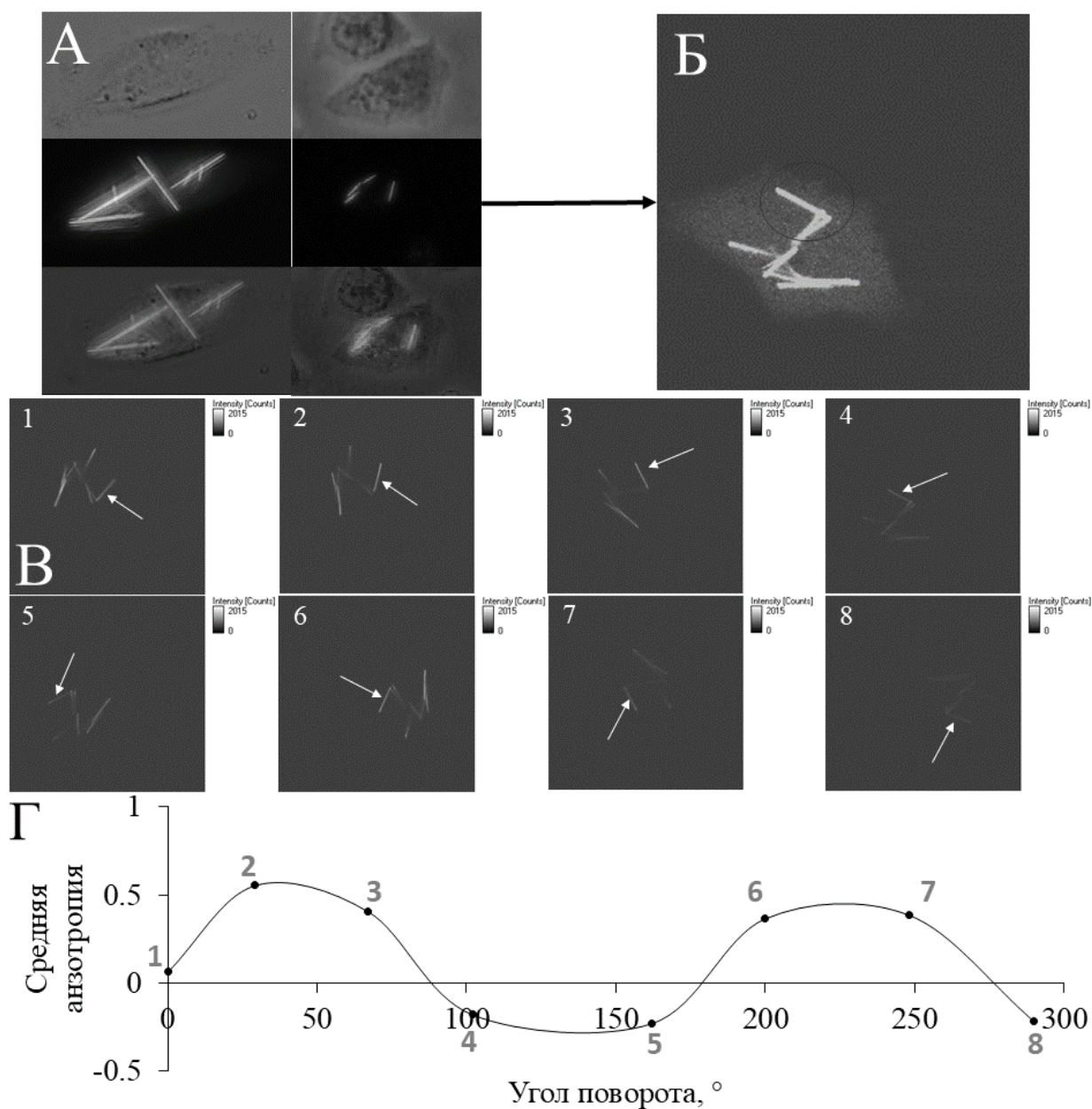
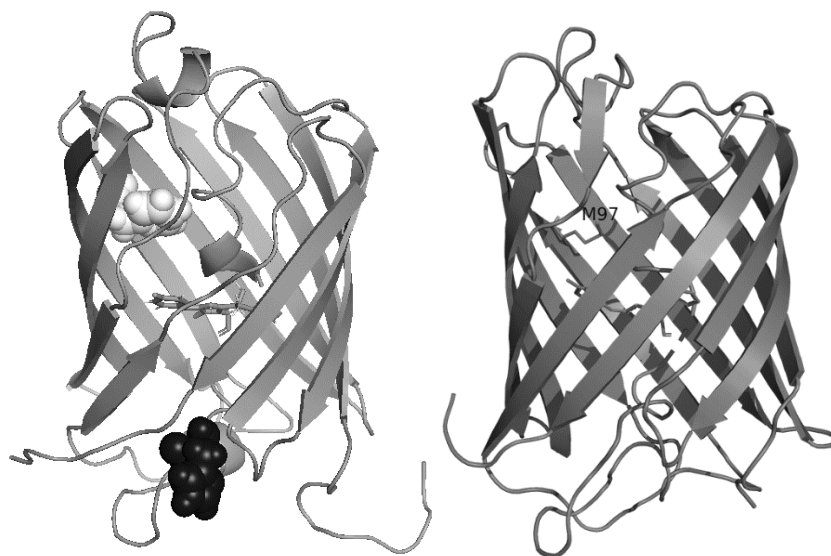


Рисунок 40. А - Контрастные (верхняя линия), флуоресцентные (средняя линия) и слитые (нижняя линия) изображения клеток HeLa, экспрессирующих вариант  $\text{toxSAASoti}^{F97M}$ , через 48 часов после трансфекции. Б - Флуоресцентное изображение клетки HeLa, выбранной для измерения анизотропии. В - Положения внутриклеточного кристалла  $\text{toxSAASoti}^{F97M}$ , для которых были зарегистрированы значения анизотропии. Кристалл, для которого рассчитывалась анизотропия, указан стрелкой. Клетки помещали на стекло чашки Петри, которую вручную вращали против часовой стрелки. Г - Зависимость среднего значения анизотропии от угла поворота кристалла (в качестве точки отсчета использовалась первая позиция).

Учитывая, что moxSAASoti полностью мономерен, что было подтверждено результатами гель-фильтрации и ДСР, на склонность к агрегации повлияла именно замена F97M. А.о. 97 ориентирован внутрь бочонка, из чего можно сделать вывод, что он не напрямую участвует в агрегации, а каким-то образом изменяет динамику бета-цепей бочонка (Рис. 41).



*Рисунок 41. Слева - 3D-модель SAASoti. Белыми сферами обозначен а.о. F97, черными – H74. Справа – реальная структура moxSAASoti<sup>F97M</sup>, M97 также ориентирован внутрь бочонка*

При первичном анализе этой мутантной формы на носителе Superdex 200 объем элюирования белка соответствовал мономеру (Рис. 42А), однако при повторной экспрессии и анализе белка методом гель-фильтрации на двух носителях Superdex 75 и Superdex 200 было обнаружено два объема элюирования, соответствовавших мономеру и крупным агрегатам (Рис. 42Б).

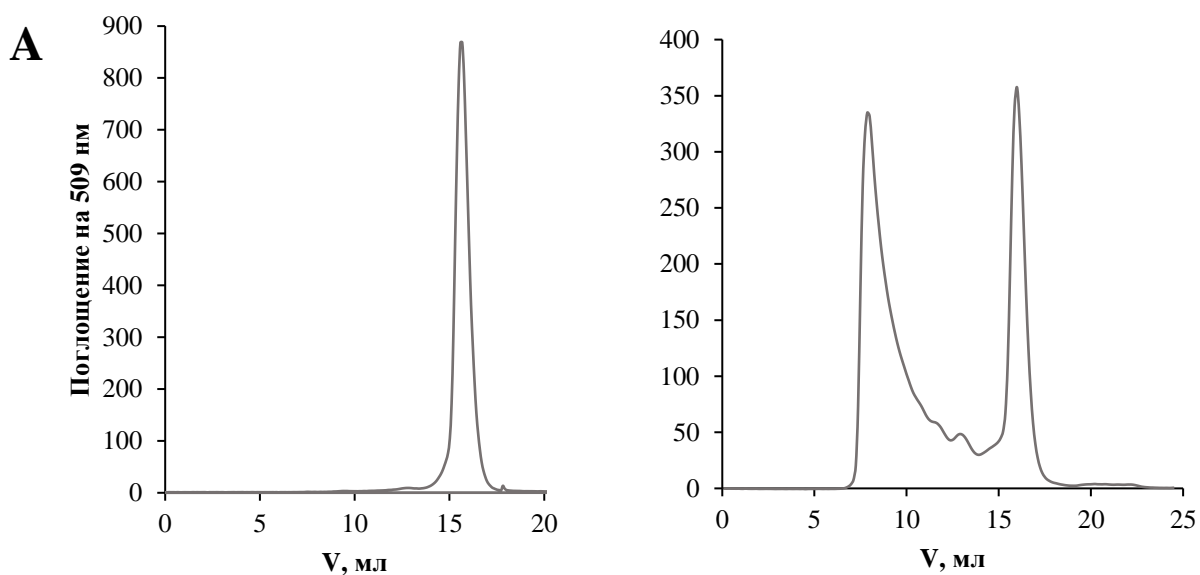


Рисунок 42. Гель фильтрация toxSAASoti<sup>F97M</sup> на носителе Superdex200: А – первичная, Б - повторная

Рассчитанная молекулярная масса агрегатов была порядка 2000 кДа, что может не соответствовать истинному размеру агрегатов, поскольку мы предполагаем, что в растворе также могут образовываться структуры игольчатой формы.

Агрегаты образованы нековалентными связями, но кинетически достаточно стабильны, поскольку при разбавлении раствора белка разрушаются в течение нескольких часов (Рис. 43).



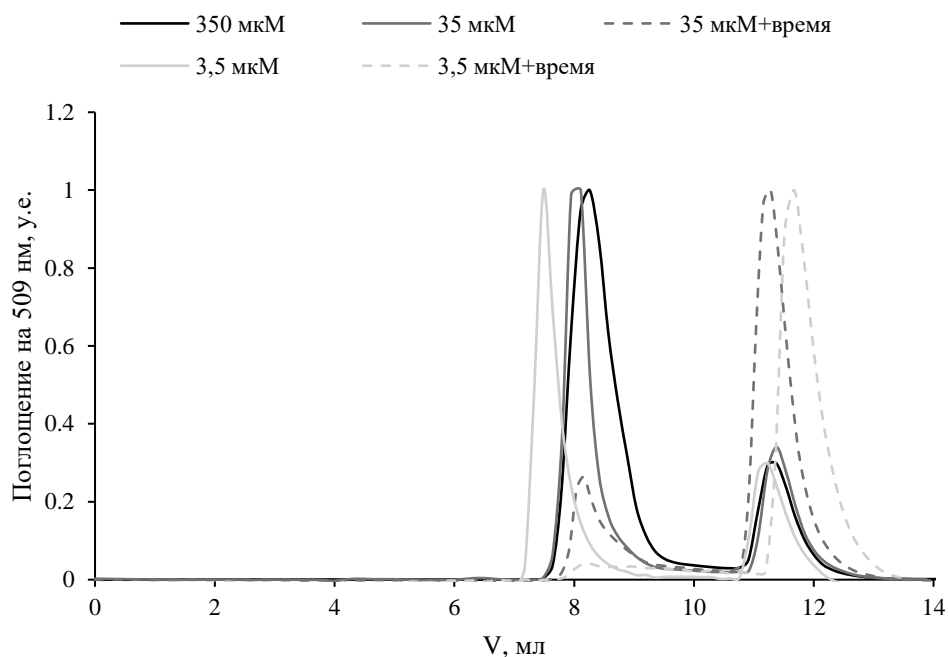
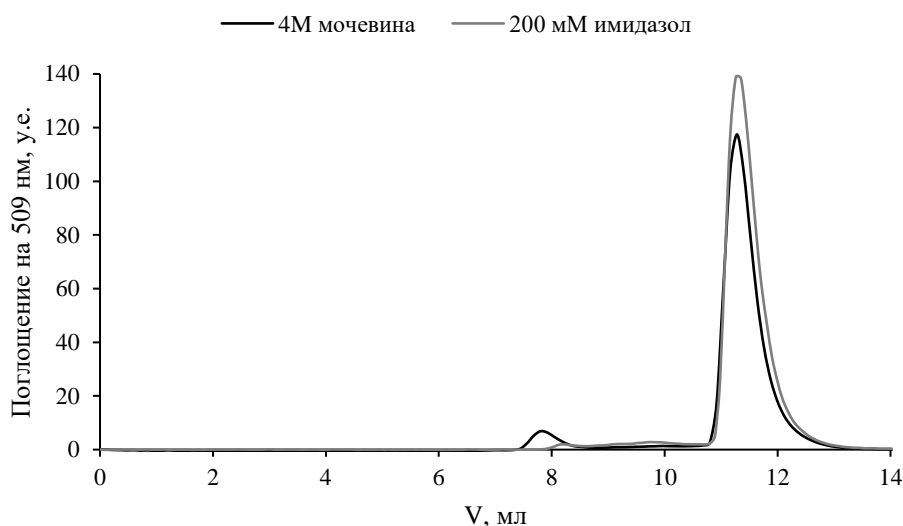


Рисунок 43. Гель фильтрация тохSAASoti F97M на носителе Superdex 75. Концентрированный образец (350 мкМ) разбавлялся в 10 и 100 раз (буфером 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl pH 7,4) и эти образцы анализировали в тот же день (кривые 35 и 3,5 мкМ) и на следующий день (пунктирные кривые 35 мкМ+время и 3,5 мкМ+время).

Также было проанализировано влияние различных агентов на стабильность агрегатов: ионная сила (500 мМ NaCl), 4М мочевины, 3М Gp-HCl и 250 мМ имидазол. Агрегаты полностью разрушались под действием мочевины через 24 часа, а моментально и полностью только под воздействием имидазола (Рис. 44).



*Рисунок 44. Гель-фильтрация тоxSAASoti F97M(35мкМ) в присутствии различных агентов.*

Однако известно, что имидазол может действовать во многих направлениях и разрушать многие типы взаимодействий. Можно сделать обоснованный вывод, что олигомер образован множеством слабых взаимодействий, и что подобные взаимодействия способствуют образованию кристаллов в клетках.

Склонность нового варианта к формированию структурированных агрегатов в клетках позволила предположить, что в растворе белок также сможет сформировать кристаллическую структуру. Таким образом удалось получить кристаллы тоxSAASoti<sup>F97M</sup>, которые характеризовались высокой скоростью роста по сравнению с вариантом mSAASoti<sup>C21N</sup> (несколько дней против примерно двух месяцев). Структура тоxSAASoti<sup>F97M</sup> была получена с разрешением 1,9 Å в орторомбической пространственной группе (3,0Å и гексагональная пространственная группа для mSAASoti<sup>C21N</sup>) и напоминает классический β-бочонок с хромофором 66HYG68, погруженным в центр α-спирали, пронизывающей бочонок (Рис. 45 А). Асимметричная единица тоxSAASoti<sup>F97M</sup> содержала две белковые молекулы, аналогичные таковым в mSAASoti<sup>C21N</sup>. Однако контактный анализ кристаллов выявил серьезные различия (Рис. 45А, Б), отражающие разные пространственные группы.[143].

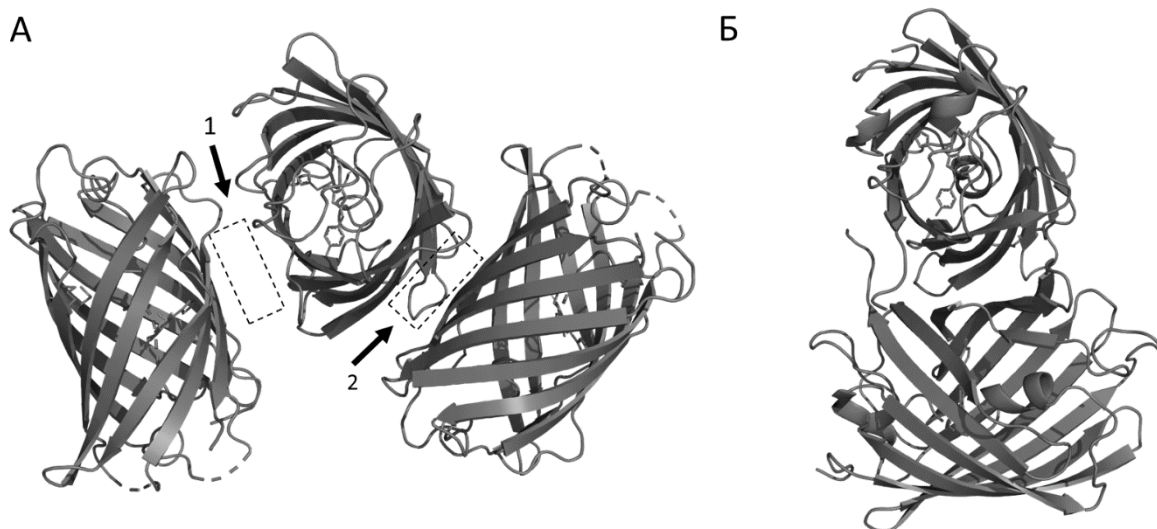


Рисунок 45. Кристаллическая упаковка *toxSAASoti*<sup>F97M</sup> (А) и *mSAASoti*<sup>C21N</sup> (Б). Одна субъединица из асимметричной единицы показана по центру на панели А и сверху на панели Б и на обеих панелях представлена в одинаковой ориентации.

Как и предполагалось, М97 располагается вблизи поверхности белка, а его боковая цепь ориентирована внутрь  $\beta$ -цилиндра, поэтому он вряд ли принимает непосредственное участие в межсубъединичных взаимодействиях, которые могут влиять на упаковку кристаллов. Однако, по сравнению с *mSAASoti*<sup>C21N</sup>, конформации некоторых поверхностных аминокислотных остатков вблизи М97 в *toxSAASoti*<sup>F97M</sup> претерпели изменения (рис. 46), что потенциально может привести к образованию новых (по сравнению со структурой *mSAASoti*<sup>C21N</sup>) кристаллических контактов и усилению кристаллизации в новой пространственной группе. Видно, что остатки Е39, К145, S198 и Н214 образуют сеть водородных связей с Q142, E200 и N212 в интерфейсе 1, что может облегчить упаковку кристалла (Рис. 46, левая панель). Кроме того, было замечено, что боковая цепь F104 имеет четкую ориентацию, что позволяет осуществлять стэкинг-взаимодействие с Н178 в интерфейсе 2 в кристалле (Рис. 46, правая панель).

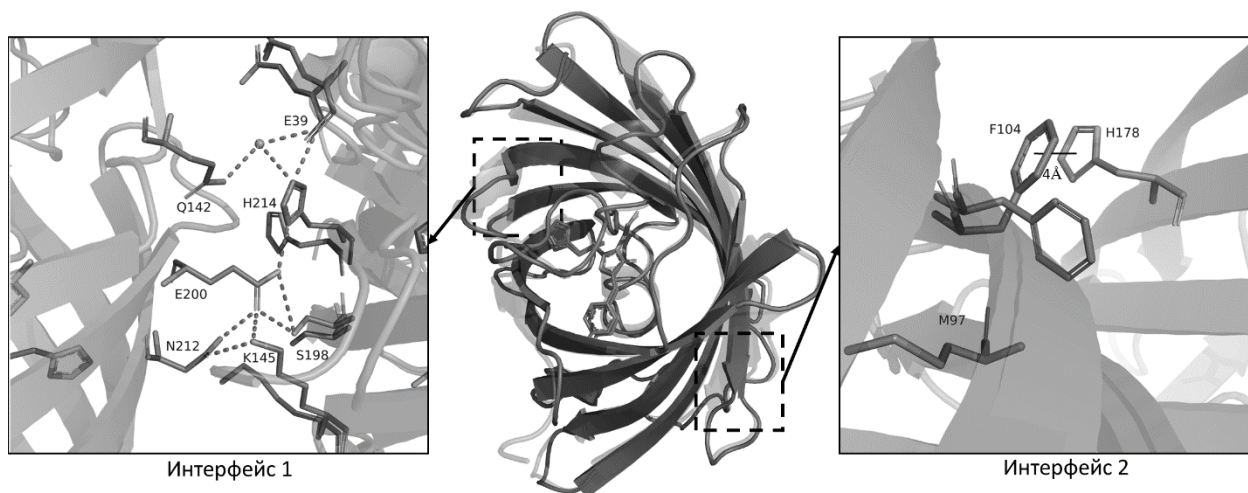


Рисунок 46. Изменения в кристаллической упаковке  $moxSAASoti^{F97M}$  (темный) в области интерфейса 1 (левая сторона) и в области интерфейса 2 (правая сторона) по сравнению с кристаллическим пакетом  $mSAASoti^{C21N}$  (светлый), в котором отсутствуют оба этих интерфейса. Критические изменения в положении H214 в интерфейсе 1 и F104 в интерфейсе 2 показаны в соответствии с схемой  $moxSAASoti^{F97M}$  аналогично рис. 50А,  $mSAASoti^{C21N}$  окрашен в прозрачный синий цвет. Полярные контакты показаны пунктиром. Молекулы воды показаны сферами.

Поскольку ранее уже наблюдались аллостерические эффекты других замен на общие свойства белка SAASoti [80,144], можно предположить, что замена F97M может косвенно влиять на динамику поверхностных остатков, приводя к альтернативной кристаллической упаковке.

## Заключение

Флуоресцентные белки стали мощным инструментом для детекции внутриклеточных процессов в качестве генетически-кодируемых меток. Мутагенез аминокислотных остатков цистеина позволил получить более инертный вариант  $moxSAASoti$ , так же повысив его устойчивость к окислительным условиям. Рациональный и сайт-насыщающий мутагенез по положениям 74 и 97 позволил не только улучшить практические свойства  $moxSAASoti$ , но и получить фундаментальные представления о «горячих точках» у флуоресцентных белков. Получение новой кристаллической структуры  $moxSAASoti^{F97M}$  имеет ценность для дальнейшего рационального мутагенеза белка. Не менее важную роль во FRET-паре является выбор

акцептора, в данной работе необходим был мономерный хромопротеин с высоким интегралом перекрытия с TagRFP и красной формой moxSAASoti: этим требованиям отвечал белок Ultramarine, который и был выбран и использован в двух FRET сенсорах в качестве акцептора. Новые FRET-пары можно использовать для создания сенсоров на различные протеазы.

## Выводы

1. В работе впервые был получен бесцистеиновый вариант moxSAASoti с заменами всех пяти аминокислотных остатков цистеина, характеризующийся возросшей скоростью фотоконверсии
2. В качестве нефлуоресцирующего акцептора флуоресценции для FRET сенсора выбран хромопротеин Ultramarine, поскольку он имеет высокие значения интегралов перекрытия с SAASoti и TagRFP и мономерен. Сенсор TagRFP-23-Ultramarine имеет эффективность FRET 54% и гидролизуетя каспазой 3.
3. Введение замены F97M, привело к возрастанию молекулярная яркость и фотостабильность красной формы moxSAASoti. Замена F97V повысила фотостабильность moxSAASoti при возбуждении светом 400 нм.
4. Замены в 74 положении (лизин или аланин) улучшают созревание moxSAASoti при 37°C.
5. Объединение замен в положениях 97 и 74 привело к получению варианта moxSAASoti<sup>F97M/H74K</sup> с яркой и стабильной красной формой и улучшенным созреванием при 37°C.
6. Замена F97M аллостерически повлияла на взаимодействие бета-цепей в бочонке и образованию новых интерфейсов взаимодействия, что привело к быстрой кристаллизации белка как в растворе, так и в клетках млекопитающих. Новое свойство позволило получить структуру с разрешением 1,9 Å.
7. Показано, что белок слияния moxSAASoti<sup>F97M/H74K</sup>-23-Ultramarine имеет эффективность FRET 18% и гидролизуетя каспазой 3.

## Список опубликованных работ по теме диссертации

### Статьи в рецензируемых научных изданиях:

1. **Marynich N. K.**, Khrenova M. G., Gavshina A. V., Solovyev I. D., Savitsky A. P., First biphotochromic fluorescent protein moxSAASoti stabilized for oxidizing environment // Scientific Reports. – 2022 – Vol. 12(1). – P. 7862. IF 3,8
2. **Марынич Н.К.**, Грановский И.Э., Савицкий А.П. Новые FRET-пары флуоресцентных белков для определения активности каспаз in vitro // Прикладная биохимия и микробиология – 2022. – Т. 58(6). – С. 592-597. IF 1,7
3. **Марынич Н.К.**, Савицкий А.П. Определение «горячих точек» для улучшения созревания флуоресцентного белка moxSAASoti при 37 °С // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. 2024. Т. 65. № 3. С. 255–261. IF 0,78
4. **Marynich N.K.**, Boyko K.M., Matyuta I.O., Minyaev M.E., Khadiyatova A.A., Popov V.O., Savitsky A.P. Single-point substitution F97M leads to in cellulo crystallization of the biphotochromic protein moxSAASoti // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2024. – V. 732 (). – P. 150419. IF 2,5

### Материалы конференций:

1. **Марынич Н.К.**, Создание биосенсора на основе FRET-пары TagRFP-хромобелок: подбор оптимального хромобелка. //Материалы XXVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2020», секция «Химия» – М.: Издательство «Перо» – 2020. – С. 1568
2. **Марынич Н.К.**, Гавшина А.В., Савицкий А.П. moxSAASoti: первый бифотохромный флуоресцентный белок, устойчивый в окислительных условиях, для применения в суперразрешающей микроскопии. // Сборник тезисов XXXIV Международной зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии – М.: ИБХ РАН – 2022. – С. 27

3. **Марынич Н.К.**, Савицкий А.П., Хренова М.Г. Выбор оптимального хромобелка в качестве акцептора во FRET паре. // Научные труды. VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021) – М.:Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 296.
4. Меерович И.Г., **Марынич Н.К.**, Грановский И.Э., Фикслер Д., Савицкий А.П. Получение комплексов на основе золотых наночастиц и FRET-сенсоров каспазы 3 на основе флуоресцентных белков. // Научные труды. VI съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2021) – М.:Издательство «Перо». – 2021. – Т. 2. – С. 292.
5. Хренова М.Г., А.В. Гавшина, И.Д. Соловьев, **Марынич Н.К.**, Савицкий А.П. Влияние динамических свойств фотопереключаемых и фотоконвертируемых белков семейства SAASot1 на фотофизические и фотохимические свойства. // Научные труды. VII съезд биохимиков России, Сочи, Дагомыс (3-8 октября 2022) – М.:Издательство «Перо». – 2022. – Т. 3. – С. 74.
6. Savitsky A.P., Solovyev I.D, Meerovich I.G., Granovsky I.E., **Marynych N.K.**, Tuchina D.K., Konovalov A.B., Vlasov V.V., Tuchin V.V. Multimodal MRI and life-time fluorescence sensors for theranostic applications. // OASIS 8. International Conference & Exhibition on Optics & Electro-Optics, Tel-Aviv, Israel 12-13 December 2022. Digital Abstract Book – 2022. – P. 52
7. **Марынич Н.К.**, Грановский И.Э., Савицкий А.П. Создание FRET-сенсоров флуоресцентный белок-хромопротеин для детекции активности каспазы 3 *in vitro* и *in vivo*. // Тезисы докладов 13-ой Международной научной конференции «Биокатализ. Фундаментальные исследования и применения» (г. Суздаль, 25-29 июня 2023 г.) – М.: Издательство «Адмирал принт». – 2023. – С. 107

## Список использованной литературы

1. Shimomura O., Johnson F., Saiga Y. Extraction, purification and properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequoria // Luminescence of Aequorin. 1962. Vol. 1353, № 165. P. 223–239.
2. Tsien R.Y. The Green Fluorescent Protein // Annual Review Biochemistry. 1998. Vol. 67. P. 509–544.
3. Chalfie M. et al. Green Fluorescent Protein As a Marker For Gene Expression // Sov. Phys. Usp. Digital Instruments, Inc, 1993. Vol. 286. 783 p.
4. Nelson D.E. et al. Oscillations in NF- $\kappa$ B signaling control the dynamics of gene expression // Science (1979). 2004. Vol. 306, № 5696. P. 704–708.
5. Ando R. et al. Highlighted generation of fluorescence signals using simultaneous two-color irradiation on Dronpa mutants // Biophys J. Elsevier, 2007. Vol. 92, № 12. P. L97–L99.
6. Stepanenko O. v. et al. Modern fluorescent proteins: From chromophore formation to novel intracellular applications // Biotechniques. 2011. Vol. 51, № 5. P. 313–327.
7. Macdonald P.J., Chen Y., Mueller J.D. Chromophore maturation and fluorescence fluctuation spectroscopy // Anal Biochem. 2013. Vol. 421, № 1. P. 291–298.
8. Shcherbakova D.M., Verkhusha V. v. Chromophore chemistry of fluorescent proteins controlled by light // Curr Opin Chem Biol. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 20, № 1. P. 60–68.
9. Barondeau D.P. et al. Understanding GFP chromophore biosynthesis: Controlling backbone cyclization and modifying post-translational chemistry // Biochemistry. 2005. Vol. 44, № 6. P. 1960–1970.



10. Barondeau D.P. et al. Understanding GFP posttranslational chemistry: Structures of designed variants that achieve backbone fragmentation, hydrolysis, and decarboxylation // *J Am Chem Soc.* 2006. Vol. 128, № 14. P. 4685–4693.
11. Muslinkina L. et al. Structural Factors Enabling Successful GFP-Like Proteins with Alanine as the Third Chromophore-Forming Residue // *J Mol Biol. Academic Press*, 2019. Vol. 431, № 7. P. 1397–1408.
12. Heim R. et al. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein (*Aequorea victoria*/blue fluorescent protein/*Escherichia coli*/imidazolidinone) Communicated by // *Biochemistry.* 1994. Vol. 91. 12501–12504 p.
13. Barondeau D.P. et al. The case of the missing ring: Radical cleavage of a carbon-carbon bond and implications for GFP chromophore biosynthesis // *J Am Chem Soc.* 2007. Vol. 129, № 11. P. 3118–3126.
14. Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) // *Gene.* 1996. Vol. 173, № 1. P. 33–38.
15. Heim R., Tsien R.Y. Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer // *Current Biology.* 1996. Vol. 6, № 2. P. 178–182.
16. Shaner N.C. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 12. P. 1567–1572.
17. Hess S.T., Girirajan T.P.K., Mason M.D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy // *Biophys J.* 2006. Vol. 91, № 11. P. 4258–4272.

18. Hofmann M. et al. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. Vol. 102, № 49. P. 17565–17569.
19. Hell S.W., Dyba M., Jakobs S. Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy // *Curr Opin Neurobiol*. 2004. Vol. 14, № 5. P. 599–609.
20. Lukyanov K.A. et al. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog // *Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275, № 34. P. 25879–25882.
21. Chudakov D.M. et al. Kindling fluorescent proteins for precise in vivo photolabeling // *Nat Biotechnol*. 2003. Vol. 21, № 2. P. 191–194.
22. Chudakov D.M. et al. Chromophore environment provides clue to “kindling fluorescent protein” riddle // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, № 9. P. 7215–7219.
23. Patterson G.H. A Photoactivatable GFP for Selective Photolabeling of Proteins and Cells // *Science (1979)*. 2002. Vol. 1873, № 2002. P. 1873–1878.
24. Subach F. V. et al. Bright monomeric photoactivatable red fluorescent protein for two-color super-resolution sptPALM of live cells // *J Am Chem Soc*. 2010. Vol. 132, № 18. P. 6481–6491.
25. Subach F. V. et al. Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy // *Nat Methods*. 2009. Vol. 6, № 2. P. 153–159.
26. Gunewardene M.S. et al. Superresolution imaging of multiple fluorescent proteins with highly overlapping emission spectra in living cells // *Biophys J*. 2011. Vol. 101, № 6. P. 1522–1528.
27. Henderson J.N. et al. Structure and mechanism of the photoactivatable green fluorescent protein // *J Am Chem Soc*. 2009. Vol. 131, № 12. P. 4176–4177.

28. Chudakov D.M. et al. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking // *Nat Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 11. P. 1435–1439.
29. Subach O.M. et al. A photoswitchable orange-to-far-red fluorescent protein, PSmOrange // *Nat Methods.* 2011. Vol. 8, № 9. P. 771–780.
30. Kremers G.J. et al. Photoconversion in orange and red fluorescent proteins // *Nat Methods.* 2009. Vol. 6, № 5. P. 355–358.
31. Ando R. et al. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002. Vol. 99, № 20. P. 12651–12656.
32. Rg Wiedenmann J. et al. EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion // *PNAS Biophysics.* 2004. Vol. 101, № 45. P. 15905–15910.
33. Labas Y.A. et al. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family // *PNAS.* 2002. Vol. 99, № 7. P. 4256–4261.
34. Hoi H. et al. A Monomeric Photoconvertible Fluorescent Protein for Imaging of Dynamic Protein Localization // *J Mol Biol. Elsevier Ltd,* 2010. Vol. 401, № 5. P. 776–791.
35. Tsutsui H. et al. Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter // *EMBO Rep.* 2005. Vol. 6, № 3. P. 233–238.
36. Mizuno H. et al. Photo-induced peptide cleavage in the green-to-red conversion of a fluorescent protein // *Mol Cell.* 2003. Vol. 12, № 4. P. 1051–1058.
37. Gurskaya N.G. et al. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light // *Nat Biotechnol.* 2006. Vol. 24, № 4. P. 461–465.

38. Dempsey W.P. et al. In vivo single-cell labeling by confined primed conversion // *Nat Methods*. 2015. Vol. 12, № 7. P. 645–648.
39. Klementieva N. v. et al. Green-to-red primed conversion of Dendra2 using blue and red lasers // *Chemical Communications*. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 52, № 89. P. 13144–13146.
40. Mohr M.A. et al. Rational Engineering of Photoconvertible Fluorescent Proteins for Dual-Color Fluorescence Nanoscopy Enabled by a Triplet-State Mechanism of Primed Conversion // *Angewandte Chemie - International Edition*. 2017. Vol. 56, № 38. P. 11628–11633.
41. Zhang M. et al. Fast Super-Resolution Imaging Technique and Immediate Early Nanostructure Capturing by a Photoconvertible Fluorescent Protein // *Nano Lett*. American Chemical Society, 2020. Vol. 20, № 4. P. 2197–2208.
42. Fu Z. et al. mEosEM withstands osmium staining and Epon embedding for super-resolution CLEM // *Nat Methods*. Springer US, 2020. Vol. 17, № 1. P. 55–58.
43. Berardozzi R. et al. Arginine 66 Controls Dark-State Formation in Green-to-Red Photoconvertible Fluorescent Proteins // *J Am Chem Soc*. American Chemical Society, 2016. Vol. 138, № 2. P. 558–565.
44. McKinney S.A. et al. A bright and photostable photoconvertible fluorescent protein // *Nat Methods*. 2009. Vol. 6, № 2. P. 131–133.
45. Paez-Segala M.G. et al. Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for CLEM // *Nat Methods*. Nature Publishing Group, 2015. Vol. 12, № 3. P. 215–218.
46. Zhang M. et al. Rational design of true monomeric and bright photoactivatable fluorescent proteins // *Nat Methods*. Nature Publishing Group, 2012. Vol. 9, № 7. P. 727–729.

47. McEvoy A.L. et al. mMaple: A Photoconvertible Fluorescent Protein for Use in Multiple Imaging Modalities // PLoS One. 2012. Vol. 7, № 12.
48. Kaberniuk A.A. et al. moxMaple3: a Photoswitchable Fluorescent Protein for PALM and Protein Highlighting in Oxidizing Cellular Environments // Sci Rep. 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–10.
49. Habuchi S. et al. mKikGR, a monomeric photoswitchable fluorescent protein // PLoS One. 2008. Vol. 3, № 12.
50. Dickson R.M. et al. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein // Nature . 1997. Vol. 388. P. 355–358.
51. Manuscript A., Proximity I. Photoswitchable Fluorescent Proteins: Ten Years of Colorful // Curr Opin Chem Biol. 2011. Vol. 4, № 164. P. 682–690.
52. Ando R., Mizuno H., Miyawaki A. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting // Science (1979). 2004. Vol. 306, № 5700. P. 1370–1373.
53. Higashino A., Mizuno M., Mizutani Y. Chromophore Structure of Photochromic Fluorescent Protein Dronpa: Acid-Base Equilibrium of Two Cis Configurations // Journal of Physical Chemistry B. American Chemical Society, 2016. Vol. 120, № 13. P. 3353–3359.
54. Coquelle N. et al. Chromophore twisting in the excited state of a photoswitchable fluorescent protein captured by time-resolved serial femtosecond crystallography // Nat Chem. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 10, № 1. P. 31–37.
55. Andresen M. et al. Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy // Nat Biotechnol. 2008. Vol. 26, № 9. P. 1035–1040.

56. Brakemann T. et al. A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching // *Nat Biotechnol.* Nature Publishing Group, 2011. Vol. 29, № 10. P. 942–950.
57. Arai Y. et al. Spontaneously Blinking Fluorescent Protein for Simple Single Laser Super-Resolution Live Cell Imaging // *ACS Chem Biol.* 2018. Vol. 13, № 8. P. 1938–1943.
58. Chang H. et al. A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2012. Vol. 109, № 12. P. 4455–4460.
59. Grotjohann T. et al. rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells // *Elife.* 2012. Vol. 2012, № 1. P. 1–14.
60. El Khatib M. et al. Rational design of ultrastable and reversibly photoswitchable fluorescent proteins for super-resolution imaging of the bacterial periplasm // *Sci Rep.* Nature Publishing Group, 2016. Vol. 6, № November 2015. P. 1–12.
61. Shinoda H. et al. Acid-Tolerant Monomeric GFP from *Olindias formosa* // *Cell Chem Biol.* Elsevier Ltd., 2018. Vol. 25, № 3. P. 330-338.e7.
62. Kao Y.T., Zhu X., Min W. Protein-flexibility mediated coupling between photoswitching kinetics and surrounding viscosity of a photochromic fluorescent protein // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012. Vol. 109, № 9. P. 3220–3225.
63. Stiel A.C. et al. 1.8 Å bright-state structure of the reversibly switchable fluorescent protein Dronpa guides the generation of fast switching variants // *Biochemical Journal.* 2007. Vol. 402, № 1. P. 35–42.

64. Adam V. et al. Structural characterization of IrisFP, an optical highlighter undergoing multiple photo-induced transformations // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008. Vol. 105, № 47. P. 18343–18348.
65. Adam V. et al. Rational design of photoconvertible and biphotochromic fluorescent proteins for advanced microscopy applications // *Chem Biol*. 2011. Vol. 18, № 10. P. 1241–1251.
66. Adam V. et al. Data storage based on photochromic and photoconvertible fluorescent proteins // *J Biotechnol*. 2010. Vol. 149, № 4. P. 289–298.
67. Fuchs J. et al. A photoactivatable marker protein for pulse-chase imaging with superresolution // *Nat Methods*. 2010. Vol. 7, № 8. P. 627–630.
68. Moeyaert B. et al. Green-to-red photoconvertible dronpa mutant for multimodal super-resolution fluorescence microscopy // *ACS Nano*. 2014. Vol. 8, № 2. P. 1664–1673.
69. Lapshin G. et al. Fluorescence color diversity of great barrier reef corals // *J Innov Opt Health Sci*. 2015. Vol. 08, № 04. P. 1550028.
70. Solovyev I.D. et al. Monomerization of the photoconvertible fluorescent protein SAASoti by rational mutagenesis of single amino acids // *Sci Rep*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–14.
71. Solovyev I., Gavshina A., Savitsky A. Reversible photobleaching of photoconvertible SAASoti-FP // *J Biomed Photonics Eng*. 2017. Vol. 3, № 4. P. 040303.
72. Solovyev I.D., Gavshina A. V., Savitsky A.P. Novel phototransformable fluorescent protein saasoti with unique photochemical properties // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, № 14. P. 1–9.

73. Madeira F. et al. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022 // *Nucleic Acids Res.* Oxford University Press, 2022. Vol. 50, № W1. P. W276–W279.
74. Jain R.K. et al. Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of endocrine cells // *Biochemical Journal.* 2015. Vol. 360, № 3. P. 645–649.
75. Costantini L.M. et al. A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments. // *Nat Commun.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 6, № May. P. 7670.
76. Costantini L.M. et al. Cysteineless non-glycosylated monomeric blue fluorescent protein, secBFP2, for studies in the eukaryotic secretory pathway // *Biochem Biophys Res Commun.* Elsevier Inc., 2013. Vol. 430, № 3. P. 1114–1119.
77. Aronson D.E., Costantini L.M., Snapp E.L. Superfolder GFP in Oxidative environments // *Traffic.* 2011. Vol. 12, № 5. P. 543–548.
78. Suzuki T. et al. Development of cysteine-free fluorescent proteins for the oxidative environment // *PLoS One.* 2012. Vol. 7, № 5. P. e37551.
79. Kaberniuk A.A. et al. moxDendra2: an inert photoswitchable protein for oxidizing environments // *Chemical Communications.* 2017. Vol. 53, № 13. P. 2106–2109.
80. Gavshina A. V. et al. The role of cysteine residues in the allosteric modulation of the chromophore phototransformations of biphotochromic fluorescent protein SAASoti // *Sci Rep.* Nature Publishing Group UK, 2021. Vol. 11, № 1. P. 1–11.
81. Goryashchenko A.S., Khrenova M.G., Savitsky A.P. Detection of protease activity by fluorescent protein FRET sensors: from computer simulation to live cells // *Methods and Application in Fluorescence.* 2018. Vol. 6, № 2. P. 022001.



82. Savitsky A.P. et al. FLIM-FRET imaging of caspase-3 activity in live cells using pair of red fluorescent proteins // *Theranostics*. 2012. Vol. 2, № 2. P. 215–226.
83. Alieva N.O. et al. Diversity and evolution of coral fluorescent proteins // *PLoS One*. 2008. Vol. 3, № 7.
84. Pettikiriarachchi A. et al. Ultramarine , a Chromoprotein Acceptor for Förster Resonance Energy Transfer // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 7.
85. Murakoshi H. et al. ShadowR: a novel chromoprotein with reduced non-specific binding and improved expression in living cells // *Sci Rep*. Nature Publishing Group, 2019. Vol. 9, № 1.
86. Shelaev I. et al. The origin of radiationless conversion of the excited state in the kindling fluorescent protein (KFP): Femtosecond studies and quantum modeling // *Laser Phys Lett*. 2011. Vol. 8, № 6. P. 469–474.
87. Mironov V.A. et al. Thermal isomerization of the chromoprotein asFP595 and its kindling mutant A143G: QM/MM molecular dynamics simulations // *Journal of Physical Chemistry B*. 2013. Vol. 117, № 43. P. 13507–13514.
88. Grigorenko B. et al. Ground-State Structures and Vertical Excitations for the Kindling Fluorescent Protein asFP595 // *Journal of Physical Biochemistry*. 2006. P. 18635–18640.
89. Schüttrigkeit T.A. et al. Femtosecond study of light-induced fluorescence increase of the dark chromoprotein asFP595 // *Chem Phys*. 2006. Vol. 323, № 2–3. P. 149–160.
90. Yanushevich Y.G. et al. A strategy for the generation of non-aggregating mutants of Anthozoa fluorescent proteins // *FEBS Lett*. 2002. Vol. 511, № 1–3. P. 11–14.

91. Chudakov D.M. et al. Chromophore environment provides clue to “kindling fluorescent protein” riddle // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, № 9. P. 7215–7219.
92. Rusanov A.L. et al. Conformational Partitioning in pH-Induced Fluorescence of the Kindling Fluorescent Protein ( KFP ) // *J Phys Chem B*. 2011. Vol. 115, № 29. P. 9195–9201.
93. Bravaya K.B. et al. Modeling photoabsorption of the asFP595 chromophore // *Journal of Physical Chemistry A*. 2008. Vol. 112, № 37. P. 8804–8810.
94. Andresen M. et al. Structure and mechanism of the reversible photoswitch of a fluorescent protein // *PNAS*. 2005. Vol. 102, № 37. P. 13070–13074.
95. Goryashchenko A.S. et al. Fluorescent properties of the kindling fluorescent protein (KFP) at acidic pH values // *ALT Proceedings*. 2012. Vol. 1.
96. Topol I. et al. Modeling Absorption of the Kindling Fluorescent Protein with the Neutral Form of the Chromophore // *Int J Quantum Chem*. 2012. Vol. 112. P. 2947–2951.
97. Topol I., Collins J., Nemukhin A. Modeling Structures and Spectra of Fluorescent Proteins in the Coordinate-Locking Cluster Approach: Application to the Photoswitchable Protein AsFP595 // *Comput Mol Biosci*. Scientific Research Publishing, Inc, 2012. Vol. 02, № 03. P. 83–91.
98. Schäfer L. v. et al. Chromophore protonation state controls photoswitching of the fluoroprotein asFP595 // *PLoS Comput Biol*. Public Library of Science, 2008. Vol. 4, № 3.
99. Schäfer L. V. et al. Photoswitching of the fluorescent protein asFP595: Mechanism, proton pathways, and absorption spectra // *Angewandte Chemie - International Edition*. 2007. Vol. 46, № 4. P. 530–536.

100. Grigorenko B.L. et al. Unusual Emitting States of the Kindling Fluorescent Protein: Appearance of the Cationic Chromophore in the GFP Family // *J Phys Chem B*. 2013. Vol. 117, № 24.
101. Piston D.W., Kremers G.J. Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly // *Trends in Biochemical Sciences*. 2007. Vol. 32, № 9. P. 407–414.
102. Förster Th. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz // *Ann Phys*. 1948. Vol. 6, № 2. P. 55–75.
103. Rocheleau J. v, Edidin M., Piston D.W. Intrasequence GFP in Class I MHC Molecules, a Rigid Probe for Fluorescence Anisotropy Measurements of the Membrane Environment // *Biophysical Journal*. 2003. Vol. 84. 4078–4086 p.
104. Müller S.M. et al. Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells // *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Research Foundation, 2013. Vol. 4, № OCT.
105. Patterson G.H., Piston D.W., Barisas B.G. Förster distances between green fluorescent protein pairs // *Anal Biochem*. Academic Press Inc., 2000. Vol. 284, № 2. P. 438–440.
106. Zadran S. et al. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: Visualizing cellular dynamics and bioenergetics // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012. Vol. 96, № 4. P. 895–902.
107. Zherdeva V. et al. Long-term fluorescence lifetime imaging of a genetically encoded sensor for caspase-3 activity in mouse tumor xenografts // *J Biomed Opt*. 2018. Vol. 23, № 03. P. 1.
108. Paulsson J.F. et al. Real-time monitoring of apoptosis by caspase-3-like protease induced FRET reduction triggered by amyloid aggregation. // *Exp Diabetes Res*. 2008. Vol. 2008. P. 865850.

109. Yang J. et al. Detection of MMP activity in living cells by a genetically encoded surface-displayed FRET sensor // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2007. Vol. 1773, № 3. P. 400–407.
110. Ouyang M., Lu S., Wang Y. Genetically encoded fluorescent biosensors for live-cell imaging of MT1-MMP protease activity // *Methods in Molecular Biology.* Humana Press Inc., 2014. Vol. 1071. P. 163–174.
111. Zardan S. et al. 7-Estradiol increases neuronal excitability through MAP kinase-induced calpain activation // *PNAS.* 2009. Vol. 106, № 51. P. 21936–21941.
112. Sokolinskaya E.L. et al. Genetically Encoded Fluorescent Sensors for SARS-CoV-2 Papain-like Protease PLpro // *Int J Mol Sci.* MDPI, 2022. Vol. 23, № 14.
113. Faccio G., Salentinig S. Enzyme-Triggered Dissociation of a FRET-Based Protein Biosensor Monitored by Synchrotron SAXS // *Biophys J.* Biophysical Society, 2017. Vol. 113, № 8. P. 1731–1737.
114. Nirmala J.G., Lopus M. Cell death mechanisms in eukaryotes // *Cell Biology and Toxicology.* Springer, 2020. Vol. 36, № 2. P. 145–164.
115. Tang D. et al. The molecular machinery of regulated cell death // *Cell Research.* Nature Publishing Group, 2019. Vol. 29, № 5. P. 347–364.
116. Galluzzi L. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death and Differentiation.* Nature Publishing Group, 2018. Vol. 25, № 3. P. 486–541.
117. D’Arcy M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy // *Cell Biology International.* Wiley-Blackwell Publishing Ltd, 2019. Vol. 43, № 6. P. 582–592.
118. Timmer J.C., Salvesen G.S. Caspase substrates // *Cell Death and Differentiation.* 2007. Vol. 14, № 1. P. 66–72.

119. Julien O., Wells J.A. Caspases and their substrates // Cell Death and Differentiation. Nature Publishing Group, 2017. Vol. 24, № 8. P. 1380–1389.
120. Green D.R. Caspases and Their Substrates // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2022. Vol. 14. P. 041012.
121. Maluchenko N. V., Feofanov A. V., Studitsky V.M. PARP-1-associated pathological processes: Inhibition by natural polyphenols // International Journal of Molecular Sciences. MDPI, 2021. Vol. 22, № 21.
122. Sacchetti A. et al. Green fluorescent protein variants fold differentially in prokaryotic and eukaryotic cells // J Cell Biochem. 2001. Vol. 81. P. 117–128.
123. Hebisch E. et al. High Variation of Fluorescence Protein Maturation Times in Closely Related Escherichia coli Strains // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 10.
124. Chudakov D.M. et al. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking // Nat Biotechnol. 2004. Vol. 22, № 11. P. 1435–1439.
125. Wiedenmann J. et al. From EosFP to mIrisFP: Structure-based development of advanced photoactivatable marker proteins of the GFP-family // Journal of Biophotonics. 2011. Vol. 4, № 6. P. 377–390.
126. Studier F.W., Moffatt B.A. Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to Direct Selective High-level Expression of Cloned Genes // J. MoZ. Biol. 1986. Vol. 189. 113–130 p.
127. Taylor R.G., Walker+ D.C., McInnes R.R. E. coli host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing // Nucleic Acids Research. 1993. Vol. 21, № 7. 1677–1678 p.
128. Scherer W.F., Syverton J.T., Gey G.O. STUDIES ON THE PROPAGATION IN VITRO OF POLIOMYELITIS VIRUSES IV. VIRAL MULTIPLICATION IN A STABLE STRAIN OF HUMAN MALIGNANT EPITHELIAL CELLS

(STRAIN HELA) DERIVED FROM AN EPIDERMAL CARCINOMA OF THE CERVIX // J Exp Med. 1953. Vol. 97. P. 1–21.

129. Higuchi R., Krummell B., Saiki R.K. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions // Nucleic Acid Research. 1988. Vol. 16, № 15. P. 7357–7367.

130. Dower W.J., Miller J.F., Ragsdale C.W. High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation // Nucleic Acids Research. 1988. Vol. 16.

131. Hanahan D., Meselson M. Plasmid screening at high colony density // Methods Enzymol. Academic Press, 1983. Vol. 100, № C. P. 333–342.

132. Shagin D.A. et al. GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily : Evolution of Functional Features and Structural Complexity // Mol Biol Evol. 2004. Vol. 21, № 5.

133. Прилепский А.Ю. et al. МЕТОДЫ РАБОТЫ С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ НАНОМАТЕРИАЛОВ. Санкт-Петербург, 2019. 1–45 p.

134. Merzlyak E.M. et al. Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime // Nat Methods. 2007. Vol. 4, № 7. P. 555–557.

135. Rusanov A.L. et al. Lifetime imaging of FRET between red fluorescent proteins // J Biophotonics. 2010. Vol. 3, № 12. P. 774–783.

136. Marynich N.K. et al. First biphotochromic fluorescent protein moxSAASoti stabilized for oxidizing environment // Sci Rep. 2022. Vol. 12, № 1. P. 7862.

137. Roebroek T. et al. Reduced Fluorescent Protein Switching Fatigue by Binding-Induced Emissive State Stabilization // Sciences Molecular. 2017. Vol. 18, № 9.

138. Schönherr R., Rudolph J.M., Redecke L. Protein crystallization in living cells // *Biological Chemistry*. Walter de Gruyter GmbH, 2018. Vol. 399, № 7. P. 751–772.
139. Duyvesteyn H.M.E. et al. Towards in cellulo virus crystallography // *Sci Rep*. Nature Publishing Group, 2018. Vol. 8, № 1.
140. Schönherr R., Rudolph J.M., Redecke L. Protein crystallization in living cells // *Biological Chemistry*. Walter de Gruyter GmbH, 2018. Vol. 399, № 7. P. 751–772.
141. Tsutsui H. et al. A diffraction-quality protein crystal processed as an autophagic cargo // *Mol Cell*. Cell Press, 2015. Vol. 58, № 1. P. 186–193.
142. Povarova N. V. et al. Functioning of fluorescent proteins in aggregates in anthozoa species and in recombinant artificial models // *Int J Mol Sci*. MDPI AG, 2017. Vol. 18, № 7.
143. Cooper D.R. et al. Protein crystallization by surface entropy reduction: Optimization of the SER strategy // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2007. Vol. 63, № 5. P. 636–645.
144. Gavshina A. V. et al. The role of the correlated motion(s) of the chromophore in photoswitching of green and red forms of the photoconvertible fluorescent protein mSAASoti // *Sci Rep*. 2024. Vol. 14, № 1. P. 8754.