

**На правах рукописи**



**ГАВШИНА Александра Васильевна**

**НАПРАВЛЕННОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ  
И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА  
БИФОТОХРОМНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА mSAASoti**

1.5.4. Биохимия

**Автореферат диссертации  
на соискание ученой степени кандидата химических наук**

**Москва 2024**

Работа выполнена в лаборатории физической биохимии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ «Биотехнологии РАН»).

*Научный руководитель:* **Савицкий Александр Павлович**, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии ФИЦ Биотехнологии РАН

*Официальные оппоненты:* **Кузьмин Владимир Александрович**, доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией процессов фотосенсибилизации Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН

**Субач Федор Васильевич**, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярного конструирования Федерального государственного бюджетного учреждения Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»)

*Ведущая организация:* Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Защита состоится «    » \_\_\_\_\_ 2025 г. в «    » часов на заседании Диссертационного совета 24.1.233.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, на соискание ученой степени кандидата наук на базе Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33, строение 2.

С диссертацией можно ознакомиться в Библиотеке биологической литературы Российской академии наук по адресу: 119071, Москва, Ленинский проспект, д. 33 и на официальном сайте ФИЦ Биотехнологии РАН <https://www.fbras.ru>.

Автореферат разослан «    » \_\_\_\_\_ 202\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета 24.1.233.01,  
Кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Открытие и расшифровка гена зеленого флуоресцентного белка GFP стали отправной точкой в новом витке исследований живого мира. Флуоресцентная метка белковой природы, требующая для созревания лишь присутствие кислорода, выгодно отличалась на фоне синтетических флуоресцентных красителей возможностью генетического кодирования для прижизненного наблюдения на разных стадиях клеточного цикла. Богатая фотохимия и физико-химические свойства после тщательного исследования их «непредсказуемого» поведения превратились в мощные инструменты мониторинга химического состава и физико-химических параметров клеток и организмов. Кроме того, эти свойства легли в основу сверхразрешающих методов флуоресцентной микроскопии, позволивших в 10 раз превзойти дифракционный предел, описанный Э.К. Аббе в XIX веке, а открытие фотопереключаемых флуоресцентных белков позволило расширить число решаемых задач. Флуоресцентные белки внесли большой вклад в развитие науки, что и стало основанием для присуждения сразу двух Нобелевских премий по химии: 2008 год – «За открытие и развитие зелёного флуоресцентного белка» и 2014 год – «За создание флуоресцентной микроскопии высокого разрешения».

В настоящее время известно больше 100 организмов, содержащих флуоресцентные белки, а также получены сотни вариантов мутантных форм флуоресцентных белков. Новые гены флуоресцентных белков часто обладают флуоресцентными и физико-химическими свойствами, которые были неизвестны ранее для флуоресцентных белков и синтетических красителей. Например, большой интерес вызвали фотосенсибилизатор KillerRed, гидратация хромофора Dreiklang под воздействием света и пр.

Объектом исследования является фотоконвертируемый и фотопереключаемый флуоресцентный белок SAASoti и его мутантные формы, который впервые был выделен сотрудниками лаборатории физической биохимии (Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН) из коралла *Stylocoeniella armata*, обнаруженного в лагуне острова Оти (Большой Барьерный риф). Впоследствии была получена его мономерная форма (V127T SAASoti или mSAASoti) и продемонстрирована возможность применения mSAASoti в методах супер-разрешающей микроскопии (фотоаквационной локализационной микроскопии), а также было обнаружено свойство обратимого фотопереключения.

**Целью** данной работы являлось изучение возможности получения вариантов mSAASoti с заданными свойствами (повышенная скорость переключения зеленой и красной форм, истинно мономерная форма) путем рационального мутагенеза.

Для достижения этих целей были сформулированы следующие **Задачи**:

- 1) Выявить функционально важные остатки цистеина при анализе мутантных форм mSAASoti, содержащих замены остатков C21, C71, C105, C117 и C175.
- 2) Получить и охарактеризовать мутантные формы mSAASoti, содержащие замены аминокислотных остатков в микроокружении хромофора (M163, F177).
- 3) Проанализировать влияние замены K145P на свойства белка mSAASoti.
- 4) Установить структурные основы для эффективного фотопереключения.
- 5) Получить форму белка mSAASoti, пригодную для кристаллизации с последующим получением кристаллической структуры.

### **Научная новизна**

Ранее бифотохромные белки получали путем введения замен объемных а.о. в микроокружении хромофора (V157, F173 или M159), при этом амплитуда фотопереключения из флуоресцирующего в темное состояние превосходила необратимую фотодеструкцию. Однако, в случае mSAASoti свойство обратимого фотопереключения присутствует только для зеленой формы хромофора, в то время как красная форма подвергается лишь необратимой фотодеструкции при облучении зеленым светом, что может ограничивать его использование в методе RESOLFT, например. Для флуоресцентного белка mSAASoti эти свойства наблюдаются с сохранением соответствующих аминокислотных остатков, что делает его уникальным представителем семейства фотопереключаемых белков, а механизм фотопереключения, предложенный ранее при исследовании гомологичных флуоресцентных белков, может отличаться в случае SAASoti. В ходе данной работы впервые были получены быстропереключаемые формы mSAASoti, способные к необратимой фотоконверсии из зеленого в красный, а также к обратимому переключению из флуоресцентного в темное состояние для обеих форм. Получены и впервые охарактеризованы мутантные формы mSAASoti, содержащие замены аминокислотных остатков цистеина. Для формы C21N mSAASoti впервые получена кристаллическая структура с разрешением 3,0 Å. Методом динамического сетевого анализа на различных мутантных формах mSAASoti было установлено, что для эффективного фотопереключения необходимо, чтобы движения остатка гистидина из хромофор-образующей триады и фенильного фрагмента хромофора коррелировали и принадлежали одному сообществу.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Флуоресцентная метка, способная к различным видам фототрансформации и обладающая повышенной скоростью и эффективностью фотопереключения, имеет ряд преимуществ. Во-первых, при использовании такой метки требуются меньшие дозы и время экспозиции облучающего света, а во-вторых, она одновременно может быть использована в различных

вариациях супер-разрешающей микроскопии. Однако, ее применение может быть ограничено в живых клетках и организмах из-за возможного взаимодействия между меткой и компонентами системы, поэтому выявление реакционноспособных а.о. флуоресцентного белка является важной задачей как с теоретической, так и с практической точек зрения.

### **Методология и методы исследования**

Результаты, представленные в данной работе, получены с использованием современных биохимических и физико-химических методов характеристики флуоресцентных белков, рационального и сайт-насыщенного мутагенеза, очистки белков различными хроматографическими методами и проведением статистической оценки погрешности.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Аминокислотные остатки цистеина определяют как физико-химические свойства белка mSAASoti (C21, C117), так и флуоресцентные характеристики в реакциях фотоконверсии (C71) и фотопереключения (C105). Остаток C175, наиболее вероятно, подвергается фотоокислению при облучении светом, при этом сохраняя фотостабильность самого белка mSAASoti.
2. Замены аминокислотных остатков в микроокружении хромофора – M163 и F177 – способствуют конформационной подвижности хромофора, появлению способности фотоизомеризации красной формы, при этом скорость переключения зеленой формы увеличивается в разы. Замена остатка M163 отвечает за фотовыцветание белка mSAASoti. C21N/M163T – самый быстропереключаемый вариант mSAASoti, с максимальной эффективностью переключения обеих форм.
3. Замена K145P в белке C21N/M163A mSAASoti ограничивает способность к фотоконверсии из зеленого в красный, при этом фотопереключение в темное состояние происходит с максимальной скоростью.
4. Эффективное фотопереключение происходит, если движения остатка 66H и фенильного фрагмента хромофора коррелируют и эти фрагменты принадлежат к одному сообществу, что показано с помощью динамического сетевого анализа.
5. Ключевые аминокислотные остатки в окружении хромофора занимают те же положения, что и в случае бифотохромного белка IrisFP согласно структурному выравниванию.

### **Личный вклад автора**

Данные, представленные в данной работе, были получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах исследований: планирование, проведение эксперимента, сбор и обработка данных, оформление результатов и подготовка к публикации. Молекулярно-динамические расчеты и динамический сетевой анализ вариантов mSAASoti были

проведены при непосредственном участии д.ф.-м.н. Хреновой М.Г. (группа молекулярного моделирования ФИЦ Биотехнологии РАН). Кристаллическая структура была получена совместно с к.б.н. Бойко К.М. (лаборатория инженерной энзимологии ФИЦ Биотехнологии РАН).

### **Степень достоверности полученных результатов**

Представленные в работе данные были получены при использовании современных физико-химических методов и с проведением независимых экспериментов с использованием положительных и отрицательных контролей. Полученные данные анализировали с использованием современных методов статистической обработки и оценки погрешности результатов.

### **Публикации и апробация работы**

По теме научной работы было опубликовано три статьи в международных рецензируемых журналах. Результаты работы были также представлены в виде стендовых и устных докладов на всероссийских и международных конференциях: 3-d School on ADFLIM (Саратов, Сентябрь 2018 г.), Topical Problems of Biophotonics (Нижний Новгород, Июль 2019 г.), Отчетная конференция аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН (Москва, Июнь 2018, 2019 и 2020 гг.).

### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, списка сокращений, списка литературы, включающего 153 источников, и приложения. Работа изложена на 137 страницах, содержит 43 рисунка, 15 таблиц.

## **СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ**

**Обзор литературы** (Глава 1) состоит из 6 частей и посвящен: общим сведениям о флуоресцентных белках (1); фототрансформируемым флуоресцентным белкам (2) и их практическому применению (3), бесцистеиновым флуоресцентным белкам (4), моделированию процессов превращений (5) и объекту исследования (6).

**Методическая часть** (Глава 2) содержит подробное описание используемых методик: получение различных мутантных форм, выделение, очистка различными хроматографическими методами и спектральная характеристика мутантных форм рекомбинантного белка mSAASoti, проведение аналитической гель-фильтрации для определения олигомерного состояния, протоколы фотохимических и фотофизических превращений (необратимая фотоконверсия, обратимое фотопереключение).

**Результаты и обсуждение** представлены в Главе 3 Диссертационной работы.

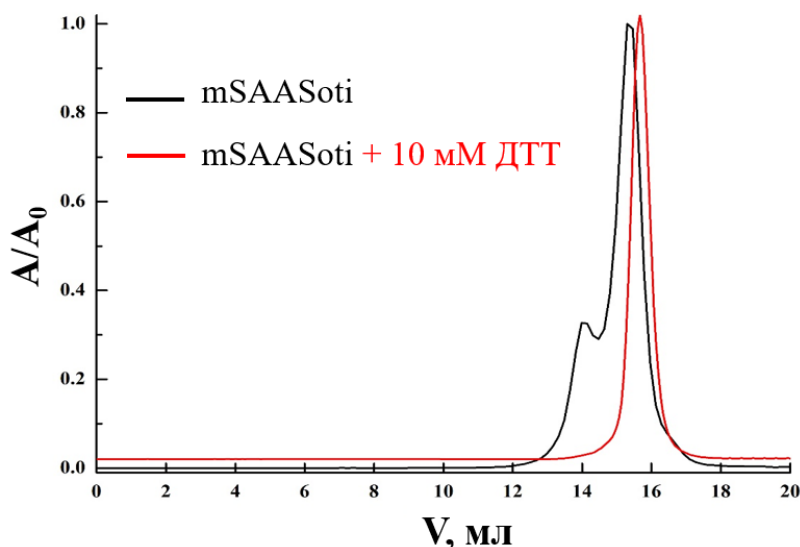
## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Флуоресцентный белок SAASoti первоначально был открыт как *фотоконвертируемый*, т.е. способный необратимо переходить из зеленого в красный флуоресцентный белок под действием продолжительного облучения фиолетовым светом (400 нм). Данный процесс является фотохимической реакцией, сопровождающейся разрывом пептидной связи. Ранее была получена мономерная форма, содержащая единичную замену V127T, которая была также применена в методе фотоактивационной локализационной микроскопии. Впоследствии было обнаружено свойство обратимого *фотопереключения* для зеленой формы, которое заключается в обратимом переходе из флуоресцирующей зеленой формы в нефлуоресцирующую «темную» форму по действием облучения синего света (470 нм). Данный процесс представляет собой фотоизомеризацию хромофора, сопровождающуюся его *цис-транс* изомеризацией и изменением протонированного состояния. Обратный переход происходит при облучении импульсами фиолетового света (400 нм) или самопроизвольно за длительное время. Для нативной красной формы белка mSAASoti фотопереключение не наблюдают.

### Подбор условий для очистки флуоресцентного белка SAASoti хроматографическими методами

Наиболее часто флуоресцентные белки очищают с использованием металл-хелатной и ионообменной хроматографии, однако встречаются также примеры с применением методов органической экстракции, эксклюзионной и, реже всего, гидрофобной хроматографии. Ранее флуоресцентный белок mSAASoti очищали двумя последовательными стадиями анионообменной хроматографии. Однако, степень чистоты образца белка, получаемого таким способом, являлась недостаточной, в первую очередь, для последующей кристаллизации, поэтому на первом этапе работы была оптимизирована схема очистки препаративных количеств флуоресцентного белка mSAASoti. В качестве альтернативного метода была предложена следующая схема очистки белка из раствора лизата клеток *E. coli*: *осаждение белков сульфатом аммония* → *гидрофобная хроматография* → *анионообменная хроматография*. Преимуществом этой схемы очистки помимо более высокой степени чистоты образца является отсутствие необходимости промежуточных стадий перевода образца/ диализа в буферы с другим составом, что, во-первых, уменьшает время проведения эксперимента, а во-вторых, сокращает потери белка на этих стадиях. В качестве носителя для проведения гидрофобной хроматографии была выбрана хроматографическая колонка HiPrep Butyl FF 16/10 (в случае HiPrep Phenyl FF 16/10 наблюдали сильное взаимодействие mSAASoti с носителем), а для последующей анионообменной хроматографии – MonoQ 5/50 GL. Однако, было обнаружено, что выделенный и очищенный мономерный белок mSAASoti склонен к образованию димерной фракции при

повышенных концентрациях (Рисунок 1), причем при добавлении к образцу белка и в буферный раствор дитиотреитола (10 мМ) димер разрушается.

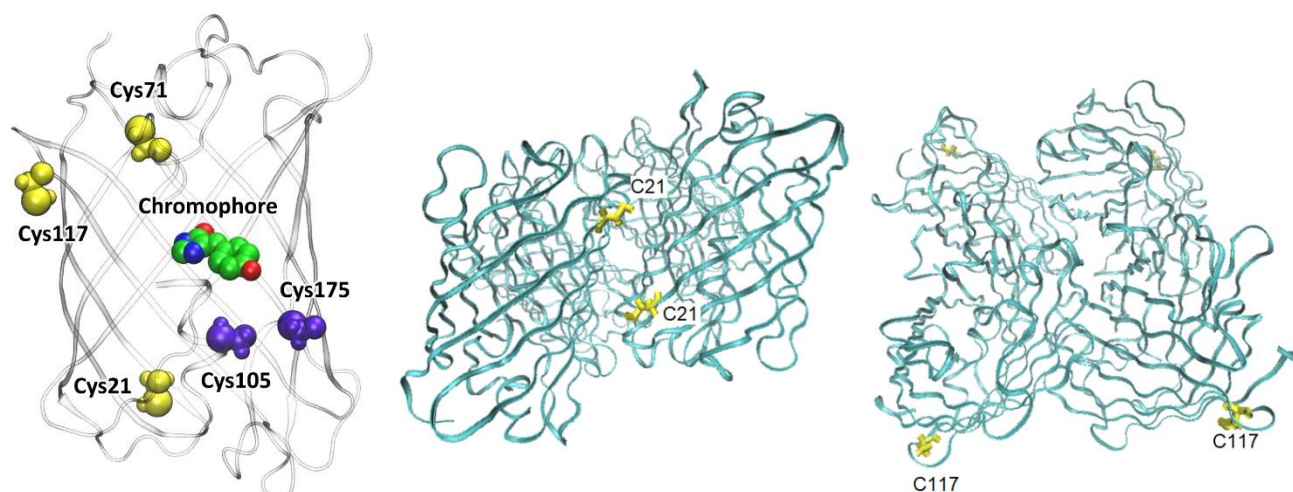


**Рисунок 1.** Гель-фильтрация образцов 0,22 мМ m SAASoti на носителе Superdex G200 100/20 GL в буфере 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4. Детекция по поглощению на длине волны 509 нм.

### **Роль остатков цистеина в аллостерической модуляции фототрансформаций mSAASoti**

Ввиду того, что частичная димеризация разрушается добавлением ДТТ, было решено проанализировать остатки цистеина. Первичная последовательность белка mSASSoti содержит 5 а.о. цистеина – C21, C71, C105, C117, C175, при этом боковые цепи остатков C21, C71 и C117 ориентированы наружу  $\beta$ -бочонка, в то время как остатки 105 и 175 – внутрь. Как видно на модели тетрамера SAASoti (Рисунок 2), которая была создана с использованием кристаллической структуры гомологичного тетрамерного белка Kaede (PDB-код: 2GW3), остатки цистеина в положении 21 экспонированы в область, так называемого, гидрофобного интерфейса, замена V127T в котором ранее привела к мономеризации SAASoti. Аминокислотный остаток C117 находится на поверхности уже самого тетрамера и, предположительно, не участвует в его формировании, но, возможно, отвечает за дальнейшую олигомеризацию тетрамеров в белке дикого типа. Согласно одному из предположений, введение замены V127T, необходимое для мономеризации SAASoti, препятствует правильной упаковке белка в кристалл. Поэтому сначала методом сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные формы C21N/wt, C117S/wt и C117T/wt SAASoti. Данные замены были выбраны на основании анализа последовательностей и структур гомологичных флуоресцентных белков, а также при учете успешного опыта получения бесцистеиновых вариантов белков Dendra2 и Maple3.

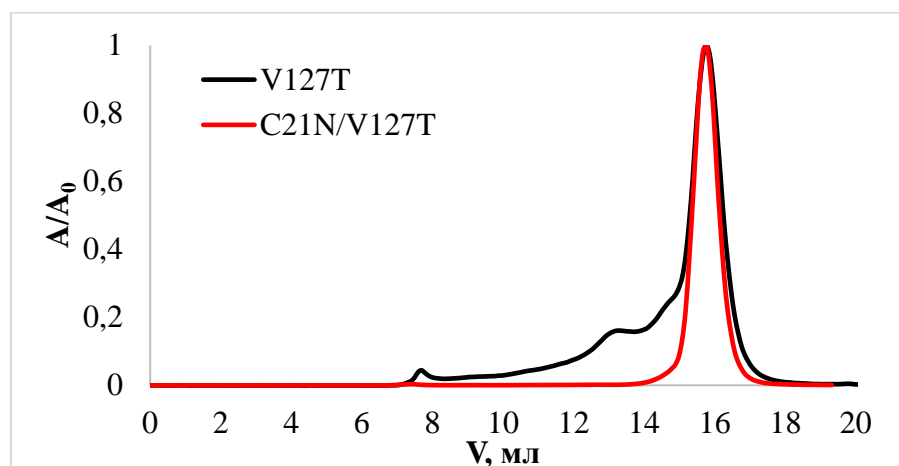




**Рисунок 2.** (Слева) 3D-модель структуры mSAASoti. Модель мономера с отмеченными а.о. цистеина. Окраска атомов хромофора соответствует элементам (зеленый – С, красный – О, синий – N). Остатки цистеина окрашены желтым, если SH-группа боковой цепи экспонирована на поверхности  $\beta$ -бочонка, сиреневым – в случае «внутренних» остатков. (Справа) 3D-модель структуры тетрамера с отмеченными а.о. C21 в гидрофобном интерфейсе и C117 на поверхности тетрамера.

После выделения и очистки описанным выше способом новых мутантных форм SAASoti, была проведена аналитическая эксклюзионная хроматография, в результате которой оказалось, что введение замены C21N привело к уменьшению количества самых крупных агрегатов, элюируемых в мертвом объеме хроматографической колонки. В случае варианта C117T/wt введенная замена, наоборот, привела к увеличению количества агрегатов большей молекулярной массы. Возможно, это объясняется природой выбранного аминокислотного остатка для замены – треонина. Замена C117S привела к нарушению созревания хромофора, так как не наблюдали флуоресцентного сигнала ни в клетках *E. coli*, экспрессирующих вариант C117S/wt SAASoti, ни после разрушения клеток во время выделения белка. На основании полученных результатов с диким типом SAASoti было решено ввести замену C21N в мономерную форму mSAASoti).

Как видно из результатов, представленных на Рисунке 3, C21N mSAASoti даже при более высоких концентрациях (0,354 мМ) находится в мономерной форме, в то время как в случае mSAASoti при концентрации 0,22 мМ наблюдается примесь белка с меньшим объемом удерживания, что соответствует массе димера.



**Рисунок 3.** Гель фильтрация образцов SAASoti на носителе Superdex G200 100/20 GL в буфере 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4. Детекция по поглощению на длине волны 509 нм. Концентрация 0,220 mM и 0,354 mM для образцов V127T (черный) и C21N/V127T SAASoti (красный), соответственно.

Однако, как показывает опыт с другими флуоресцентными белками, подвергаться химической модификации могут также и остатки внутри  $\beta$ -бочонка ввиду фотоиндуцированного формирования реакционноспособных радикалов. Методом сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные формы mSAASoti, содержащие замены C71V, C105V, C117S, C175A, C21N/C71V, C21N/C175A и C21N/C71G/C175A. Аминокислотные остатки для замены были выбраны на основании данных литературы. Гены, кодирующие новые мутантные формы mSAASoti, были клонированы в вектор pET22b и экспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3). Ввиду того, что объединение трёх замен привело к получению нефлуоресцирующего варианта C21N/C71V/C175A mSAASoti, был проведен сайт-насыщенный мутагенез в положении 71, в результате которого получен вариант C21N/C71G/C175A с высокой яркостью. При экспрессии в клетках *E. coli* наблюдали минимальное значение интенсивности флуоресценции клеток в случае белка C105V mSAASoti, что, по-видимому, объясняется уменьшением скорости созревания хромофора. Для всех выделенных форм были определены основные физико-химические и флуоресцентные свойства полученных белков. Как можно видеть из данных, приведенных в Таблице 1, точечные замены приводят к спектральному сдвигу красных форм, заметному возрастанию значений  $pK_a$  красных форм, особенно для варианта C175A mSAASoti. Вариант C21N/C71V имеет наименьшее значения коэффициента молярной экстинкции, однако квантовый выход флуоресценции для новых форм практически не изменился. Варианты C21N и C21N/C71G/C175A обладают максимальной яркостью ( $\epsilon^*\phi$ ).

**Таблица 1.** Основные физико-химические и флуоресцентные параметры полученных мутантных форм mSAASoti.

	Зелен. $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$	Зелен. $pK_a$	Красн. $\lambda_{ex} / \lambda_{em}$	Красн. $pK_a$	Зелен. $\varepsilon, *1000$ $M^{-1} * cm^{-1}$	Зелен. $\phi$	Яркость Зелен. ( $\phi * \varepsilon$ )
<b>mSAASoti</b>	509/519	6,3±0,1	573/579	6,6±0,1	75,0	0,59±0,02	44,3
<b>C21N</b>	509/519	6,4±0,1	579/590	7,5±0,1	82,4	0,61±0,02	50,3
<b>C105V</b>	509/519	6,5±0,1	576/589	7,1±0,1	61,0	0,60±0,02	36,6
<b>C71V</b>	509/519	6,5±0,1	577/590	7,0±0,1	65,1	0,63±0,04	41,0
<b>C175A</b>	509/519	6,7±0,1	580/587	7,8±0,1	80,1	0,55±0,05	44,0
<b>C117S</b>	509/519	6,2±0,1	580/590	6,7±0,1	66,3	0,54±0,03	35,8
<b>C21N/C71V</b>	509/519	6,3±0,1	577/589	7,0±0,1	48,9	0,58±0,02	28,4
<b>C21N/C175A</b>	509/519	6,3±0,1	580/590	7,4±0,1	65,4	0,55±0,03	36,0
<b>C21N/C71G/C175A</b>	509/519	6,4±0,1	577/589	7,2±0,2	83,8	0,60±0,02	50,3

**Анализ полученных мутантных форм в реакциях  
фотоконверсии и фотопереключения**

Для изучения реакций фотопревращения растворы выделенных белков облучали светом соответствующей длины волны в кювете и регистрировали спектры эмиссии флуоресценции. По максимумам длин волн эмиссии строили кинетические кривые и определяли кинетические параметры фотопревращений. *Фотоконверсию* из зеленой в красную форму проводили под действием света 400 нм (146 мВт/см<sup>2</sup>). На Рисунке 4 представлена кинетика образования красной формы для различных мутантных форм mSAASoti. Как видно из кинетических кривых, быстрее всего красная форма образуется в случае белков, содержащих замену C71V.

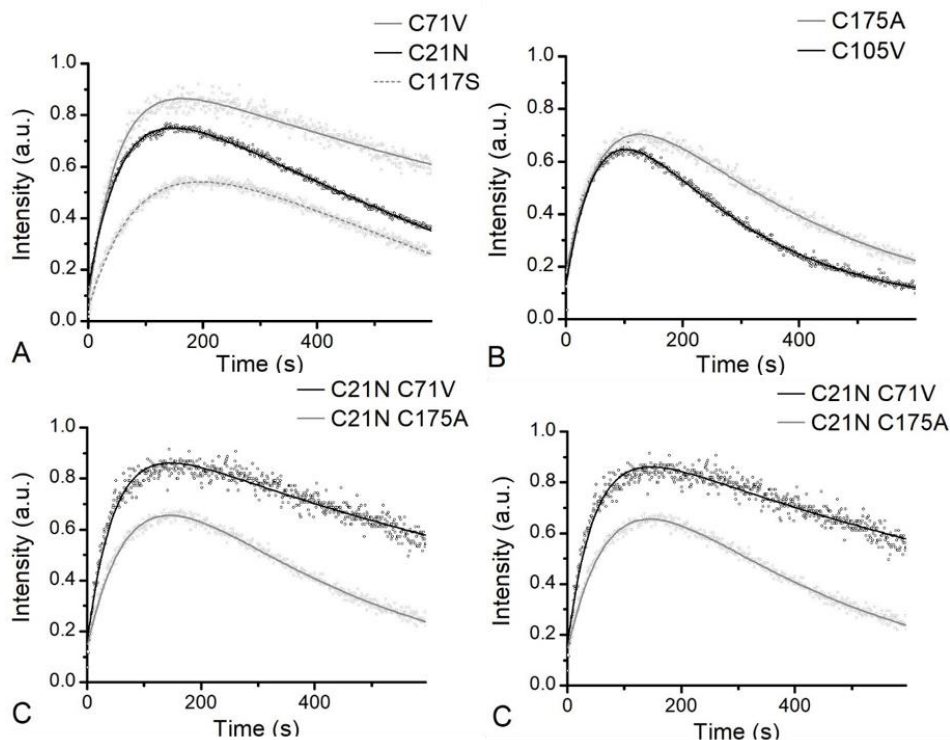
Кинетика фотоконверсии описывается биэкспоненциальной моделью (Уравнение 1), где первая компонента отвечает за образование красной формы, вторая компонента – за ее фотодеструкцию,  $c$  – фоновый сигнал.

$$I_{red}(t) = I * \frac{k_1}{k_2 - k_1} * (\exp(-k_1 * t) - \exp(-k_2 * t)) + c \quad (1).$$

Как видно из констант скорости фотоконверсии, представленных в Таблице 2, максимальная скорость фотоконверсии наблюдается для белков, содержащих замену C71V, причем для варианта с тройной заменой скорость максимальная, при этом фотостабильность красной формы также падает – увеличение константы  $k_2$ , которая отвечает за ее фотодеструкцию. Для C71V и C21N/C71V данная замена также повлияла на фотостабильность красной формы (минимальное значение  $k_2$ ).

**Таблица 2.** Константы скорости фотоконверсии ( $k_1$  – образование красной формы,  $k_2$  – фотодеструкция).

$*10^3, c^{-1}$	mSAA Soti	C21N	C21N/ C71V	C71V	C105V	C117S	C175A	C21N/ C175A	C21N/ C71G/ C175A
$k_1$	11±0,1	14±0,1	22±0,4	21±0,3	15±0,4	9±0,1	15±0,2	13±0,2	46±2
$k_2$	2±0,01	2±0,02	1±0,02	1±0,02	5±0,01	3±0,05	3±0,03	3±0,03	9±0,1



**Рисунок 4.** Зависимость интенсивности флуоресценции красной формы (590 нм) от времени при облучении образцов mSAASoti светом  $\lambda=400$  нм ( $146 \text{ мВт/см}^2$ ) в течение 10 минут в кювете. Экспериментальные данные представлены точками, нелинейная регрессия – линиями. Интенсивность флуоресценции была нормализована до предэкспоненциального значения  $I$  в соответствии с уравнением (1).

Остаток C71 находится, предположительно, на  $\alpha$ -спирали в непосредственной близости от хромофора (Рисунок 2), возможно, поэтому его замена приводит к ощутимому влиянию на реакцию фотоконверсии. Все варианты, кроме C117S, конвертируются быстрее или с такой же скоростью, что является интересным фактом, так как предполагается, что SH-группа C117 ориентирована наружу  $\beta$ -бочонка. Увеличение скорости фотоконверсии предполагает уменьшение времени облучения токсичным для живых клеток светом 400 нм при использовании флуоресцентного белка в качестве флуоресцентной метки в живых клетках.

*Обратимое фотопереключение* зеленой формы полученных мутантных форм mSAASoti изучали путем облучения растворов белков в кювете светом 470 нм ( $167 \text{ мВт/см}^2$ ) при регистрации спектров флуоресценции во времени, кинетику переключения изучали по максимумам эмиссии зеленой формы (518 нм). Реакция фотопереключения из зеленой флуоресцентной в темную форму является обратимой ввиду того, что она сопряжена с *цис-транс*-изомеризацией хромофора, сопровождающейся изменением его протонированного состояния. Регенерацию флуоресцентной формы проводили короткими импульсами светом 400 нм ( $5,7 \text{ мВт/см}^2$ ). Важно отметить, что один и тот же образец можно переключать множество раз, так как регенерацию

включенной (флуоресцентной) формы можно проводить путем облучения светом 400 нм, при этом образцы белков содержали в растворе 20 мМ NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,2) во избежание фотоконверсии. На Рисунке 5 представлены кинетические кривые обратимого переключения зеленой формы. Как видно из Рисунка 5, вариант C105V имеет максимальную скорость переключения, в то время как варианты с заменой C175 переключаются медленнее всего.

Также белки с заменой C175A имеют наибольшую степень фотодеструкции при переходе к последующим циклам. Примечательно, что кинетика фотопереключения первого цикла отличается от последующих (Таблица 3).

**Таблица 3.** Кинетические параметры реакции фотопереключения из зеленого флуоресцентного в темное состояние, измеренные для различных мутантных форм mSAASoti в соответствии с Уравнениями 2 и 3.

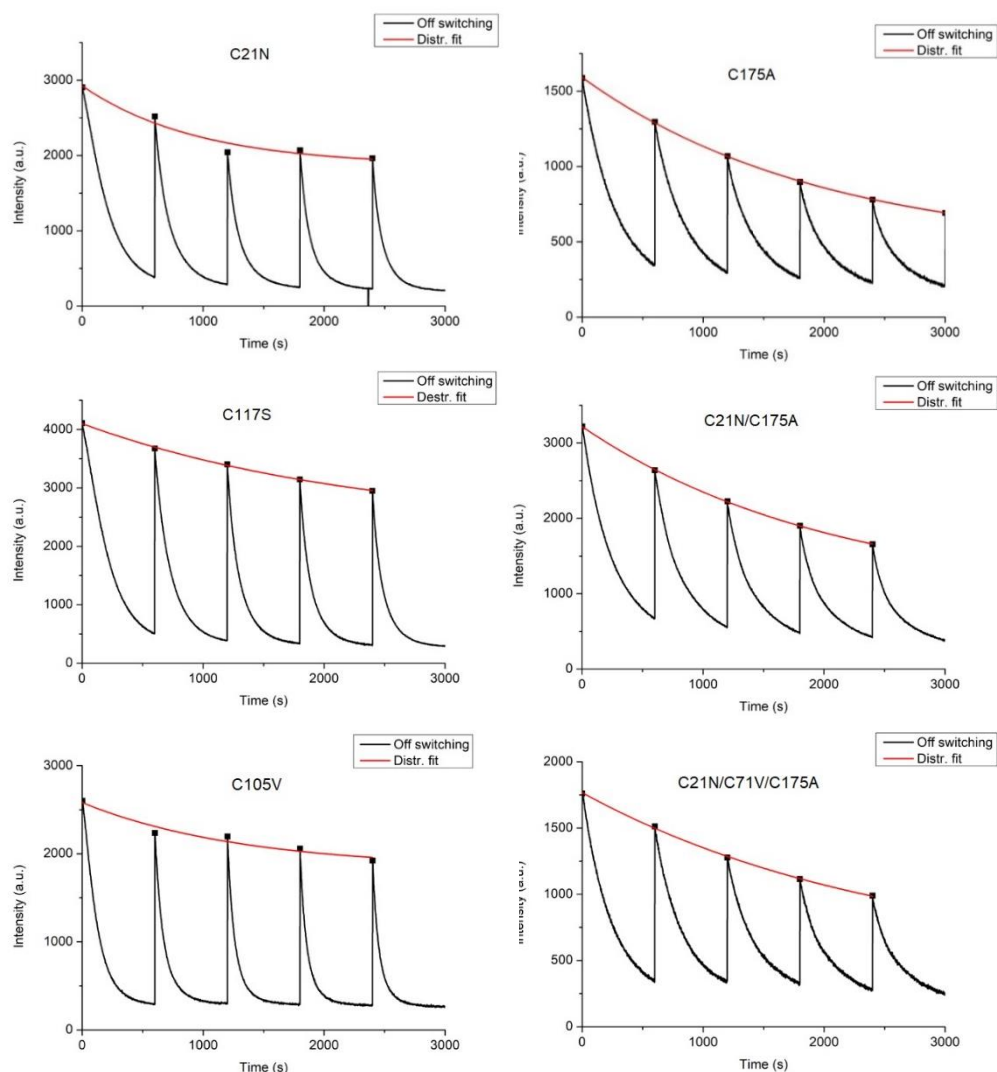
Переключение зеленой формы						
SAASoti	1 <sup>й</sup> Цикл (2)			2 <sup>й</sup> Цикл (3)		
	I <sub>2</sub> /I <sub>1</sub>	k <sub>1</sub> *10 <sup>3</sup> , с <sup>-1</sup>	k <sub>2</sub> *10 <sup>3</sup> , с <sup>-1</sup>	I <sub>2</sub> /I <sub>1</sub>	k <sub>1</sub> *10 <sup>3</sup> , с <sup>-1</sup>	k <sub>2</sub> *10 <sup>3</sup> , с <sup>-1</sup>
<b>mSaasoti</b>	0,27	5,5±0,2	9,8±0,7	0,26	7,8±0,1	24,7±0,8
<b>C21N</b>	0,27	5,7±0,1	15,7±0,1	0,76	5,3±0,1	13,7±0,2
<b>C21N/C71V</b>	0,26	6,8±0,1	15,6±0,6	0,2	7,4±0,1	22,8±0,8
<b>C71V</b>	0,14	4,5±0,2	14,2±2,0	0,4	5,1±0,2	15±2
<b>C105V</b>	0,22	9,1±0,1	34,3±0,7	2,06	7,1±0,2	17,9±0,2
<b>C117S</b>	0,09	6,4±0,1	10,9±0,3	0,24	6,4±0,1	15,6±0,5
	1 <sup>й</sup> Цикл (3)			2 <sup>й</sup> Цикл (3)		
<b>C175A</b>		3,5±0,1		0,12	3,1±0,1	16±1
<b>C21N/C175A</b>	–	4,1±0,1	–	0,98	1,5±0,3	7,5±0,3
<b>C21N/C71G/C175A</b>	–	4,0±0,1	–	–	4,4±0,1	–

Во всех случаях, за исключением вариантов, содержащих замену C175A, переключение в первом цикле происходит согласно Уравнению 2, в то время как второй и последующий цикл – согласно Уравнению 3:

$$I = I_1 * \exp(-k_1 t) - I_2 * \exp(-k_2 t) + c \quad (2)$$

$$I = I_1 * \exp(-k_1 t) + I_2 * \exp(-k_2 t) + c \quad (3)$$

где k – константа скорости реакции, I – предэкспоненциальный множитель, c – фоновый и остаточный сигнал.



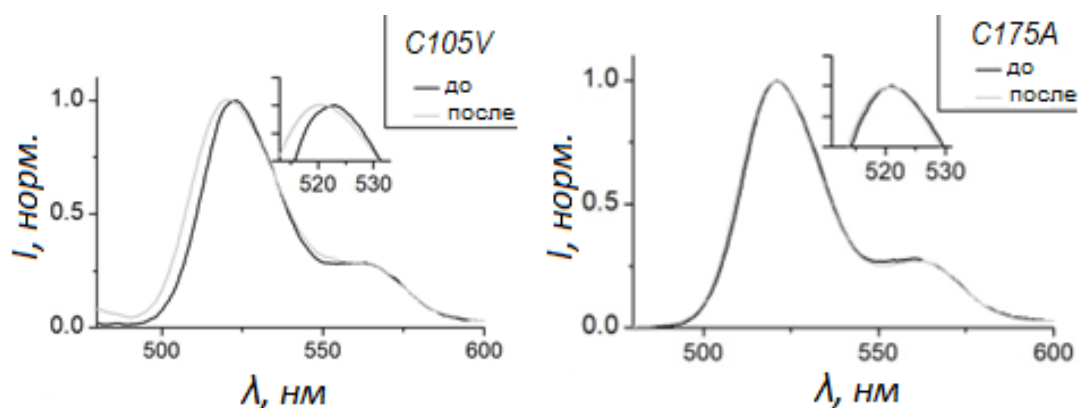
**Рисунок 5.** Циклы обратимого фотопереключения зеленой формы при облучении светом 470 нм (10 минут) с последующей регенерацией флуоресцентной формы (400 нм, 10 с).

Для образца дикого типа, а также для всех образцов mSAASoti, не содержащих замену C175A, наблюдали спектральный сдвиг (1-3 нм) в более коротковолновую область на спектрах эмиссии флуоресценции (Рисунок 6), возникающий в процессе облучения светом 470 нм. В Таблице 4 приведены численные характеристики величины спектрального сдвига, установленные для полученных образцов mSAASoti.

**Таблица 4.** Величина спектрального сдвига после облучения светом  $\lambda=470$  нм в течение 600 с.

Цикл ФП	C21N	C21N/ C71V	C105V	C117S	C175A	C21N/ C175A	C21N/ C71G/ C175A
I	2,0	1,5	2,0	1,0	0,5	0,5	0,5
II	3,0	1,0	2,5	2,0	1,0	0,5	1,0





**Рисунок 6.** Спектры эмиссии флуоресценции зеленой формы до (черный) и после (серый) облучения светом 470 нм.

На основании этих результатов можно предположить, что во время фотопереключения происходит модификация остатка цистеина в положении 175 (фотоокисление), поэтому во время первого цикла фототушения наблюдается компонента с отрицательным знаком (разгорание флуоресценции), а на спектрах эмиссии флуоресценции зеленой формы – спектральный сдвиг.

Обратный процесс – восстановление зеленой флуоресценции, обусловленное *транс-цис* изомеризацией хромофора, может происходить как под действием фиолетового света (поглощение протонированной формы хромофора), что занимает доли секунд, так и под действием термической релаксации (занимает часы). Термическую релаксацию изучали путем регистрации спектров поглощения предварительно переведенных (светом  $\lambda=470$  нм) в темное состояние растворов белков во времени. Кинетика релаксации подчиняется моноэкспоненциальной модели (Уравнение 4).

$$A = A_0 * (1 - \exp(-k * t)) + c \quad (4)$$

Константы скорости релаксации представлены в Таблице 5. Для вариантов C21N и C117S релаксация протекает медленнее, а в случае белков с заменой C175A – скорость самая медленная. Самый быстрый переход наблюдался для белка дикого типа mSAASoti.

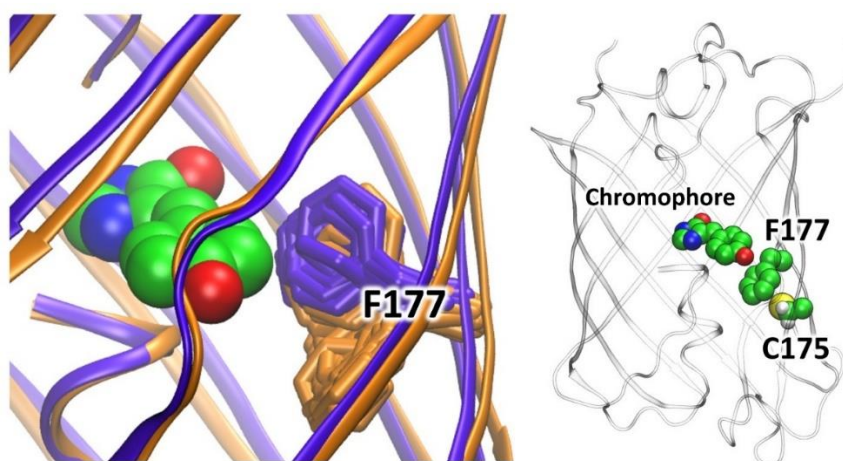
**Таблица 5.** Константы скорости релаксации из темной формы во флуоресцентную.

	WT*	C21N	C21N/ C71V	C71V	C105V	C117S	C175A	C21N/ C175A	C21N/ C71G/ C175A
<b><math>k \cdot 10^3,</math></b>	22	9,5	12,5	15,5	17,9	9,7	5,5	2,5	4,5
<b><math>c^{-1}</math></b>	$\pm 1$	$\pm 0,2$	$\pm 0,2$	$\pm 0,2$	$\pm 0,4$	$\pm 0,3$	$\pm 1,2$	$\pm 0,1$	$\pm 0,1$

### Молекулярное моделирование вариантов mSAASoti, содержащих замены а.о. цистеина

Чтобы понять причину низкой скорости термической релаксации образцов с заменой C175A, было проведено *классическое молекулярно-динамическое моделирование* вариантов mSAASoti и C175A mSAASoti по 200 нс каждый. Сравнение динамического поведения обеих этих систем было проведено путем анализа кросс-корреляционных карт, RMSD и гибкости аминокислотных

остатков в хромофорной области (Рисунок 7). Движения остатков в белке mSAASoti более коррелированы по сравнению с вариантом C175A. Значения RMSD, рассчитанные для атомов боковой цепи, характеризуются большим стандартным отклонением – 0,25 Å у дикого типа по сравнению с 0,18 Å у мутантной формы C175A. Была проанализирована динамика боковых цепей различных остатков и было обнаружено, что остаток F177 ведет себя по-разному в этих двух белках. Боковая цепь mSAASoti демонстрирует широкий диапазон конформаций, что также проявляется большим значением стандартного отклонения RMSD 1,49 Å. В белке C175A mSAASoti боковая цепь F177 менее гибкая и демонстрирует набор аналогичных конформаций, при этом стандартное отклонение RMSD в 3 раза меньше. Важно отметить, что этот остаток в основном занимает то же пространственное положение в C175A, что и фенильная часть хромофора в темном состоянии. Поэтому конформационная гибкость этого остатка в белке mSAASoti должна способствовать процессу изомеризации.



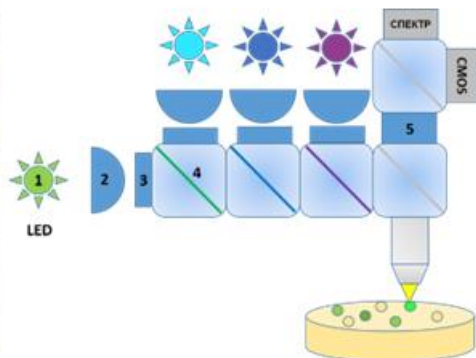
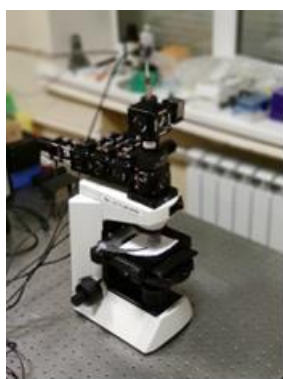
**Рисунок 7.** Выравнивание молекулярных моделей белков mSAASoti (оранжевый) и C175A (фиолетовый) mSAASoti.

### Получение мутантных форм mSAASoti с повышенной скоростью фотопереключения

При наложении структур бифотохромного флуоресцентного белка IrisFP (PDB-код: 2VVH), находящегося в флуоресцентной форме и *цис*-конформации хромофора, и 3D-модели структуры SAASoti было установлено, что ключевые аминокислотные остатки, стабилизирующие хромофор, находятся в тех же положениях в случае mSAASoti. Важно отметить, что максимальное различие в пространственном расположении атомов боковых групп в микроокружении хромофора наблюдается для аминокислотного остатка M163. Поэтому для получения вариантов mSAASoti, обладающих *повышенной скоростью и высоким контрастом фотопереключения*, были получены мутантные формы mSAASoti, содержащие замены а.о. в положениях 163 и 177 методом рационального и сайт-насыщенного мутагенеза, в качестве исходной матрицы были использованы варианты C21N, K145P и mSAASoti. Замена C21N была



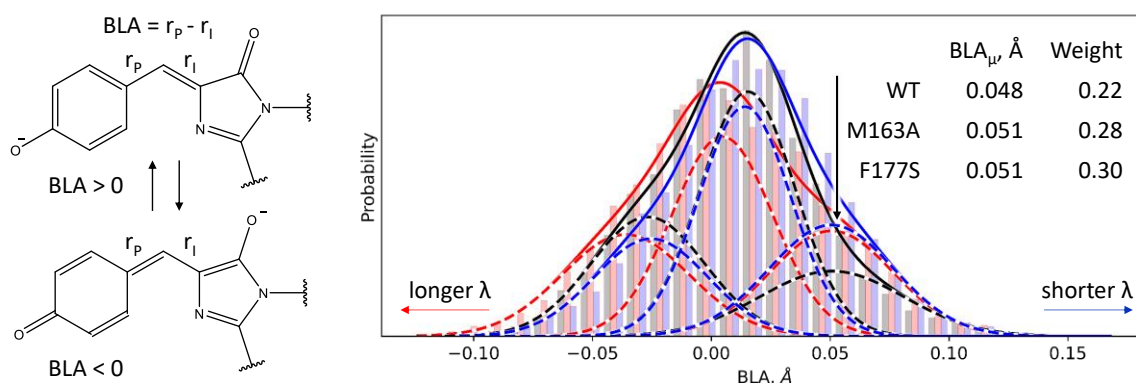
выбрана как положительно влияющая на агрегатное состояние белка при повышенных концентрациях, а также приводящая к удалению реакционноспособных остатков с поверхности белка. Вариант K145P был получен в ходе параллельной работы как наиболее яркий вариант mSAASoti. Также были получены мутантные формы с комбинациями этих замен. Замена K145P, предположительно, увеличила долю белка с правильно созревшим хромофором, что привело к получению мутантной формы mSAASoti с высоким коэффициентом молекулярной экстинкции. После сайт-насыщенного мутагенеза с помощью собранной установки (Рисунок 8), позволяющей облучать колонии клеток светом разной длины волны и регистрировать эмиссию флуоресценции, проводили флуоресцентный скрининг колоний, экспрессирующих наиболее быстропереключаемые варианты mSAASoti. После чего выделяли соответствующие плазмидные ДНК и отдавали на секвенирование (ООО «Евроген»). В Таблице 6 представлена часть полученных мутантных форм mSAASoti.



**Рисунок 8.** Установка для флуоресцентного скрининга колоний *E. coli*, экспрессирующих различные мутантные формы mSAASoti после сайт-насыщенного мутагенеза. (Слева – фото, справа – схема организации установки).

После флуоресцентного скрининга часть мутантных форм mSAASoti была выделена, очищена хроматографическими методами и охарактеризованы основные физико-химические и флуоресцентные параметры – коэффициент молярной экстинкции ( $\epsilon$ ),  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , pKa (Таблица 6). При экспрессии в клетках *E. coli* белков K145P и F177S mSAASoti была отмечена высокая яркость клеток, что говорит о возможном повышении скорости созревания хромофора, однако, увеличение коэффициента экстинкции при этом наблюдали только для белка K145P mSAASoti. Введение замены в положении 177 приводит к заметному уменьшению величины коэффициента молярного поглощения и смещению значения pKa, особенно для красной формы, в область более высоких значений. Наибольший коэффициент экстинкции наблюдали для исходных вариантов mSAASoti – mSAASoti, C21N, K145P, C21N/K145P. Наряду с этим замены в положениях 163 и 177 отразились на спектрах поглощения, возбуждения и эмиссии флуоресценции, во всех случаях наблюдался сдвиг в более коротковолновую область и изменение формы (уширение пиков) спектров.

Для объяснения этого феномена было выполнено молекулярно-динамическое моделирование с потенциалами КМ/ММ. Ранее было показано для белков с хромофором типа GFP, что величина изменения длины связи (BLA – bond length alteration – разница между длинами связей C–C в мостике C=C хромофора, Рисунок 9) коррелирует с максимумом полосы поглощения. Структуры с преобладанием резонансной формы с  $BLA > 0$  характеризуются большей энергетической щелью между основным и возбужденным электронными состояниями и меньшей длиной волны перехода. Поэтому был сделан вывод, что распределение BLA должно коррелировать с формой полосы поглощения. Чтобы изучить это, было выполнено КМ/ММ MD моделирование трех модельных систем – mSAASoti, M163A и F177S. Основное различие наблюдается в массах фракций, характеризующихся большими значениями BLA и, следовательно, соответствующих более коротким длинам волн в спектре поглощения. Общее распределение более широкое для M163A и F177S mSAASoti, что также согласуется с экспериментальными наблюдениями. Таким образом, изменения в форме полосы поглощения могут быть объяснены общим изменением влияния всего белка на хромофорную группу, выражающимся в изменении распределения между двумя резонансными формами отрицательно заряженного хромофора. Можно предположить, что фракция с положительным BLA с преобладанием фенольной формы (черная стрелка на Рисунке 9) отвечает за более эффективную *цис-транс*-изомеризацию, что экспериментально наблюдается для M163A и F177S по сравнению с mSAASoti.



**Рисунок 9.** Изменение длины связи (BLA) в хромофоре типа GFP и его распределение в зеленой анионной форме mSAASoti (черные полосы и линии) и его вариантах M163A (красные полосы и линии) и F177S (синие полосы и линии). Фиттинг каждого распределения выполняется для трех гауссиан; веса и средние значения, соответствующие наиболее смещенной вправо составляющей для каждой модели, показаны и отмечены стрелкой.

Для сравнения скоростей переключения зеленой и красной форм использовали нормированную величину  $k$  (ФП), рассчитанную как отношение средней константы фотопереключения к аналогичной константе переключения зеленой формы исходного белка mSAASoti:

$$k_{\text{выкл норм}} = \frac{(A'_1 * k_1 + A'_2 * k_2)}{(A_1 + A_2) * k_{\text{выкл}}(mSAASoti)} \quad (5)$$

Таким образом, величина  $k$  (ФП) показывает, во сколько раз быстрее протекает фотопереключение, фотопереключение красной формы считали также по отношению к зеленой форме mSAASoti, т.к. красная форма mSAASoti не обладает способностью к обратимому фотопереключению. Как видно из данных, представленных в Таблице 6, введение замен в положениях 163 и 177, действительно, приводит к ускорению реакции фотопереключения зеленой формы, а также к появлению обратимого фотопереключения красной формы. Однако, важно подчеркнуть, что в случае mSAASoti именно замена M163, а не F177 (как в случае большинства гомологичных белков) приводит к получению более быстропереключаемых форм, при этом комбинация замен M163A/F177S (в белке C21N/K145P) не приводит к еще большему ускорению фотопереключения, константа скорости переключения варианта C21N/K145P/M163A/F177S больше лишь в 13,4 раза.

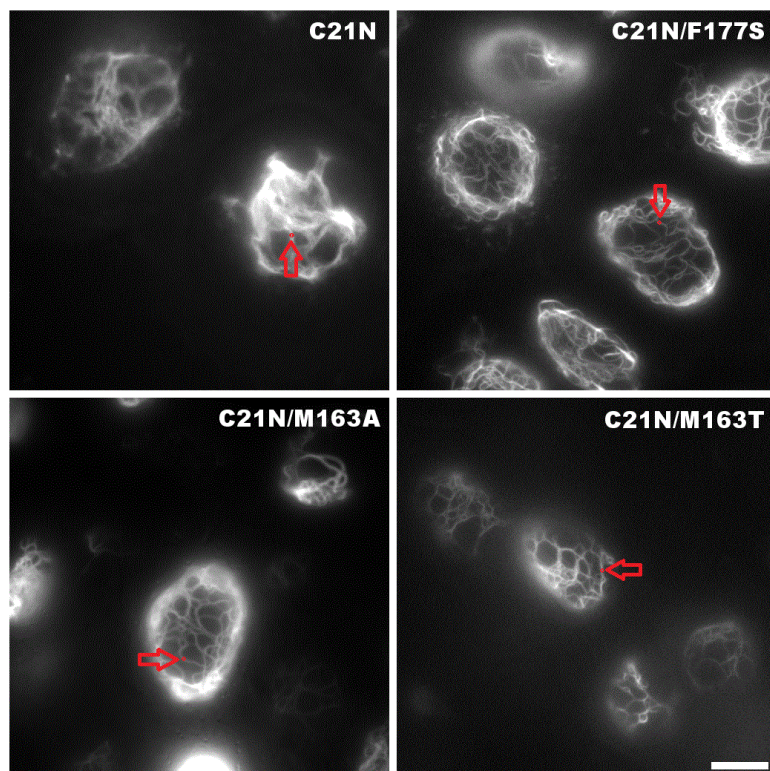
**Таблица 6.** Основные флуоресцентные параметры для быстропереключаемых вариантов mSAASoti.

Форма mSAASoti	Зеленая форма $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , нм	Красная форма $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , нм	$\epsilon$ (З/К) /1000 $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	pKa З/К $\pm 0,1$	$k$ (ФП)	
					Зелен.	Красн.
mSAASoti	509/519	578/589	75/24	6,3/6,6	1,0	–
C21N	509/519	579/590	82/25	6,4/7,5	1,0	–
K145P	509/519	578/589	88/21	5,7/6,7	1,0	–
C21N/K145P	509/519	578/589	87/16	5,8/6,7	1,1	–
M163A	496/519	560/587	62/0,3*	6,7/7,5	13,1	2,3
M163T	498/515	565/582	56/37	6,6/7,4	19,1	14
C21N/K145P/M163A	494/515	–/–	43/–	6,2/–	36,1	–
C21N/K145P/F177S	501/518	568/584	47/0,3	6,3/n.a.	9,8	1,1
C21N/K145P/M163A/F177S	496/516	560/585	46/3	6,0/n.a.	13,4	1,2
C21N/M163A	497/517	561/587	53/18	6,5/7,3	12,8	–
C21N/M163T	498/516	565/580	54/13*	5,9/7,2	33,0	15
C21N/M163G	496/516	558/581	50/5*	5,6/7,0	22,0	n.a.
F177S	501/519	560/588	51/1*	6,8/7,8	9,8	3,9
C21N/F177S	502/518	568/587	47/3*	6,7/7,7	9,0	–
C21N/F177A	503/518	566/588	42/3*	6,3/7,7	10,3	n.a.
C21N/F177N	503/517	564/587	55/4*	6,2/7,8	9,7	n.a.
C21N/F177T	506/518	573/588	66/5*	6,2/7,6	6,7	n.a.

Интересно, что наибольшую скорость продемонстрировали варианты C21N/M163T и C21N/K145P/M163A (скорость переключения превышает mSAASoti в 33 и 36 раз, соответственно). Другими словами, замена K145P (вдали от хромофора) посредством аллостерического эффекта приводит к ускорению фотопереключения. Однако, фотоконверсия из зеленого в красный варианта C21N/K145P/M163A mSAASoti дает минимальное количество красной формы, которую сложно детектировать. Таким образом, вариант C21N/K145P/M163A является наиболее быстропереключаемым, но не бифотохромным.

## Визуализация клеточных структур с использованием мутантных форм mSAASoti

Чтобы сравнить скорость и эффективность переключения между различными вариантами в циклах обратимого фотопереключения в живых клетках во избежание диффузии были получены fusion-конструкции со структурным белком виментином. Мутантные формы C21N, C21N/M163T, C21N/M163A и C21N/F177S mSAASoti были выбраны как наиболее перспективные и клонированы в вектор pcDNA3 в единую рамку считывания с геном виментина. Через 24 ч после трансфекции были зарегистрированы флуоресцентные изображения клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих полученные конструкции (Рисунок 10).



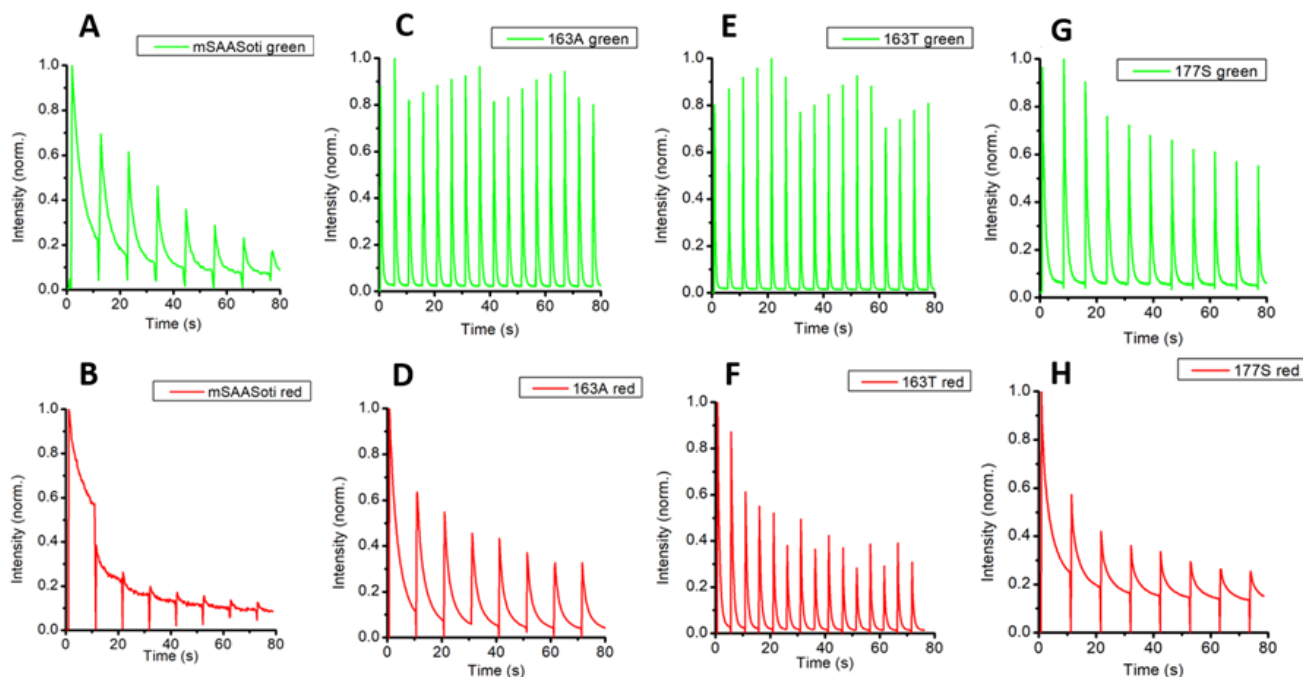
**Рисунок 10.** Экспрессия fusion-конструкций виментина, меченных различными мутантными формами mSAASoti на С-конце, через 24 ч после трансфекции. Конструкции экспрессировались в клетках HeLa Kyoto. Шкала, 10 мкм. Изображения были получены в зеленом канале. Интенсивность флуоресценции для кинетических измерений обратимого фотопереключения изучали в точках, обозначенных красной стрелкой.

Данные для кинетического анализа были получены в положениях, указанных красными точками и стрелками на Рисунке 10, после чего была проанализирована кинетика (Рисунок 11) обратимого переключения для обеих форм – красной и зеленой – для полученных конструкций C21N, C21N/M163T, C21N/M163A и C21N/F177S mSAASoti с виментином в клетках HeLa Kyoto. Для этого осуществляли последовательное включение-выключение флуоресцентной формы. *Фотопереключение зеленой формы.* Клетки освещали светом длиной волны 485 нм для реализации переключения "вкл-выкл", а включенное состояние восстанавливалось импульсами длиной волны 390 нм, что соответствует поглощению протонированного состояния зеленого хромофора (Рисунок 11 А,С,Е,Г). *Фотопереключение красной формы.* Красная форма генерировалась облучением светом длиной волны 390 нм, выключалась светом с длиной волны 548 нм и включалась импульсами с длиной волны 434 нм, что соответствует поглощению красного протонированного хромофора (Рисунок 11 В,Д,Ф,Н). Уменьшение сигнала



флуоресценции в клетках подчиняется моноэкспоненциальному закону как для зеленой, так и для красной форм (Уравнение 6).

$$I(t) = A * \exp(-k * t) + c \quad (6)$$



**Рисунок 11.** Кинетика фотопереключения, измеренная в клетках HeLa Kyoto, экспрессирующих различные варианты фьюжн-конструкции виментин-mSAASoti: C21N (A, B), C21N/M163A (C, D), C21N/M163T (E, F), C21N/F177S (H, G)). Вкл.-выкл. зеленой формы:  $\lambda=485$  нм (10 с) с последующей активацией  $\lambda=390$  нм (0,5 с). Красная форма генерировалась:  $\lambda=390$  нм в течение 5 с, выключалась при облучении  $\lambda=548$  нм (10 с) и активировалась при  $\lambda=434$  нм. Кинетические кривые построены на основе максимумов излучения для обеих форм. Полученные данные нормализованы к исходному значению интенсивности флуоресценции для обеих форм.

Как видно из Рисунка 11 и Таблицы 7, максимальная скорость и контрастность фотопереключения как для зеленой, так и для красной форм при экспрессии в клетках наблюдалась для варианта C21N/M163T наряду с максимальной контрастностью переключения (КП).

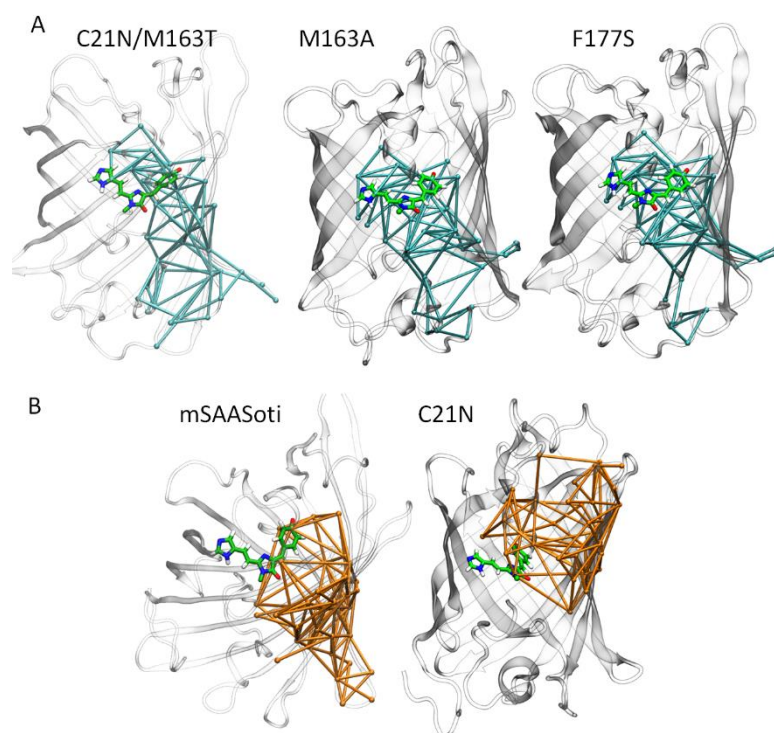
**Таблица 7.** Константы скорости реакции обратимого фотопереключения ( $k_{off}$ ) и контраст переключения (КП) для зеленой и красной форм, рассчитанные для мутантных форм C21N, C21N/M163T, C21N/M163A и C21N/F177S mSAASoti.

Мутантная форма	Зеленая форма ( $k_{off}, c^{-1}$ )	КП, %	Красная форма ( $k_{off}, c^{-1}$ )	КП, %
C21N	0,27±0,01	83	—	—
C21N/M163A	2,31±0,08	97	0,37±0,05	92
C21N/M163T	3,39±0,34	98	1,45±0,06	97
C21N/F177S	1,16±0,07	94	0,37±0,05	77

Интересно, что красная форма M163A выключается медленнее, чем у M163T, но их зеленые формы переключаются с сопоставимой скоростью. C21N/M163T mSAASoti переключается в выключенное состояние в 13 раз быстрее, чем C21N (3,39 к 0,27, соответственно). Освещение светом с длиной волны 548 нм красной формы C21N mSAASoti приводило только к фотодеструкции с минимальным фотопереключением. Замены M163A и M163T приводили к более фотостабильным вариантам зеленой формы, что, по-видимому, связано с исключением стадии фотоокисления метионина, тогда как начальная интенсивность флуоресценции заметно уменьшается при переходе от цикла к циклу в случае вариантов F177S/C21N и C21N mSAASoti.

### Появление фотопереключения во флуоресцентных белках. Динамический сетевой анализ

Для объяснения эффективного обратимого фотопереключения зеленой и красной форм быстропереключаемых мутантных форм был проведен динамический сетевой анализ, который показал, что эффективное переключение происходит в том случае, когда движения остатка H66 хромофора и фенильного кольца хромофора коррелируют и эти движения принадлежат к одному сообществу в белке (бирюзовый цвет в белках M163T и F177S), в то время как в случае белка C21N такой корреляции нет. Важно, что этот критерий работает и для красной формы (Рисунок 12).

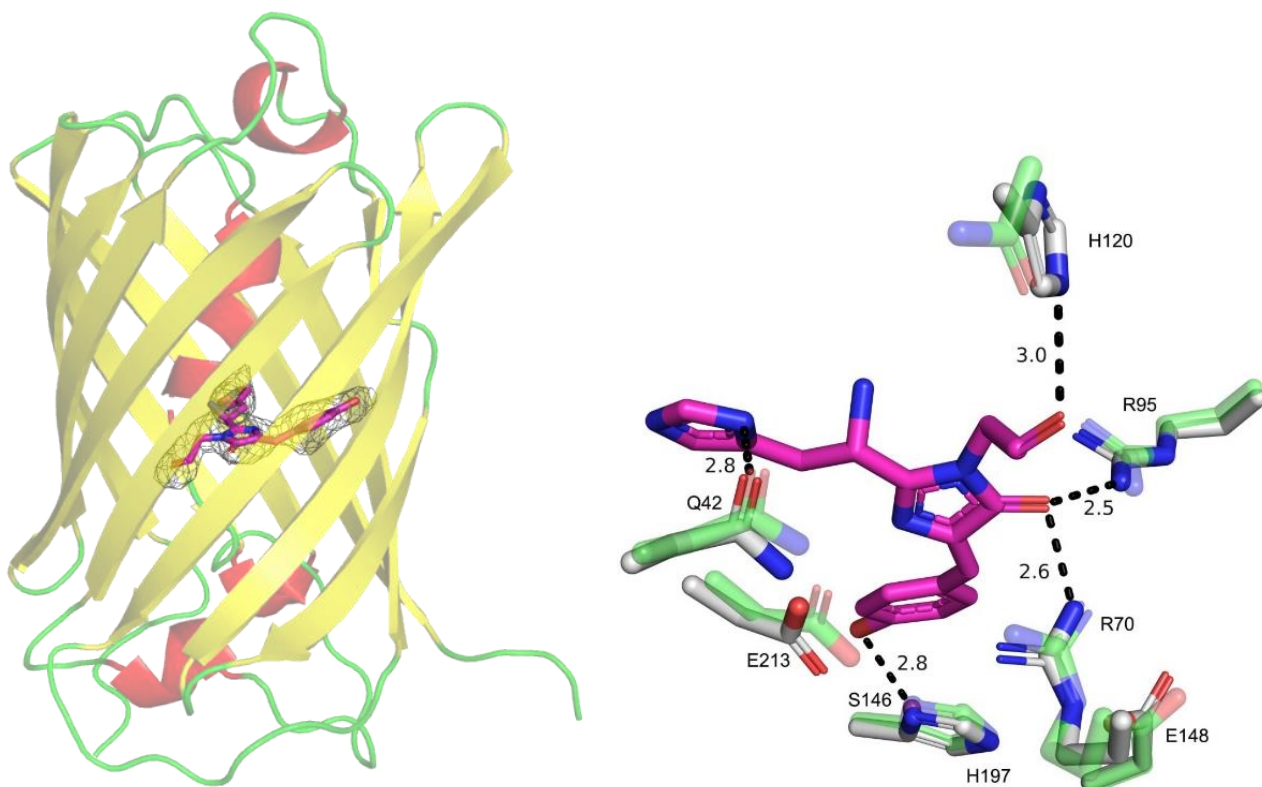


**Рисунок 12.** Сообщества, содержащие фенильный фрагмент (ФФ) красной формы хромофора в различных вариантах mSAASoti. Для вариантов C21N/M163T и F177S ФФ хромофора и боковая цепь H66 принадлежат к одному и тому же сообществу (бирюзовые линии), для C21N – к разным сообществам (оранжевый цвет). Цветовой код: С – зеленый, О – красный, N – синий, H – белый.

## Получение кристаллической структуры белка SAASoti

Для получения кристаллической структуры была выбрана форма C21N mSAASoti. Первичный кристаллизационный скрининг проводили с помощью роботизированной системы кристаллизации (Орух4, Douglas Instruments, Великобритания) в 96-луночных кристаллизационных планшетах при температуре 15°C с использованием метода диффузии пара в варианте «сидячей капли». Кристаллы, имеющие вытянутую форму и использованные для РСА, были получены в течение ~1 месяца в следующих условиях: 0,1 М Tris, pH 8,0, 30% по массе монометилового эфира полиэтиленгликоля 2000,

Кристаллическая структура белка C21N mSAASoti в его включенном зеленом состоянии была получена с разрешением 3,0 Å. Анализ кристаллических контактов показал, что SAASoti является мономером, что подтверждается биохимическими данными (Рисунок 3). C21N mSAASoti имеет типичную β-бочкообразную структуру с хромофором 66NYG68, расположенным на центральной α-спирали. Несмотря на умеренное разрешение, электронная плотность четко выявила созревший хромофор в его *цис*-конформации, а также конформацию близлежащих остатков. Хромофор закреплен рядом водородных связей с соседними аминокислотными остатками. На Рисунке 13 (Справа) показано также наложение структур C21N mSAASoti и бифотохромного белка IrisFP (PDB-код: 2VVH). Все ключевые остатки, которые, как показано на структуре IrisFP, фиксируют хромофор в *цис*- (триада E148–H197–E213) и *транс*-формах (E148–R70–E213). Кислород карбонильной группы хромофора связан водородом с боковой цепью H120, в то время как кислород имидазольного фрагмента связан боковой цепью двух аргининов – R70 и R95. Гистидиновая группа хромофора образует водородную связь с боковой цепью Q42. Наконец, ОН-группа тирозинового фрагмента связана водородом с боковой цепью S146. Примечательно, что ориентация тирозинового кольца хромофора стабилизируется за счет стэкинг-взаимодействия с H197 (Рисунок 13).



**Рисунок 13.** (Слева) Структура C21N mSAASoti окрашена элементами вторичной структуры. (Справа) Суперпозиция микроокружения хромофора (розовый цвет) C21N mSAASoti (белый цвет) и IrisFP, PDB-код 2VVH, (зеленый полупрозрачный). А.о. указаны в соответствии с нумерацией mSAASoti. Водородные связи изображены черными пунктирными линиями, соответствующие расстояния помечены.

## ВЫВОДЫ

1. Остаток C21 отвечает за формирование димерной примеси, замены C71V и C105V способствуют увеличению скорости фотоконверсии и обратимого фотопереключения зеленой формы, соответственно. Варианты mSAASoti с заменой C175A не имеют спектрального сдвига после облучения светом 470 нм, обладают пониженной фотостабильностью и низкой скоростью термической релаксации. Методами молекулярного моделирования было показано, что боковая цепь F177 значительно более гибкая в mSAASoti по сравнению с вариантом C175A.
2. Впервые получена библиотека мутантных форм mSAASoti, обладающих одновременно повышенной скоростью переключения зеленой формы и способностью к обратимому фотопереключению красной формы – C21N/M163A(G, S, L), C21N/F177S(A, N, T), C21N/K145P/M163C(I, V, P), C21N/K145P/F177T(L, C). C21N/M163T – вариант mSAASoti с максимальной эффективностью переключения зеленой и красной форм (контраст переключения 98 и 97%, соответственно) и фотостабильностью при экспрессии в клетках млекопитающих.



3. Замена K145P приводит к увеличению коэффициента экстинкции. Впервые получена нефотоконвертируемая форма белка mSAASoti – C21N/K145P/M163A, обладающая, однако, максимальной скоростью фотопереключения зеленой формы.
4. Впервые методами динамического сетевого анализа было показано, что эффективное фотопереключение происходит, если движения остатка 66Н и фенильного фрагмента хромофора коррелируют и эти фрагменты принадлежат к одному сообществу.
5. Впервые получена кристаллическая структура белка C21N mSAASoti с разрешением 3,0 Å, (PDB-код: 8PEI).

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### *Статьи в рецензируемых журналах*

- 1) Gavshina A.V., Marynich N.K., Khrenova M.G., Solovyev I.D., Savitsky A.P. The role of cysteine residues in the allosteric modulation of the chromophore phototransformations of biphotochromic fluorescent protein SAASoti. // *Scientific Reports* – 2021. – Vol. 11. – 24314. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03634-9>.
- 2) Gavshina A.V., Solovyev I.D., Savitsky A.P. The role of the 145 residue in photochemical properties of the biphotochromic protein mSAASoti: brightness versus photoconversion. // *International Journal of Molecular Sciences* – 2022. – Vol. 23. – 16058. <https://doi.org/10.3390/ijms232416058>.
- 3) Gavshina A.V., Solovyev I.D., Khrenova M.G., Boyko K.M., Varfolomeeva L.A., Minaev M.E., Popov V.O. The role of the correlated motion(s) of the chromophore in photoswitching of green and red forms of the photoconvertible fluorescent protein mSAASoti. // *Scientific Reports* – 2024. – Vol. 14. – 8754. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59364-1>.

### *Тезисы докладов:*

- 1) Гавшина А.В., Савицкий А.П. Подбор условий для выделения препаративных количеств рекомбинантного флуоресцентного белка V127T SAASoti для последующего получения кристаллической структуры // *Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН*, 25-28 июня 2018 г., Москва.
- 2) Gavshina A.V., Solovyev I.D., Savitsky A.P. Oligomerization state of V127T SAASoti fluorescent protein at high concentrations // *3-d School on ADFLIM*, 24-28 сентября 2018 г., Саратов.

- 3) Гавшина А.В., Савицкий А.П. Получение и характеристика форм флуоресцентного белка SAASoti с повышенной скоростью фотопереключения // *Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН*, 24-28 июня 2019 г., Москва.
- 4) Gavshina A.V., Marynich N.K., Savitsky A.P. The role of surface cysteine residues of SAASoti-FP // *Topical problems of biophotonics*. 27-31 июля 2019 г., Нижний Новгород.
- 5) Гавшина А.В., Савицкий А.П. Поиск перспективных форм флуоресцентного белка SAASoti после введения случайных аминокислотных остатков по определенным положениям // *Сборник тезисов отчетной конференции аспирантов ФИЦ Биотехнологии РАН*, 22-30 июня 2020 г., Москва.