

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ BIOTEХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМЕНИ А.Н. БАХА

На правах рукописи



Гавшина Александра Васильевна

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

Специальность 1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Савицкий Александр Павлович

Москва 2024

Оглавление

Список используемых сокращений.....	3
Введение	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Общие сведения о флуоресцентных белках	12
1.2. Фототрансформируемые флуоресцентные белки	16
1.2.1. Фотопереключение	17
1.2.2. Фотоактивация	23
1.2.3. Фотоконверсия	25
1.2.4. Фотодеструкция	27
1.3. Практическое применение явления фотопревращения	29
1.4. Бесцистеиновые флуоресцентные белки.....	33
1.5. Моделирование процессов фотопревращений	35
1.6. Объект исследования	37
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	41
2.1. Реактивы и материалы.....	41
2.2. Общие методики	44
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	64
3.1. Подбор условий для очистки флуоресцентного белка SAASoti хроматографическими методами.....	64
3.2. Роль остатков цистеина в аллостерической модуляции фототрансформаций mSAASoti	67
3.2.1. Анализ остатков цистеина, находящихся на поверхности	67
3.2.2. Анализ остатков цистеина, находящихся «внутри» β -бочонка SAASoti	70
3.3. Получение кристаллической структуры белка SAASoti.....	79
3.3.1. Получение мутантной формы mSAASoti для последующих структурных исследований.....	79
3.4. Молекулярное моделирование вариантов mSAASoti, содержащих замены аминокислотных остатков цистеина	83
3.4.1. Увеличение рКа хромофора красной формы.....	83
3.4.2. Влияние замены C175A на скорость релаксации зеленой формы...	85
3.5. Получение яркой формы mSAASoti	86

3.6. Получение мутантных форм mSAASoti с повышенной скоростью фотопереключения.....	88
3.6.1. Характеристика физико-химических и флуоресцентных параметров мутантных форм с заменами в положении 163 и 177	89
3.6.2. Причина уширения спектров поглощения.....	90
3.6.3. Изучение обратимого переключения полученных мутантных форм mSAASoti	92
3.6.4. Визуализация клеточных структур с использованием мутантных форм mSAASoti.....	99
3.7. Происхождение фотопереключения во флуоресцентных белках.....	103
Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	105
ВЫВОДЫ.....	115
Публикации по теме работы.....	116
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	134

Список используемых сокращений

$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ – максимумы длин волн поглощение и эмиссии

ϕ – квантовый выход флуоресценции

ε – коэффициент молярного поглощения

pK_a – константа кислотности хромофора в возбужденном состоянии

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ – дитиотреитол

ИПТГ – изопропилтиогалактопиранозид

кДНК – комплементарная ДНК

КМ/ММ – комбинированный метод квантовой механики/молекулярной механики

ПЦР – полимерная цепная реакция

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

FCS – Fluorescence Correlation Spectroscopy, флуоресцентная корреляционная спектроскопия

MALDI TOF – Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time Of Flight, масс-спектрометрический анализ матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным детектором

PMSF – фенилметилсульфонил фторид

PALM – PhotoActivated Localisation Microscopy, фотоактивационная локализационная микроскопия

SIM (NL-SIM) – микроскопия структурированного освещения (нелинейная)

SOFI – Stochastic Optical Fluctuation Imaging, микроскопия стохастических оптических флуктуаций

STED – STimulated Emission Depletion, субдифракционная микроскопия, основанная на истощении флуоресценции вынужденным излучением;

STORM – Stochastic Optical Reconstruction Microscopy, стохастическая оптическая реконструкция

RESOLFT – REversible Saturable/Switchable Optical Fluorescence Transitions, флуоресцентная микроскопия обратимых насыщаемых оптических переходов.

Упомянутые в тексте флуоресцентные белки

asFP595 – флуоресцентный белок из *Anemonia sulcata*

avGFP, *GFP* или дикий тип *GFP* – первый открытый флуоресцентный белок из *Aequorea victoria*

BFP – голубой флуоресцентный белок, производное *GFP*

CFP – синий флуоресцентный белок, производное *GFP*

dendFP – фотоконвертируемый из зеленого в красный флуоресцентный белок из коралла *Dendronephthya sp.*

Dendra2 – улучшенная версия флуоресцентного белка *dendFP*

Dreiklang – обратимо фотопереключаемый желтый флуоресцентный белок, производное *GFP*

Dronpa – обратимо фотопереключаемый зеленый флуоресцентный белок

DsRed – красный флуоресцентный белок из коралла *Discosoma sp.*

e..FP – «усиленные» (enhanced); флуоресцентные белки, производные с улучшенными показателями яркости

EosFP – фотоконвертируемый из зеленого в красный флуоресцентный белок из коралла *Lobophyllia hemprichii*

IrisFP – производное F173S/F191L от *EosFP*, обладающее одновременно свойствами фотоконверсии из зеленого в красный и обратимым фотопереключением

Kaede – фотоконвертируемый из зеленого в красный флуоресцентный белок из коралла *Trachyphyllia*

KFP – «разгорающийся» (kindling), обратимо фотопереключаемый флуоресцентный белок, производное *asFP595*

KillerRed – первый генетически кодируемый фотосенсибилизатор, производные флуоресцентного белка *RFP*

m..FP – мономерное производное флуоресцентного белка

mCherry – мономерный красный флуоресцентный белок, производное *DsRed*

mKate – мономерное производное красного флуоресцентного белка *eqFP578*

mOrange – оранжевый флуоресцентный белок, производное *DsRed*

NijiFP – производное *F173S* от *Dendra2*, обладающее одновременно свойствами фотоконверсии из зеленого в красный и обратимым фотопереключением

Padron – положительный обратимо фотопереключаемый зеленый флуоресцентный белок, производное *Dronpa*

Padron0.9 – положительный обратимо фотопереключаемый зеленый флуоресцентный белок, производное *Padron*

PA..FP – фотоактивируемые производные флуоресцентных белков

pcDronpa – фотоконвертируемый вариант фотопереключаемого белка *Dronpa* (V60A/C62H/N94S/N102I/E218G)

PS..FP или *rs..FP* – фотопереключаемые производные флуоресцентных белков

RFP – красный флуоресцентный белок;

sf..FP – superfolder, производные флуоресцентных белков отличающиеся быстрым временем созревания

TagRFP – красный мономерный флуоресцентный белок

YFP – желтый флуоресцентный белок.

Введение

Актуальность темы исследования

Открытие [1] и расшифровка [2] гена зеленого флуоресцентного белка GFP стали отправной точкой в новом витке исследований живого мира. Флуоресцентная метка белковой природы, требующая для созревания лишь присутствие кислорода [3], 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 [4], [5], 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 [6]. 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 [7], гидратация хромофора Dreiklang [8] 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) [9]. Впоследствии была получена его мономерная форма (V127T SAASoti или mSAASoti) и продемонстрирована возможность применения mSAASoti в методах супер-разрешающей микроскопии (фотоактивационной локализационной микроскопии) [10], а также было обнаружено свойство обратимого фотопереключения [11].

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 [12] 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 фотопереклечение происходит, если движения остатка 66Н 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 источника, и приложения. Работа изложена на 137 страницах, содержит 43 рисунка, 15 таблиц.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о флуоресцентных белках

Впервые наличие флуоресценции организма *Aequorea victoria* в зеленой области спектра было описано в 1955 г. в работе [13], а в 1961 г. в процессе выделения белка экворина, представляющего собой Ca^{2+} -зависимый биолюминесцентный белок в комплексе с целентеразином, О. Шимомура установил, что вещество, обуславливающее зеленую флуоресценцию, имеет белковую структуру [1]. Несколько позже в работе [14] 1969 г. белок получил название GFP (Green Fluorescent Protein) – зеленый флуоресцентный белок. В 1971 г. эти же авторы предположили, что в световых органах медуз семейства *Aequorea* осуществляется резонансный перенос энергии (FRET) между люминесцирующим экворином и флуоресцирующим GFP. Структура хромофора GFP была установлена в 1979 г. [15]. В 1996 г. одновременно две группы ученых получили трехмерную структуру (Рисунок 1) флуоресцентного белка GFP [16], [17].

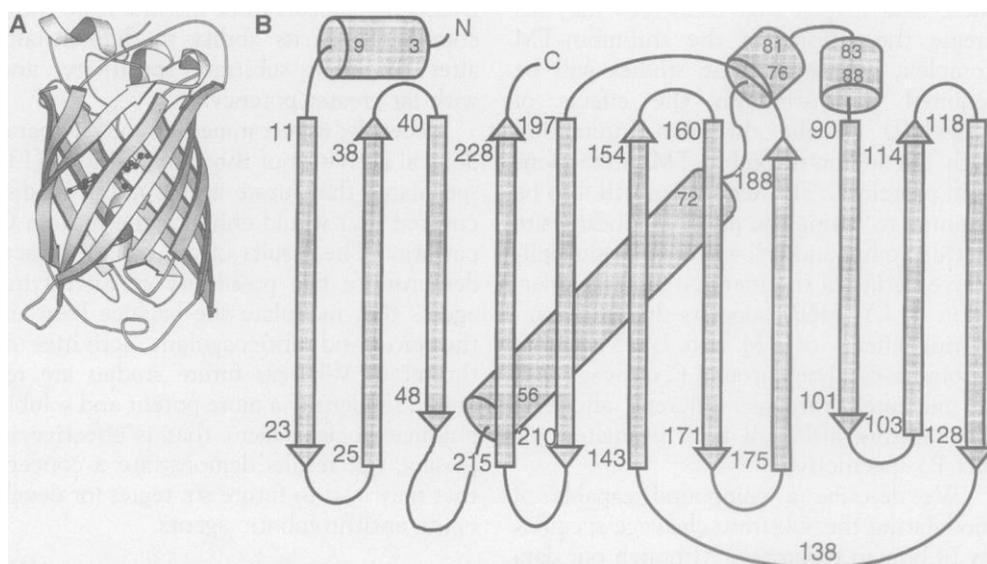


Рисунок 1. А) Схематичное изображение структуры белка GFP. В) Изображение развернутой структуры, цифрами обозначены номера аминокислотных остатков, формирующих отдельные элементы вторичной структуры [16].

Флуоресцентные белки являются консервативными по своей третичной структуре, а отличия первичной последовательности внутри семейства GFP-подобных белков могут быть значительными. 11 β -листов формируют так

называемый β -бочонок (Рисунок 1), внутри которого находится α -спираль с автокаталитически формируемым хромофором. Таким образом, хромофор является «защищенным» от внешних воздействий и тушителей боковой цепью самого флуоресцентного белка. Однако, существуют белки-фотосенсибилизаторы, которые имеют внутренний канал со связанными молекулами воды, через который могут «выходить» активные формы кислорода, которые могут генерироваться внутри β -бочонка [17, 18].

Важно подчеркнуть, что хромофор в белках семейства GFP образуется в результате автокаталитической реакции с участием молекулярного кислорода (Рисунок 2) из триады аминокислотных остатков -S65-Y66-G67-. На первой стадии происходит циклизация, при которой, предположительно, происходит образование основания Шиффа между аминокислотной группой G67 и карбонильным углеродом S65 с последующей дегидратацией. Вторым этапом является окислительное дегидрирование и образование метиленового мостика, который замыкает сопряженную π -систему связей между фенольным и имидазольным кольцом [3]. Долгое время считалось, что консервативным в триаде хромофора является остаток глицина в третьем положении, на втором месте – ароматический аминокислотный остаток, при этом первое положение могла занимать любая аминокислота [19]. Также было показано [20-23], что для созревания хромофора возможны варианты с неароматическими остатками L, S и G во втором положении, однако они не флуоресцируют. В работе [24] впервые был описан созревший флуоресцентный белок, содержащий остаток аланина в третьем положении хромофора, при этом также было показано, что в зависимости от других консервативных положений могут реализоваться два сценария пост-трансляционной модификации – созревание классического зеленого хромофора или разрыв пептидной цепи между первым и вторым аминокислотными остатками хромофора.

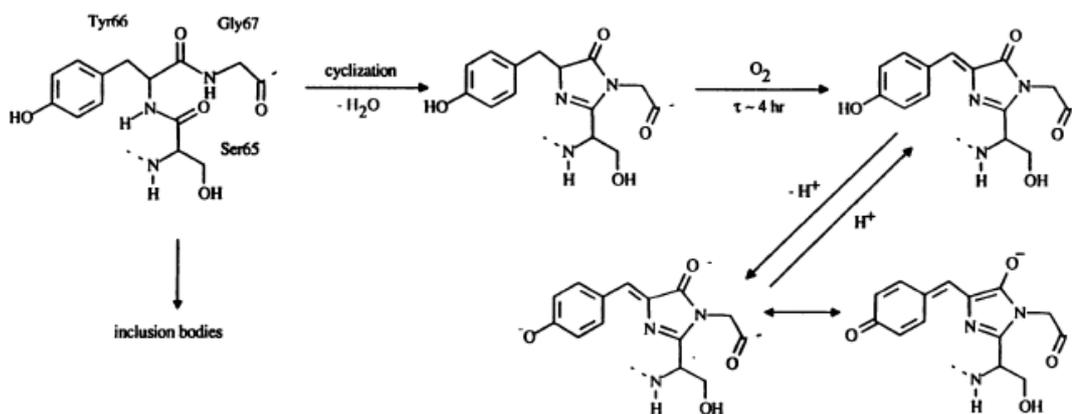


Рисунок 2. Схема образования хромофора GFP, впервые предложенная в работе [3].

Хромофор дикого типа GFP из *Aequoria victoria* частично находится в протонированном состоянии, максимум поглощения которого находится в области 400 нм. Протонированная форма хромофора не флуоресцирует. В случае GFP происходит перенос протона в возбужденном состоянии. В возбуждённом состоянии гидроксильная группа фенольного кислорода диссоциирует и протон переходит по системе водородных связей внутри бочонка, в результате образуется флуоресцирующая анионная форма, с максимумом поглощения в области 480 нм. Предположительно перенос идет через молекулу воды, S205 или T203 к акцептору E222 [26].

Флуоресценция кораллов была описана достаточно давно [27-33], а в середине 90-х гг. было обнаружено, что она обусловлена наличием в кораллах целой группы уникальных белков [31, 34-38]. Согласно одной из наиболее распространенных гипотез о функции флуоресцентных белков в кораллах, они являются необходимым компонентом для осуществления жизненно необходимого симбиоза кораллов с одноклеточными симбиотическими водорослями (*Symbiodinium*). Уникальным этот союз является потому, что он образован двумя эукариотическими организмами, причем геном симбионта в три раз превышает геном хозяина-коралла [39, 40].

Долгое время основной считалась, так называемая, защитная функция, так как флуоресцентный белок преобразует возбуждающий свет в более длинноволновый, что делает его менее токсичным для организма [29], [41-44]. Также известно, что флуоресцентные белки частично обуславливают окраску

коралла, тем самым «привлекая» к нему другие организмы. Установлено, что при различных инфекциях и повреждениях коралла, термическом и световом стрессе и т.д., повышается уровень активных форм кислорода в тканях, поэтому флуоресцентные белки могут выступать тушителями форм радикального кислорода. В подтверждение этой функции может служить тот факт, что поврежденные части коралла приобретают иную, нехарактерную им окраску. Было показано, что флуоресцентные белки могут выступать в качестве антиоксиданта [43, 44], так как при температурном стрессе GFP быстро деградирует [45]. Флуоресцентные белки препятствуют процессу обесцвечивания кораллов во время теплового шока, что также подтверждает гипотезу о защитной функции [42]. Гипотеза об усилении фотосинтеза организма *Symbiodinium* не получила подтверждения ввиду неэффективного переноса энергии между флуоресцентным белком коралла и пигментами фотосинтезирующей системы симбионта [46, 47].

Известно, что уровень экспрессии флуоресцентных белков в кораллах может регулироваться под действием внешнего света. Так, при уменьшении или увеличении количества поступающего света наблюдали соответствующее уменьшение или увеличение концентрации GFP в течение 15 дней [48]. Важно отметить, что коралл «реагирует» не только на количество, но и на спектральный состав света. Например, зеленый и особенно синий свет увеличивают экспрессию генов флуоресцентных белков CFP, GFP, RFP и CP [49]. Также известно, что в одном организме сразу могут экспрессироваться несколько генов флуоресцентных белков, причем в зависимости от возраста организма и его места обитания будет меняться соотношение между белками.

Однако, несмотря на все вышесказанное, остаётся открытым вопрос о функции и механизме действия флуоресцентных белков в живых организмах, и обязательно ли они связаны с явлением флуоресценции.

Новым витком для изучения строения, функции и особенностей флуоресцентных белков послужило получение кДНК GFP [50] с последующим клонированием и экспрессией гена флуоресцентного белка в

живых организмах [2], [51], что также продемонстрировало возможности использования флуоресцентных белков как генетически кодируемых маркеров при изучении процессов, протекающих в живых системах. Важно отметить, что поиски новых генов флуоресцентных белков со смещением в более длинноволновую область осложнялись тем фактом, что флуоресцентные белки впервые были открыты как часть биолюминесцентной системы (вышеописанный пример GFP и экворина), поэтому долгое время поиск вели в организмах, проявляющих биолюминесценцию. Заслуга выдающегося ученого Ю.А. Лабаса состоит в том, что именно он предположил возможность «самостоятельного» существования флуоресцентных белков и обратил внимание на то, что группа кораллов, не обладающая способностью к биолюминесценции, при освещении фиолетовым или синим светом флуоресцирует [35]. Так, во время анализа образцов коралловых полипов класса *Anthozoa* было обнаружено шесть новых генов флуоресцентных белков – гомологов GFP, причем два из них со смещением эмиссии в желтую и красную области спектра. Открытая впоследствии группа красных флуоресцентных белков позволила еще больше расширить количество биологических задач, которые можно решить с использованием данных белков.

В настоящее время известно около 100 организмов, содержащих флуоресцентные белки, а также получены сотни вариантов мутантных форм флуоресцентных белков [6]. Они широко применяются для визуализации структур, органелл и целых организмов [52], на их основе создаются чувствительные сенсоры, позволяющие детектировать различные физико-химические параметры системы (pH, ионы, температура и т.д.) [53].

1.2. Фототрансформируемые флуоресцентные белки

В группе GFP-подобных белков отдельно выделяется подгруппа фототрансформируемых флуоресцентных белков. Способность изменять спектральные свойства под действием облучающего света легла в основу

создания методов супер-разрешающей микроскопии (Нобелевская премия по химии 2014 года). Различают несколько типов превращений (Рисунок 3) во флуоресцентных белках, индуцированных светом: *фотоактивация* – необратимый переход из нефлуоресцирующего во флуоресцирующее состояние; *фотоконверсия* – необратимый переход между двумя флуоресцентными состояниями, сопровождающийся смещением спектра в более длинноволновую область (например, переход из зеленой формы в красную); *обратимое фотопереключение* между флуоресцирующим и нефлуоресцирующим состояниями.

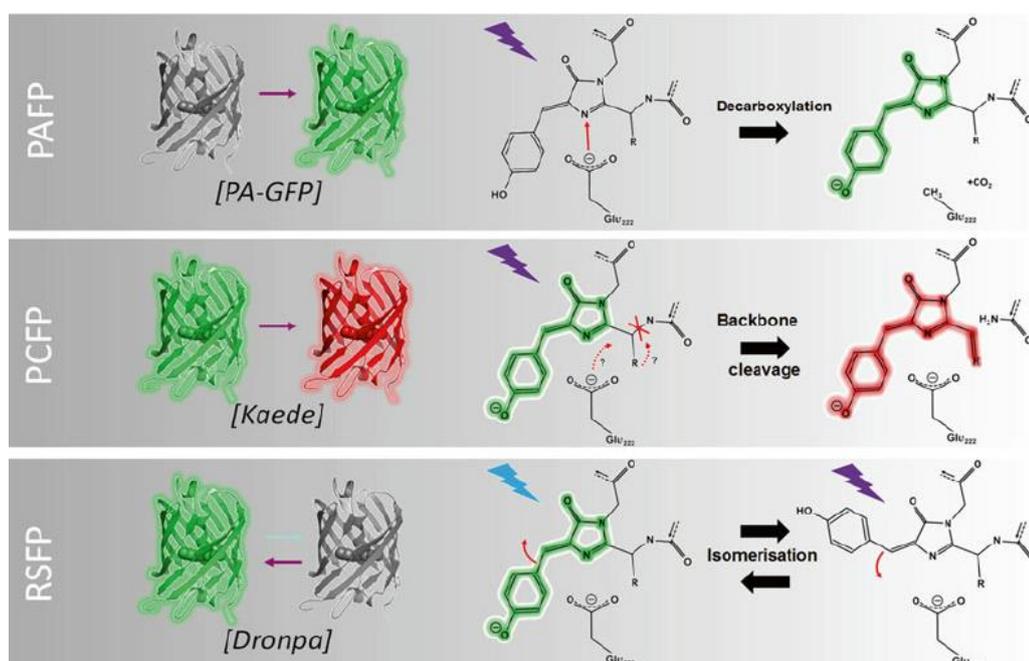


Рисунок 3. Возможные пути фототрансформации различных флуоресцентных белков [54].

В первых двух случаях трансформации сопровождаются изменением химических связей в белке, таким образом, они являются примерами фотохимической реакции, в то время как обратимое фотопереключение обусловлено *цис-транс* изомеризацией хромофора и изменением его протонированного состояния (фотофизический процесс).

1.2.1. Фотопереключение

Флуоресцентные белки, пребывающие изначально во флуоресцирующей форме и переключающиеся в темную форму, называются *отрицательно* переключаемыми, их антиподы, имеющие стабильное

нефлуоресцирующее состояние, – *положительно* переключаемыми. Реализация этого процесса может сильно отличаться при переходе от одного флуоресцентного белка к другому. К фотопереключению в той или иной степени склонны многие флуоресцентные белки, однако устойчивое темное состояние с продолжительным временем жизни свойственно для ограниченного числа белков [55]. Явление впервые было зарегистрировано для мутантной формы T203F GFP при наблюдении за флуоресценцией одиночных молекул [56]. Одним из первых фотопереключаемых флуоресцентных белков, получивших широкое распространение, стал белок Dronpa [57]. Явление отрицательного фотопереключения довольно часто встречается среди флуоресцентных белков, однако квантовая эффективность данного процесса не всегда значима и обычно много меньше 1 % [55].

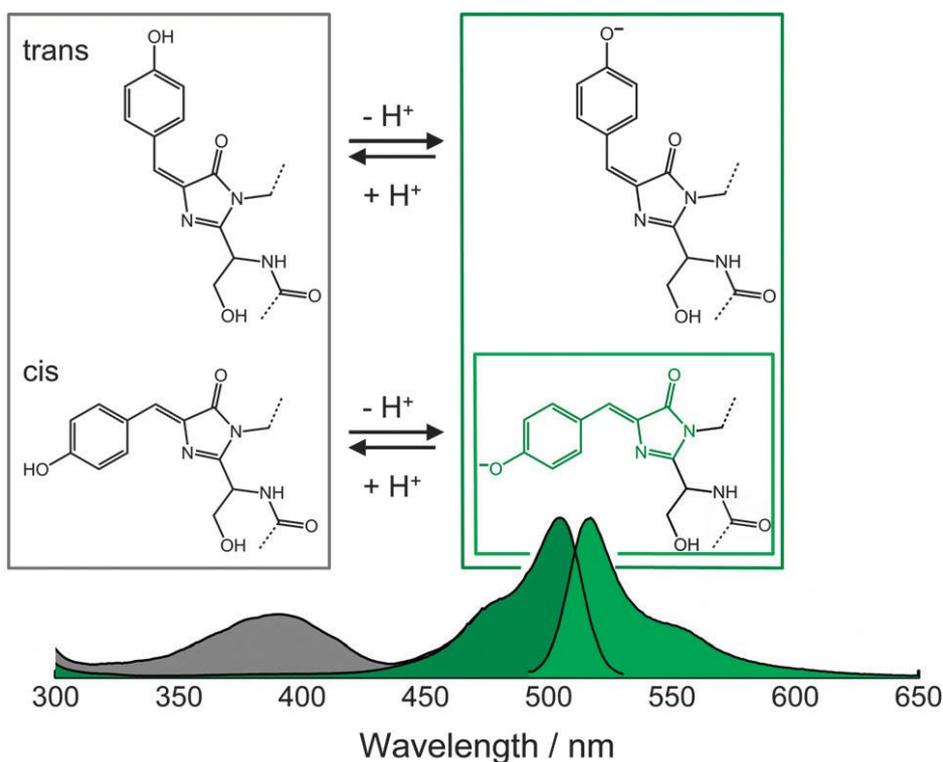


Рисунок 4. Изомерия хромофора GFP при фотопереключении и возможные варианты его протонирования. Флуоресцирует в данном случае только анионная *цис*-форма [58].

Цис-транс изомеризация и сопутствующее изменение протонированного состояния хромофора является одним из вариантов переключения в долгоживущее метастабильное состояние (Рисунок 4). Время жизни (время полупревращения) в таком состоянии может достигать

нескольких часов: Dronpa – 14 ч [59], IrisFP – 5,5 ч (зеленая форма) и 3,2 ч (красная форма) [60], mSAASoti – 50 мин (зеленая форма) [10]. Данный процесс зависит от окружения хромофора, возможности поворота фенольного кольца хромофора относительно метиленового мостика и стабилизации хромофора в метастабильном состоянии окружающими аминокислотными остатками.

Одним из объемных аминокислотных остатков в области хромофора, оказывающим непосредственное влияние на изомеризацию, является а.о. M159 (выравнивание и нумерация по последовательности GFP). Так, в случае флуоресцентного белка Dronpa замена данного остатка – M159T – привела к 1000-кратному увеличению скорости фотопереключения в нефлуоресцирующее состояние, при этом время термической релаксации во флуоресцирующее состояние от 14 ч до 30 секунд [59]. Фотоконвертируемые белки EosFP и Dendra2 также приобрели свойства фотопереключения при замене M159A [11], причем белок Dendra2 – только для зеленой формы. Для белка IrisFP при замене M159A аналогично получили четырехкратное ускорение фотоконверсии и пятикратное сокращение времени релаксации [61].

Такие флуоресцентные белки, которые одновременно сочетают в себе свойства фотоконверсии и фотопереключения, выделяют в группу *бифотохромных* белков. Первым был получен бифотохромный белок IrisFP [60] из фотоконвертируемого флуоресцентного белка EosFP путем замены объемного аминокислотного остатка в области хромофора (F173S), аналогичной заменой был получен бифотохромный белок NijiFP [11]. Основываясь на физико-химических характеристиках и эффективности фотопереключения, авторы отдали предпочтение для практического применения именно этой замене, а не M159A. Фотоконвертируемые белки EosFP и Dendra2 изначально также обладают свойством фотопереключения, однако квантовая эффективность данных процессов на 3-4 порядка ниже и сопоставима с фотодеструкцией.

При повороте фенольного кольца хромофора во время фотоизомеризации возможно изменение двух двугранных углов τ , φ (Рисунок 5). Теоретически изомеризация может происходить как при повороте вокруг связи, изменением только одного угла, так и благодаря более сложному движению – при одновременном изменении обоих углов. Предполагается, что в ограниченном пространстве бочонка наиболее выгодно одновременное изменение τ и φ , движение *hula-twist* [55].

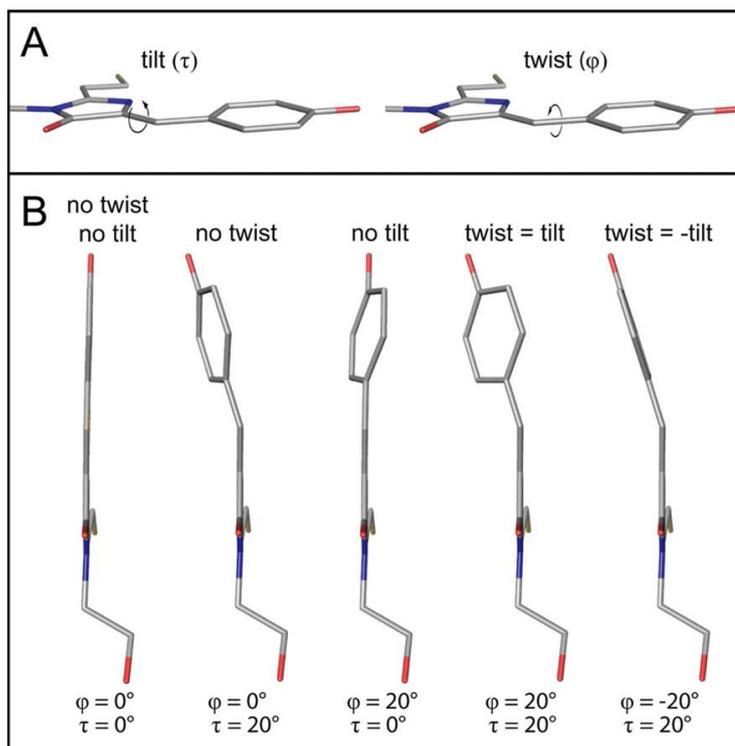


Рисунок 5. А) Введение двугранных углов для метиленового мостика. В) Возможные искажения в плоскости хромофора, значений двугранных углов при метиленовом мостике для фотоперключаемого флуоресцентного белка Padron 0.9 [62].

Причиной потери способности флуоресцировать может служить изменение величины константы кислотности хромофора (рКа) в *транс*-форме и сопутствующее протонирование [57]. Также причиной возникновения нефлуоресцирующего состояния может являться и отклонение фенольного кольца от исходной плоскости хромофора, которое влечет за собой выход кольца из сопряжения [55], что, вероятно, вызывает появление конического пересечения возбужденного и основного состояний, которое характерно для значительного отклонения хромофора от планарности [63]. Жесткость белковой глобулы играет значительную роль в появлении

нефлуоресцирующих состояний. В случае замены Y66F квантовый выход сильно изменяется при переходе от комнатной температуры (низкий квантовый выход) к температуре жидкого азота (тепловое движение значительно заторможено) [64]. Для искусственно синтезированных молекул хромофоров флуоресцентных белков также наблюдается значительное увеличение квантового выхода при изменении вязкости [65], но больший эффект дает фиксация *цис-транс* изомеризации с помощью дополнительных объемных заместителей [66]. При анализе квантовых выходов известных флуоресцентных белков установили, чем ближе значение углов τ , ϕ к 0, тем больше квантовый выход флуоресценции имеет белок [67].

Чаще всего для отрицательно фотопереключаемых белков исследовался переход из темного во флуоресцирующее состояние, так как данный переход характеризуется значительным квантовым выходом 0,37 против $3,2 \cdot 10^{-4}$ для прямого перехода [57]. Абсорбционной фемтосекундной спектроскопией, а также структурными методами удалось установить, что *транс-цис* изомеризация происходит в возбужденном состоянии и длится фемто-, пикосекунды для Dronpa [68], rseGFP2 [69]. В то время как перенос протона происходит в основном состоянии и может занимать более длительное время, вплоть до микросекунд, и сопровождается глобальной перестройкой водородных связей после значительных изменений в структуре β -бочонка в возбужденном состоянии [70].

Отдельно стоит выделить фотопереключение белка Dreiklang [8], нефлуоресцирующая форма которого образуется за счет гидратации хромофора, предположительно, гидратации подвергается имидазольное кольцо.

Положительно фотопереключаемый флуоресцентный белок asFP595 [37] был первым белком, у которого было обнаружено это свойство. В настоящее время более известна его мутированная форма A148G, получившая название KFP (Kindling Fluorescent Protein) [71]. Созревание белка идет с разрывом цепи, за счет чего образуется дополнительное π -сопряжение и

спектр белка лежит в красной области. Стабильное состояние KFP – анионная *транс*-форма. Рентгеноструктурные данные подтверждают непланарную структуру хромофора в нефлуоресцирующем состоянии [72].

Явление положительного фотопереключения довольно редкое. Оно наблюдается также у другого белка Padron. Флуоресцентный белок Padron был сконструирован из отрицательно фотопереключаемого белка Dronpa путем замен, стабилизирующих *транс*-форму новой системой водородных связей, и ключевого остатка M159Y, оказывающего стерическое влияние [73]. Нефлуоресцирующая форма – протонированный хромофор, *транс*-изомер. Интересно отметить, что следующая итерация в получении положительно фотопереключаемого белка (Padron0.9) отличается тем, что его нефлуоресцирующая форма *транс*-изомер депротонирована (Рисунок 5) и не флуоресцирует за счет искажения геометрии хромофора [62].

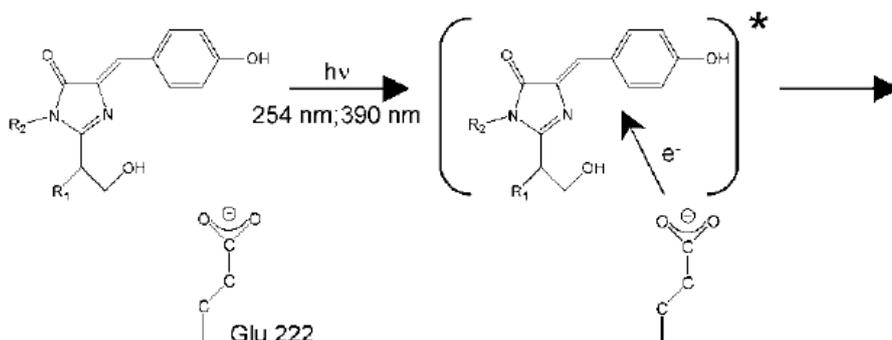
Помимо относительно устойчивых состояний, достигаемых за счет изомеризации хромофора, для флуоресцентных белков свойственны кратковременные (~мкс) переходы в темное состояние, называемое *мерцанием* (blinking). Данное явление впервые было также отмечено при наблюдении за флуоресценцией единичных молекул eGFP [56]. Причина мерцания может на миллисекундной временной шкале может быть связана с переходами в триплетное состояние, как это предполагается в работе [74]. Время жизни таких состояний сильно зависит от парциального давления кислорода, но даже в его присутствии является довольно продолжительным (10-40 мкс) относительно свободных флуорофоров в растворителе, что может быть связано с особую роль β -бочонка, поддерживающего микроокружение хромофора.

Другая природа короткоживущих нефлуоресцирующих состояний может быть связана с образованием реакционных интермедиатов с переносом электрона в возбужденном состоянии, что приводит к размыканию сопряжения. Не получив дальнейшего развития реакции, хромофор возвращается в исходное состояние [75].

Мерцание флуоресцентных белков является одним из источников накопления ошибок в методе PALM (PhotoActivated Localisation Microscopy, фотоактивационной локализационной микроскопии), так как одна молекула детектируется более одного раза. Для нивелирования этого эффекта были предложены методы принудительного перехода в флуоресцирующее состояние [76]. С другой стороны, это явление основа другого, более быстрого метода микроскопии сверхвысокого разрешения, – SOFI (Stochastic Optical Fluctuation Imaging, метод стохастических оптических флуктуаций) [77].

1.2.2. Фотоактивация

Фотоактивацию впервые обнаружили для avGFP. Как уже говорилось ранее, хромофор дикого типа GFP претерпевает перенос протона в возбужденном состоянии при возбуждении светом длиной волны 400 нм. При облучении на той же длине волны было отмечено увеличение доли стабильной анионной формы хромофора, которая сохраняется продолжительное время, и увеличение интенсивности флуоресценции при возбуждении светом ~480 нм [2]. Это явление, как было установлено позднее [78], связано с декарбоксилированием остатка E222, протекающим под воздействием света, и последующим смещением рКа хромофора (Рисунок 6). Было также установлено, что эффективность фотопревращения увеличивается с уменьшением длины волны (254 нм > 280 нм > 400 нм ...), поэтому предполагается, что данный процесс связан с переносом электрона в возбужденном состоянии на более высоких возбужденных уровнях от аминокислотного остатка глутамата 222 к хромофору.



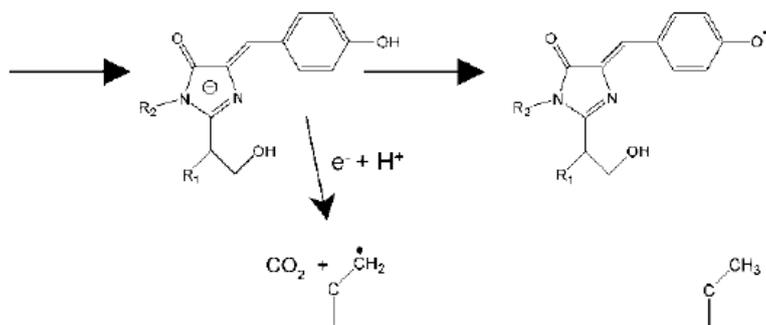


Рисунок 6. Предполагаемый механизм фотоактивации GFP, связанный с переносом электрона в возбужденном состоянии от Glu 22 к хромофору согласно [78].

Далее, путем сайт-направленного мутагенеза, при замене T203N варианта *weGFP* удалось сместить рКа хромофора в область высоких значений рН и получить преимущественно протонированную форму хромофора в физиологических значениях рН $\sim 7,5$ [79]. Получившийся флуоресцентный белок, который был назван *paGFP* (PhotoActivated), сохранил свойство фотохимического декарбоксилирования, а контраст при возбуждении флуоресценции на длине волны ~ 480 нм был значительно увеличен за счет отсутствия анионной формы хромофора в растворе.

Для расширения спектрального диапазона фотоактивируемых флуоресцентных белков с целью использования нескольких меток в одном исследуемом объекте также были получены красные фотоактивируемые белки. Первым красным фотоактивируемым флуоресцентным белком стал *RAmCherry* [80]. Авторы проанализировали нефлуоресцирующие в состоянии покоя красные флуоресцентные белки естественного происхождения или полученные в результате случайного мутагенеза и определили аминокислотные остатки, которые отличают такие белки. Остатки в положениях 148, 165, 167, 203 (нумерация по выравниванию с GFP) были выбраны для случайных замен. Полученные слабые свойства фотоактивации были усилены благодаря еще одному циклу случайного мутагенеза уже по всей последовательности. По аналогичной схеме был получен *PATagRFP* [81]. Однако, фотоактивация этого белка не связана с декарбоксилированием

остатка глутамата. Было установлено, что метиленовый мостик у фенольного кольца образуется только при окислении под воздействием света.

В случае белка PAmKate [82] несмотря на подобную схему получения фотоактивируемого варианта, механизм фотоактивации скорее связан с устойчивым изменением протонированного состояния. Такой вывод был сделан на основании спектральных данных, других исследований в этом направлении не проводилось.

1.2.3. Фотоконверсия

Фотоконверсия из зеленой в красную форму впервые была обнаружена для GFP и его мутантных форм в анаэробных условиях при облучении светом длиной волны 480 нм [83], затем и в кислородных условиях в присутствии веществ-акцепторов электронов [84]. Известно, что данный процесс связан с последовательным переносом двух электронов от хромофора к акцептору, но природа процесса до конца не ясна, а явление получило название реддинг (redding).

Явление фотоконверсии под действием фиолетового света для флуоресцентных белков, содержащих в хромофор-образующей триаде остаток гистидина на первом месте, было обнаружено впервые для белка Kaede [85]. Известно небольшое число таких белков природного происхождения: Kaede, EosFP [86], dendFP [87], SAASoti [9]. Последовательность хромофора (-NYG-) для них консервативна. Было показано, что возможно создание подобных фотоконвертируемых флуоресцентных белков путем замены первого аминокислотного остатка хромофора на гистидин [88, 89, 90], этот остаток играет ключевую роль при фотоконверсии хромофора. Фотоконверсия таких белков из зеленой в красную форму происходит при облучении на длине волны $\lambda=400$ нм, то есть в области поглощения протонированной формы хромофора, которая и претерпевает превращения. В результате фотохимической реакции происходит разрыв связи между α -атомами азота и углерода гистидина и образование новой двойной связи между α - и β -атомами

углерода (Рисунок 7). В процессе фотоконверсии, вероятно, важную роль в переносе протона имеют аминокислотные остатки H193 и E211. Расширение сопряженной π -системы за счет новой двойной связи смещает спектр хромофора в красную область [91].

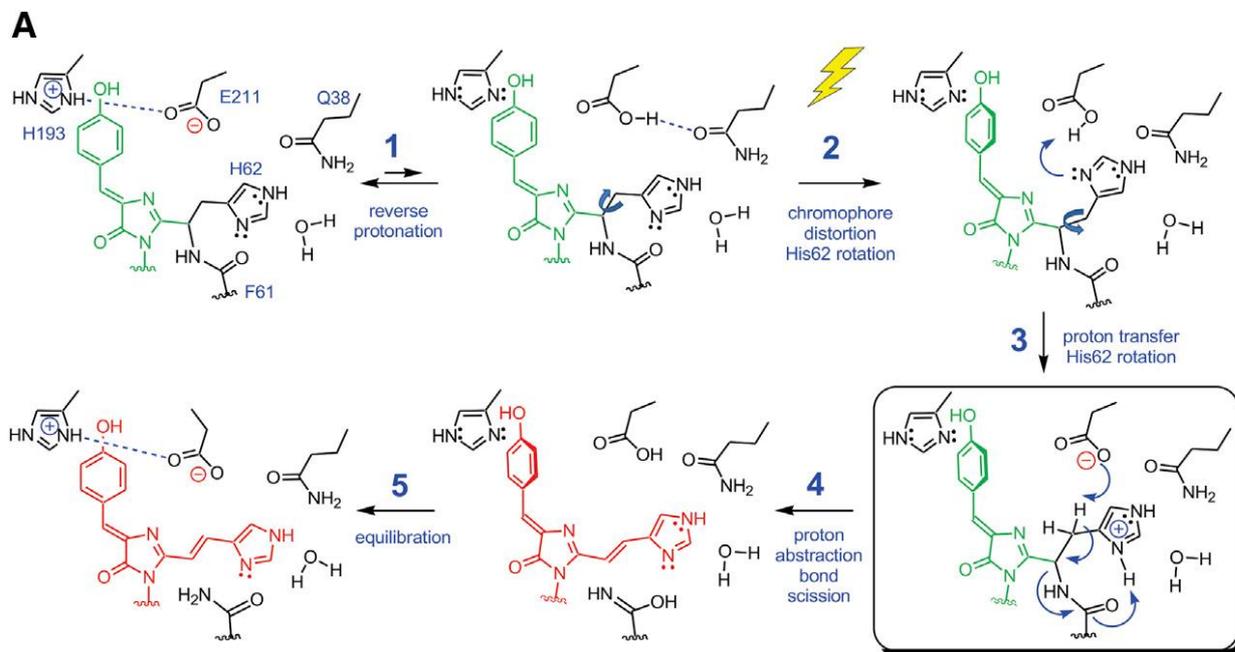


Рисунок 7. Механизм фотоконверсии Kaede-подобных флуоресцентных белков, предложенный в работе [91].

Свойство фотоконверсии с разрывом пептидной цепи было искусственно получено и в оранжевых флуоресцентных белках семейства DsRed, производных оранжевого флуоресцентного белка mOrange – PSmOrange [92], PSmOrange2 [93]. Хромофор в этих белках представлен последовательностью -TYG-, а поиск свойств фотоконверсии велся с помощью метода случайного мутагенеза. Стоит отметить, что в результате конверсии происходит значительный сдвиг эмиссии от 565 нм в дальнюю красную область с максимумом 662 нм.

Некоторые красные флуоресцентные белки также способны к фотоконверсии, однако со сдвигом в зеленую область. Такие данные были получены для mKate, mTagRFP и подобных при двухфотонном возбуждении в клетках млекопитающих [94], однако механизм данного явления не изучался, и оно наблюдалось лишь в живых клетках.

1.2.4. Фотодеструкция

Стабильный флуоресцентный сигнал – важная характеристика флуоресцентных белков, которая определяет выбор метки в методах флуоресцентной микроскопии. Фотопревращения хромофора и его окружения, которые приводят к частичной или полной потере флуоресценции, называют фотодеструкцией (photobleaching, photofatigue). Причиной тому являются окислительно-восстановительные реакции, которые происходят за счет переноса электрона в возбужденном состоянии. Перенос электрона хромофора возможен напрямую от донора к акцептору, когда молекула мала и может проникнуть внутрь β -бочонка. Флуоресцентный белок YFP чувствителен к галогенид-ионам в растворе [95], которые могут проникать внутрь бочонка [96]. Кислород также способен проникать внутрь бочонка. От кислорода зависит последний этап созревания хромофора, окислительное дегидрирование [3]. В случае флуоресцентного белка KillerRed, известного свойствами фотосенсибилизатора [7], вероятно, активные формы кислорода, образующиеся вблизи хромофора, диффундируют через этот канал из объема внутри β -бочонка и являются причиной гибели клеток (Рисунок 8). Фотостабильность подобных белков выше в бескислородных условиях.

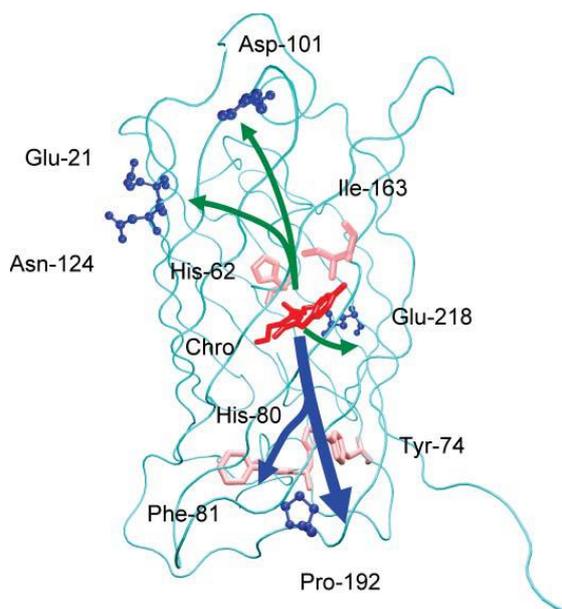


Рисунок 8. Вероятные пути выхода активных форм кислорода KillerRed, согласно данным компьютерного моделирования [97].

Подробно была изучена фотодеструкция бифотохромного флуоресцентного белка IrisFP [98], с применением кристаллографии и абсорбционной спектроскопии с высоким временным разрешением. По изменению распределений электронной плотности в кристалле белка IrisFP было установлено, что при фотодеструкции происходят изменения гибридизации орбиталей для атома углерода в метеновом мостике с sp^2 на sp^3 , что говорит о протекании окислительно-восстановительной реакции и является причиной размыкания сопряжения и «фотоусталости» при больших мощностях облучения. В отсутствие кислорода при больших мощностях облучения также наблюдается декарбоксилирование остатка E212 (при наложении структуры белка eGFP и IrisFP E212 совпадает с остатком E222 для eGFP, который подвергается декарбоксилированию).

При малых значениях мощности облучающего света появляются процессы, сопряжённые с окислением кислородом [98]. Окисление консервативного остатка M159 и располагающегося вблизи хромофора остатка цистеина C171 ведут к уменьшению интенсивности флуоресценции белка IrisFP, рКа хромофора сильно смещается в область высоких значений рН [98]. Замена M159A приводит к заметному увеличению его фотостабильности [61]. Также это подтверждается для производных белков EosFP и Dendra2, в которых эта замена привела к появлению обратимого фотопереключения [12]. Причиной потери флуоресценции в данном случае, скорее всего, является изменение рКа хромофора, за счет образования водородной связи с сульфоксиметионином [99].

Наличие легко вступающих в окислительно-восстановительные реакции остатков цистеина неоднозначно влияет на фотостабильность флуоресцентных белков. Флуоресценция многих бесцистеиновых производных [100], [101] стала менее стабильна, чем их предшественников. Кроме того, известно увеличение стабильности флуоресценции красных белков из семейства DsRed при замене серина в области хромофора на цистеин S146C за счет окисления цистеина до сульфоксицистеина при облучении

возбуждающим светом. Сульфоксидная группа создает сильный отрицательный заряд близко к фенольному атому кислорода хромофора в *цис*-форме. Замены S146 на аминокислотные остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот не привели к подобному эффекту [102].

С большими молекулами фотоиндуцированный перенос электрона может осуществляться через «посредников». Обычно в качестве переносчиков электронов выступают π -сопряженные системы, например, аминокислотные остатки гистидина, тирозина, фенилаланина и триптофана. Таким образом, возможно окисление больших молекул, которые находятся снаружи β -бочонка, например, в клетке или растворе. Это предположение подтверждается значительным увеличением фотостабильности при замене остатка Y145 на менее сильные акцепторы электронов в eYFP [103], где хромофор взаимодействует как минимум с двумя остатками тирозина.

1.3. Практическое применение явления фотопревращения

Наиболее простым методом, использующим фотопревращения, является наблюдение за восстановлением флуоресценции после фотодеструкции в определенной области за счет диффузии в эту область меченных молекул (FRAP – Fluorescence Recovery After Photobleaching) [104]. Флуоресцентные белки подвергаются фотодеструкции при коротких вспышках большой мощности, которые не наносят существенного вреда клеткам. Такой метод можно использовать для любых широко распространенных флуоресцентных белков [105]. Впервые использование свойства фотоактивации для слежения за перемещением белковых структур внутри клетки было предложено вскоре после начала использования гена флуоресцентного белка GFP [106]. Этот метод позволил проводить оценку коэффициентов диффузии меченных молекул по изменению сигнала интенсивности флуоресценции после точечной активации метки в области активации.

По аналогии можно использовать свойство фотоконверсии из зеленой в красную форму [85]. Преимуществами данного метода является то, что за

неактивированной формой можно наблюдать изначально, а активированные молекулы отличаются спектрально и наблюдаются в другом флуоресцентном канале, таким образом, можно одновременно следить за изменениями, происходящими с обоими формами. Современная вариация метода позволяет наблюдать за единичными активированными молекулами в клетке и наблюдать за процессами перестройки белковых структур на молекулярном уровне [107].

Свойства фотопревращений можно использовать для регуляции концентрации метки во флуоресцентных методах, чувствительных к избыточным количествам флуоресцентных молекул. На таких принципах основаны все методы регистрации одиночных флуорофоров, методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения, методы флуоресцентной корреляционной спектроскопии и пр. Эти методы объединяет то, что дифракционный предел в видимой области излучения ограничивает оптическое разрешение размерами светового пятна от точечного источника света порядка ~ 200 нм при применении обычной широкопольной оптики. Учитывая, что размер глобулы флуоресцентного белка 3×4 нм [16], [25], в такое световое пятно могут укладываться десятки флуоресцентных белков. Чтобы наблюдать за поведением единичных молекул, необходимо чтобы светились только отдельные флуорофоры, но не все сразу, и контролировать это активацией-деактивацией нужного количества молекул.

Первые наблюдения за единичными молекулами флуоресцентных белков велись именно для малых концентраций белков, фиксированных в матрицу геля [56]. Нобелевскому лауреату Штефану Хеллу принадлежит идея «оставить» светиться единичные молекулы в окружении множества флуорофоров. В методах STED [4] и RESOLFT [108] молекулы вокруг интересующей точки принудительно переводятся в нефлуоресцирующее состояние стимулированной эмиссией или фотопереключением в нефлуоресцирующее состояние, что позволяет, таким образом, наблюдать за

единичными флуорофорами в фокусе и получать изображение с разрешением до единиц нанометров.

На Рисунке 9 представлено несколько наиболее важных концепций, связанных с получением изображений со сверхразрешением с использованием методов RESOLFT.

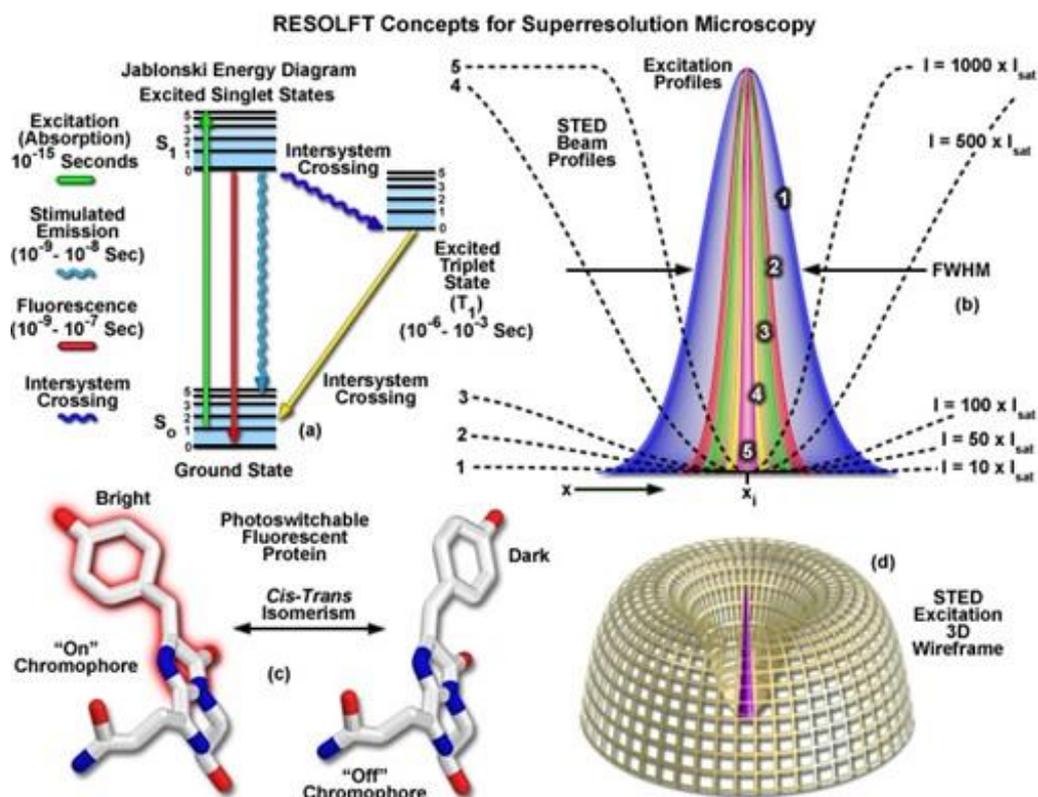


Рисунок 9. Концепция метода STED для супер-разрешающей микроскопии. (<https://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/superresolution/resolft/indexflash.html>). Такая же оптическая схема может быть применена и в методе RESOLFT.

Упрощенная энергетическая диаграмма Яблонского изображает возможные электронные основные и возбужденные состояния, связанные с обратимыми оптическими переходами «включение-выключение», такими как *цис-транс*-изомерия, связанная с фотопереключаемыми флуоресцентными белками (как показано для флуоресцентного белка KFP). Профили 1-5 истощающего лазера (пунктирные линии) на Рисунке 9 выделяют пространственную область, в которой флуорофор существует в состоянии А (или в состоянии "включено") в областях, где стоячая волна истощающего света демонстрирует интенсивность, в 10 (профиль 1) и 1000 (профиль 5) раз превышающую интенсивность насыщения (как показано на рисунке в

уравнении (1)) и нулевой узел в точке x_i . По мере увеличения интенсивности истощающего лазера область, в которой флуорофор способен находиться в состоянии A, уменьшается, что приводит к последующему увеличению бокового разрешения. Трехмерное каркасное представление (Рисунок 9, d) профилей истощения и возбуждения лазера иллюстрирует модификацию функции распределения точек методом RESOLFT.

Альтернативой являются локализационные методы. В таких методах изображение регистрируется полностью, а флуорофоры активируются случайным образом в реакциях фотоактивации, фотоконверсии и фотопереключения в методе PALM [5]. Данные методы позволяют достичь также десятикратного увеличения разрешения, однако отличаются меньшей скоростью получения изображения, но в то же время требуют меньших световых доз. Еще один метод локализационной микроскопии – метод SOFI [77], однако, его особенностью является анализ флуктуаций кратковременного характера, связанных с мерцанием, фотопереключением метки, этот метод не требует полного отсутствия флуоресцирующих частиц вокруг анализируемой, больший упор делается на математический анализ флуктуаций интенсивностей. Данный метод выигрывает в скорости получения изображения, однако его разрешение хуже при большой плотности флуорофоров.

В работе [107] получили мономерный вариант бифотохромного белка IrisFP – mIrisFP – и показали его применение в методе Pulse Chase в комбинации с супер-разрешающей микроскопией PALM. Изучаемые белки экспрессируются с белком mIrisFP в единой рамке считывания в живых клетках. На первом этапе получают изображение со сверхразрешением путем регистрации множества кадров, каждый из которых содержит несколько флуоресцентных молекул. Затем субпопуляция молекул IrisFP фотоконвертируется в красную форму путем облучения определенной области клетки импульсом фиолетового света (“pulse”, импульс), после чего изучают миграцию меченых белков из области конверсии по локализации белков в

других областях клетки (“chase”, погоня), например, с помощью протокола PALM, но уже с использованием способности красной формы к обратимому фотопереключению.

Метод *флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS)* позволяет определять коэффициент диффузии флуорофоров в фокальном объеме за счет анализа флуктуаций сигнала. Поэтому для адекватной работы метода в фокальном объеме должно находиться не более нескольких единиц флуоресцирующих молекул. В живых организмах регуляция экспрессии введенных генов требует больших усилий, поэтому применение фотоактивируемых [109] и фотоконвертируемых [110] флуоресцентных белков позволяет контролировать концентрацию и расширить возможности применения данного метода в живых системах.

1.4. Бесцистеиновые флуоресцентные белки

Как отмечалось выше, аминокислотные остатки цистеинов легко вступают в окислительно-восстановительные реакции с образованием окси-производных, внутри и межмолекулярных дисульфидных мостиков. Это свойство может негативно сказываться при использовании флуоресцентных белков в слитых конструкциях, так как при этом увеличивается вероятность побочных взаимодействий. Также это ограничивает экспрессию флуоресцентных белков в компартментах с окислительной средой, таких как ЭПР, периплазма бактерий [111]. При создании конструкции, способной к экстравазии, созревание белка происходит в ЭПР, где за счет окислительного окружения возможно неспецифическое образование дисульфидных связей до правильного фолдинга флуоресцентного белка, что может приводить к образованию случайных агрегатов и неправильному сворачиванию (Рисунок 10). Это было продемонстрировано при исследовании экстравазии eGFP, содержащем сигнальную последовательность $\alpha 1$ -антитрипсина. Лизаты клеток содержали ковалентно сшитые олигомеры eGFP, разрушающиеся при

добавлении дитиотреитола [112]. Также eGFP образует подобные олигомеры в периплазме *E. coli* [111].

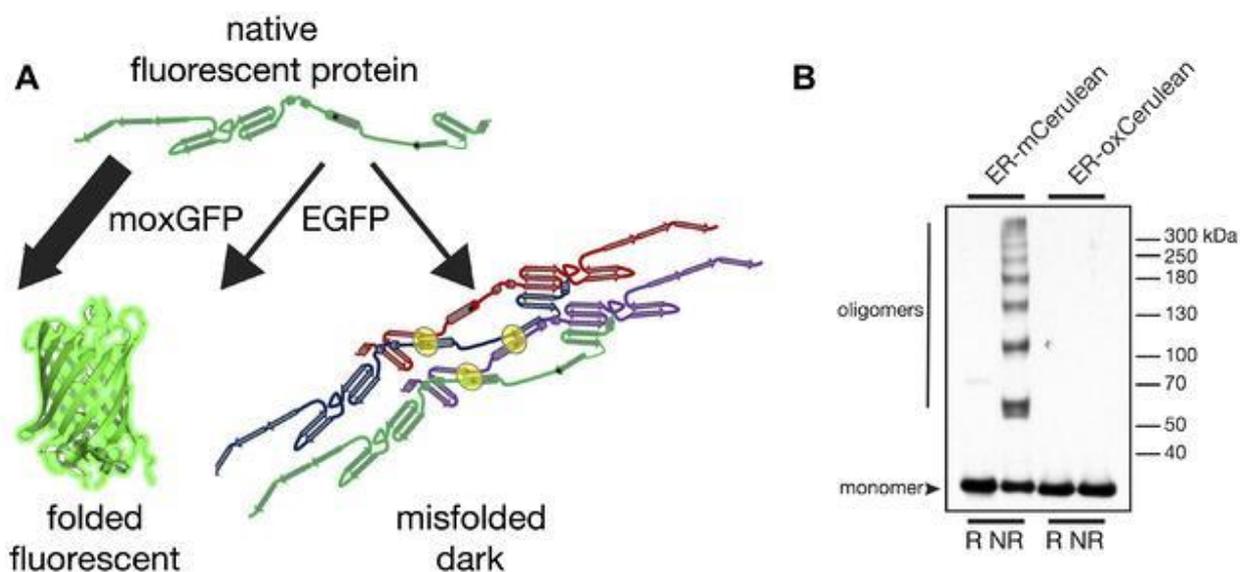


Рисунок 10. А) Образование агрегатов флуоресцентных белков при сворачивании в окислительных условиях за счет образования дисульфидных мостиков. В) Блот денатурирующего электрофореза лизатов клеток млекопитающих, экспрессирующих флуоресцентный белок mCerulean и его бесцистеиновое производное oxCerulean в ЭПР, который показывает наличие агрегатов mCerulean без добавления восстановителя [112].

Наименьшее число цистеинов в первичной последовательности свойственно для белков семейства DsRed, дикий тип которого содержит только один остаток цистеина [34], а его мономеризованный вариант – mRFP1 [113] – не содержит их совсем, как и его множественные производные, включая mCherry [114]. Красные флуоресцентные белки mCherry и mRFP1 за счет отсутствия цистеинов беспрепятственно созревают и в периплазме бактерий [115], и в ЭПР клеток млекопитающих [111].

GFP имеет только два остатка цистеина в последовательности – С48 и С70, боковые цепи которых направлены «внутри» β -бочонка. Первые попытки получить секретируемые бесцистеиновые производные eGFP не были успешны, двойная замена привела к потере флуоресценции, а единичные замены сохраняли свойство димеризоваться до полного сворачивания, а их экскреция наблюдалась при дополнительной стимуляции [116]. Данный опыт показывает, что рациональный подход к заменам аминокислотных остатков иногда влечет неконтролируемое изменение других свойств флуоресцентных

белков, не всегда отвечающих желаемым результатом. Для его более яркого аналога – SGFP2 – была получена форма C48S/C70M, которая успешно сворачивается в окислительных условиях [112]. Альтернативным подходом замены цистеинов было предложено использование «быстрозревающего» (SuperFolder) производного GFP – sfGFP [111], сопряженного с оптимизированным сигналом экстравазии, что позволило белку сворачиваться быстрее, чем происходит образование нежелательных химических связей. Результатом тенденции получения подобных *ox* (устойчивых к окислению) и *mox* (мономерных и устойчивых к окислению) флуоресцентных белков стала целая палитра бесцистеиновых производных:

secBFP2 – замены C29A/C118S позволили создать экскретируемую версию белка mTagBFP, однако фотостабильность под воздействием возбуждающего света стала ниже [100].

oxBFP – новая версия EBFP2, сравнимая с исходным по яркости, полученная путем замен C48S/C70V/V163A, обладает также меньшей стабильностью. Теми же методами были получены производные флуоресцентных белков Cerulean, Venus, sfGFP, NeonGreen [101].

moxDendra2 – N41Q/C101A/C113T/C171A/N200Q вариант фотоконвертируемого белка Dendra2. В ходе работы были оптимизированы замены остатков цистеинов и исключены сайты гликозилирования. Превосходит по яркости, равный по стабильности и эффективности фотоконверсии предшественнику [117].

moxMaple3 – провели замены C110V/N111Q/C180A/N227D в фотоконвертируемом белке mMaple3. В 2 раза более яркий и со сравнимой фотостабильностью [118].

1.5. Моделирование процессов фотопревращений

Как можно видеть из приведенных выше данных, флуоресцентные белки имеют множественные возможности фотопревращений. Сценарии протекания того или иного процесса обуславливаются не столько природой самого

хромофора, сколько его множественными взаимодействиями со структурой бочонка и как эта структура изменяется во времени.

Молекулярно-динамические траектории длиной порядка микросекунд позволяют наблюдать состояния с разными системами водородных связей [119], по-видимому, характеризующихся различными фотофизическими свойствами. Наличие состояний разного типа объясняет наблюдаемые темные и светлые состояния молекулы в режиме детекции одиночных молекул [56].

С другой стороны, фотопереключение, которое включает в себя *цис-транс* изомеризацию в возбужденном электронном состоянии занимает фемто- и пикосекунды. Такие изменения в хромофоре KFP происходят довольно быстро [63]. При этом процессы термической релаксации из *цис* состояния происходят достаточно медленно, энергетические профили таких переходов и соответствующие им константы скорости рассчитаны для KFP и asFP595 методами молекулярной динамики с потенциалами КМ/ММ [120].

Поиск структурно-динамических индикаторов эффективности фотопереключения был проведен авторами работы [121]. Для этого проводился расчет молекулярно-динамических траекторий для светлого и темного состояний одного и того же белка и полученные траектории объединялись. После этого проводился анализ функциональных мод, по сути, определяющий области белка, в которых движения в темном и светлом состояниях больше всего различаются между собой. Также в качестве критерия ранжирования белков использовалась подвижность остатков. В результате было установлено, что для разных фотопереключаемых белков группы аминокислотных остатков, участвующих в фотопереключении, могут значительно отличаться. Поэтому на данный момент нет определенной стратегии получения наиболее перспективных мутантных форм белков

1.6. Объект исследования

Объектом исследования является флуоресцентный белок SAASoti, выделенный из коралла *Stylocoeniella armata* (Рисунок 11) [9]. Тогда же было обнаружено, что SAASoti способен переходить из зеленой флуоресцентной формы в красную под действием фиолетового света ($\lambda_{ex}=400$ нм). Хромофор SAASoti формируется за счет аминокислотных остатков –NYG–, а фотоконверсия протекает при облучении светом $\lambda=400$ нм по типу белка Kaede [85] с разрывом пептидной цепи.



Рисунок 11. Изображение коралла *Stylocoeniella armata*, обнаруженного вблизи острова Оти (Австралия) Большого Барьерного рифа [9].

Флуоресцентные белки, обнаруженные у кораллов, обычно формируют тетрамеры и агрегаты большей молекулярной массы, поэтому ранее в лаборатории была проведена работа по получению стабильной мономерной формы белка SAASoti, что является необходимым условием для использования флуоресцентного белка в качестве флуоресцентной метки [10]. Важно отметить, что для разрушения интерфейса взаимодействий между субъединицами в случае белка SAASoti потребовалось введение всего лишь одной точечной замены аминокислотного остатка – V127T, что является редким исключением для решения подобной задачи. Также данная замена не привела к изменению спектральных и флуоресцентных характеристик белка, поэтому в дальнейшем речь будет идти именно о мономерной форме SAASoti – V127T SAASoti или mSAASoti. В работе [10] продемонстрирована возможность использования mSAASoti в одном из методов микроскопии сверхразрешения – PALM. К моменту начала выполнения данной работы кристаллическая структура mSAASoti не была получена, однако была создана

3D-модель тетрамера на основании структуры фотоконвертируемого белка Kaede [122] (Рисунок 12).

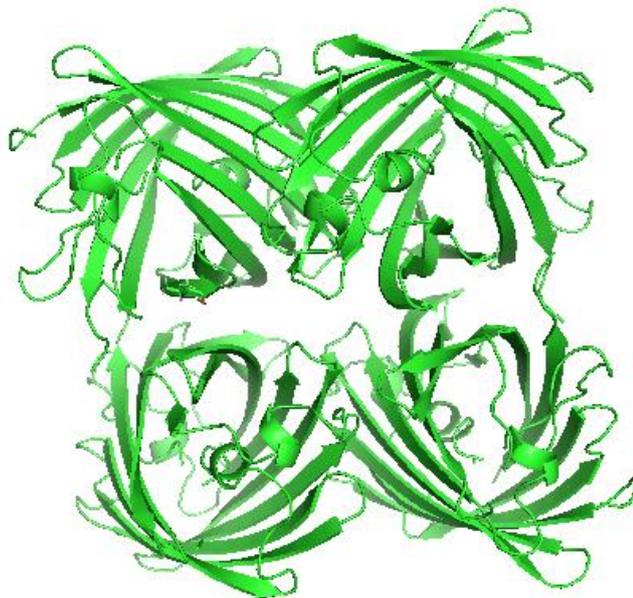


Рисунок 12. 3D-модель структуры тетрамера SAASoti, созданная на основе разрешенной структуры гомологичного фотоконвертируемого флуоресцентного белка Kaede [122] (PDB-код: 2GW3).

Также при изучении физико-химических свойств белка mSAASoti было обнаружено [11], что его зеленая форма способна обратимо переходить в темное состояние при длительном (10 минут) облучении синим светом ($\lambda=470$ нм), причем образующееся конформационное состояние хромофора является менее энергетически выгодным. Регенерация зеленой флуоресцентной формы происходит как благодаря термической релаксации (занимает часы), так и путем облучения светом $\lambda_{ex}=400$ нм (за несколько секунд). Таким образом, mSAASoti является *бифотохромным* флуоресцентным белком, так как сочетает в себе свойства необратимой фотоконверсии и обратимого фотопереключения. Бифотохромные белки IrisFP [60] и NijiFP [12] были получены путем введения замены F173S в фотоконвертируемых белках EosFP и Dendra2, соответственно. Также можно изначально фотопереключаемый белок «превратить» еще и в фотоконвертируемый введением замены первого аминокислотного остатка в хромофор-образующей триаде на гистидин, как это было сделано на примере белка Dronpa [57].

В отличие от хорошо изученного бифотохромного белка IrisFP [60], красная форма mSAASoti неспособна обратимо переходить в выключенное состояние [123], и при ее длительном облучении светом $\lambda_{ex}=550$ нм происходит необратимая фотодеструкция. Однако, удалось подобрать условия, при которых наблюдается частичное переключение красной формы с очень быстрым временем релаксации ($\tau_{1/2}=10$ минут) [123]. Для этого предварительно нужно «потушить» зеленую форму светом $\lambda_{ex}=470$ нм (10 минут), затем фотоконвертировать образец светом $\lambda_{ex}=400$ нм, после чего облучать зеленым светом $\lambda_{ex}=550$ нм. Наиболее вероятно, первая стадия сопровождается фотохимической реакцией, которая в дальнейшем способствует конформационной подвижности хромофора красной формы и его обратимому фотопереключению под действием зеленого света. Методом масс-спектрометрии было показано [123], что полученный таким способом образец mSAASoti содержит примесь белка с окисленным остатком метионина в положении 163, что наблюдали ранее на примере белка IrisFP [60]. Важно подчеркнуть уникальность белка SAASoti, ведь к настоящему времени данный белок является единственным *бифотохромным* флуоресцентным белком дикого типа, в то время как все остальные описанные бифотохромные белки были получены введением замен аминокислотных остатков в области микроокружения хромофора (Таблица П1). Поэтому получение мутантных форм SAASoti, содержащих замены M163 и F177 является интересной задачей как с точки зрения изучения механизма обратимого фотопереключения, так и для получения форм белка mSAASoti с улучшенными кинетическими параметрами данного процесса.

Как уже говорилось ранее, к настоящему моменту не получена кристаллическая структура белка SAASoti. Как следует из данных эксклюзионной хроматографии [10], в растворах с повышенной концентрацией белка mSAASoti наблюдается примесь димерной формы. Этот факт будет препятствовать процессу кристаллизации. При добавлении восстанавливающего агента дитиотреитола (10 мМ) к раствору белка и в

буферную систему (эксклюзионная хроматография) примесь димеров SAASoti полностью исчезает. После анализа первичной и третичной структуры модели SAASoti было установлено, что SH-группы трех остатков цистеина– C21, C71 и C117 – экспонированы на поверхность β -бочонка, в то время как остатки C105 и C175 находятся внутри него. Примечательно, что выравнивание первичной последовательности белка mSAASoti и других гомологичных белков выявило, что в позиции 21 (нумерация по первичной последовательности SAASoti) только в случае SAASoti находится остаток цистеина.

Наличие реакционноспособных остатков как на поверхности белковой глобулы, так и вблизи хромофора может ограничить его использование в качестве флуоресцентной метки при решении различных задач.

* * *

Флуоресцентный белок SAASoti выделяется среди фотоактивируемых белков особенностью своих фотопревращений. Как любой белок дикого типа, SAASoti требует поиска новых производных с улучшенными параметрами флуоресценции, скоростью фотопревращений, повышенной стабильностью, скоростью созревания и пр. На сегодняшний день накоплен огромный опыт получения мутантных форм флуоресцентных белков с заданными свойствами. Однако, как можно видеть из изложенного выше, множество рациональных замен а.о. в случае новых генов могут приводить к непредсказуемым результатам (отсутствие созревания, снижение яркости и т.д.), а изменения в давно известных и хорошо изученных белках, таких как GFP, – открывать новые, индуцированные светом превращения.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Реактивы и материалы

Реактивы: агар (Thermo Scientific, США); агароза (Biotechnology Grade, VWR Life Science); акриламид (AppliChem, Германия); N,N'-метилен-бис-акриламид (Bio-Rad, США); Ni-NTA Agarose (Qiagen, Германия), додецилсульфат натрия (Serva, Германия); ДНК-маркер (GeneRuler 1kb DNA Ladder, 0,5 mg/ml, Fermentas); дитиотреитол, ДТТ (Thermo Scientific, США); дрожжевой экстракт (USBiological, США); персульфат аммония (AppliChem, Германия); 1,4-пиперазин-диэтансульфоновая кислота, PIPES (AppliChem, Германия); PageBlue™ Protein Staining Solution (Thermo Scientific, США); сульфат аммония (Amresco, США); Тетраметилэтилендиамин, TEMED (Bio-Rad, США); трис(гидроксиметил)-аминометан (TRIS) гидрохлорид (AppliChem); триптон (Amresco, США); хлорид натрия (USBiological, ХЧ), хлорид магния (ДиаМ, Германия, ч.д.а.); хлорид кальция 2-водный (AppliChem, Германия); натрий фосфат однозамещенный моногидрат (Amresco, США); натрий фосфат двузамещенный гептагидрат (Amresco, США); фенилметилсульфонил фторида PMSF (Диаэм); ЭДТА (MP Biomedicals, Германия); Этидиум бромид (AppliChem, Германия).

Ферменты: ДНКаза I (1 ед/мкл, Thermo FS), ДНК-полимеразы: Pfu термостабильная (5 ед/мкл, Диаэм), Taq ДНК-полимераза (ООО «Евроген»), Taq SE (ДНК-полимераза), эндонуклеазы рестрикции: NdeI, 20 000 ед/мл (New England Biolabs), EcoRI, 10 е.а./мкл (Thermo FS), XbaI (Thermo FS), HindIII, 100000 е.а./мл (SinEnzyme), T4 ДНК-лигаза, 5 ед/мкл (Thermo FS).

Клеточные линии *E.coli* BL21(DE3) (для наработки рекомбинантных белков) и *E.coli* DH5α (для наработки плазмидной ДНК) были получены от с.н.с., к.б.н. Ивашиной Т. В. (ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина). Клеточная линия HeLa Kyoto была получена от к.б.н. Богданова А. М. (Государственный Научный Центр

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук).

Таблица 1. Полученные генетические конструкции

Генетическая конструкция	Первичная структура
pET22b C21N-mSAASoti-Cend	MALSKQYIPDDMELIFHMDGNVNGHYFTIVATGKAKPYEGKQNLKATV TKGAPLPFSTDILSTVMHYGNRCIVHYPPGIPDYFKQSFPEGYSWERT FAFEDGGFCTVSADIKLKDNCFIHTSMFHGTNFPADGPVMQRKTIQWE KSIEKMTVSDGIVKGDITMFLLLLEGGGKYRCQFHNTSYKAKKVVEMPQS HYVEHSIERTNDDGTQFELNEHAVARLNEILEHHHHHH
pET21d C21N-mSAASoti-Nend	MGSDKIHHHHHHENLYFQ*GHMMALSKQYIPDDMELIFHMDGNVNGHY FTIVATGKAKPYEGKQNLKATVTKGAPLPFSTDILSTVMHYGNRCIVH YPPGIPDYFKQSFPEGYSWERTFAFEDGGFCTVSADIKLKDNCFIHTS MFHGTNFPADGPVMQRKTIQWEKSIEKMTVSDGIVKGDITMFLLLLEGG GKYRCQFHNTSYKAKKVVEMPQSHYVEHSIERTNDDGTQFELNEHAVAR LNEI
pcDNA3 vimentin-C21N-mSAASoti x=M, A, T y=F, S выделение - линкер	MSTRSVSSSSYRRMFGGPGTASRPSSRSYVTTSTRTYSLGSALRPST SRSLYASSPGGVYATRSSAVRLRSSVPGVRLQLQDSVDFSLADAINTEF KNTRTNEKVELQELNDRFANYIDKVRFLEQQNKILLAELEQLKGQGS RLGDLYEEEMRELRRQVDQLTNDKARVEVERDNLAEDIMRLREKLQEE MLQREEAENTLQSFQDQVDNASLARLDLERKVESLQEEIAFLKKLHEE EIQELQAQIQEQHVQIDVDVSKPDLTAALRDVRQQYESVAAKNLQEA EWEYKSKFADLSEAANRNNDALRQAKQESTEYRRQVQSLTCEVDALKGT NESLERQMRMEENFAVEAANYQDTIGRLQDEIQNMKEEMARHLREYQ DLLNVKMALDIEIATYRKLLEGEESRISLPLPNFSSLNLRETNLDSLP LVDTHSKRTLLIKTVETRDGQVINETSQHDDLEEFSGDSGVYKTMAL SKQYIPDDMELIFHMDGNVNGHYFTIVATGKAKPYEGKQNLKATVTKG APLPFSTDILSTVMHYGNRCIVHYPPGIPDYFKQSFPEGYSWERTFAF EDGGFCTVSADIKLKDNCFIHTSMFHGTNFPADGPVMQRKTIQWEKSI EKMTVSDGIVKGDITxFLLEGGGKYRCQyHTSYKAKKVVEMPQSHYV EHSIERTNDDGTQFELNEHAVARLNEI

Растворы:

LB: триптон (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л), хлорид натрия (5 г/л)

LB-агар: триптон (10 г/л), дрожжевой экстракт (5 г/л), хлорид натрия (5 г/л), агар (15 г/л)

AA/бисА: 30% раствор акрилаида (37,5:1 акриламид: N,N'-метилен-бис-акриламид) в воде

ДСН: 10% раствор додецилсульфата натрия в воде

ГЛ: стерильный 25% раствор глицерина в воде

Таблица 2. Буферные растворы

<i>Гидрофобная хроматография</i>	
Буфер для нанесения	10 mM Tris-HCl, 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , pH 7,4
Буфер для создания градиента	10 mM Tris-HCl, pH 7,4
<i>Анионообменная хроматография</i>	
Буфер для нанесения	20 mM NaHCO ₃ , pH 9,2
Буфер для создания градиента	20 mM NaHCO ₃ , 500 mM NaCl, pH 9,2
<i>Эксклюзионная хроматография или гель-фильтрация</i>	
Буфер для нанесения	20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4
<i>Буферы для проведения электрофореза</i>	
ТАЭ	40 mM Tris, 20 mM CH ₃ COOH, 1 mM ЭДТА (pH 7,4)
ТГ	25 mM Tris, 192 mM глицин, 0,1% ДСН (pH 8,6)
Буфер для приготовления «концентрирующего» геля	1 M Tris-HCl, pH 6,8
Буфер для приготовления «разделяющего» геля	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Буфер для нанесения ДНК на гель	4X Gel Loading Dye, Blue (Евроген)
Буфер для нанесения белка на гель	5X Lane Marker с дитиотреитолом (ThermoFisher Scientific)
Буфер для приготовления компетентных клеток	60 mM CaCl ₂ , 15 % глицерин, 10 mM PIPES, pH 7. Стерилизация через шприцевой фильтр (0,2 мкм)

Приборы и методы

Автоматические дозаторы Eppendorf и Ленпипет, настольная центрифуга с охлаждением Sigma 3-18K (Sigma Laborzentrifugen, Германия), настольная центрифуга (MiniSpin, Eppendorf), френч-пресс (FRENCH®Press, Thermo Electron Corporation), спектрофлуориметр Cary Eclipse (Varian), pH-метр (MP 225, Mettler Toledo), твердотельный термостат (TDB-120, Biosan), термостат (Biosan, Cooling-Heating thermostat CH-100), термостатируемый шейкер-инкубатор (Heidolph), термостатируемый шейкер-инкубатор (New Brunswick E24R, Eppendorf), термоциклер (Progene, Techne), весы аналитические лабораторные (Adventure™, Ohaus), весы лабораторные прецизионные (Explorer, Ohaus), хроматографическая система ÄKTA Purifier (GE HealthCare, Швеция), ячейка для электрофореза (Mini-PROTEAN® II, Bio-Rad; Mini-

SUB® Cell GT, Bio- Rad), источник тока (PowerPac Basic, Bio-Rad; PowerPac 1000, Bio- Rad), установка для измерения флуоресцентного сигнала в кювете Spectr Cluster (Россия), источник света (Lumencor Spectra X LED), BioDrop-DUO (BioDrop, США), спектрофотометр Cary 300 (Agilent, Австралия), спектрофотометр Cary 60 (Agilent, Австралия), конфокальная сканирующая система с временным разрешением PicoQuant Microtime 200 с пикосекундными импульсными лазерами (PicoQuant, Германия) на основе инвертированного флуоресцентного микроскопа IX-71 (Olympus, Япония), EMCCD камера iXon-888 Life (Andor, Великобритания) для регистрации флуоресцентных изображений, спектрометр Shamrock (Andor, Великобритания), для регистрации спектров люминесценции из фокального объема.

2.2. Общие методики

Получение генетических конструкций

Направленный мутагенез последовательности белка SAASoti проводили методом «Overlap-extension PCR», описанным в работе [124]. На первом этапе получали ПЦР-фрагменты (I и II), содержащие соответствующие замены нуклеотидных остатков (Рисунок 13). Для этого при использовании «мутантных» и внешних праймеров (Таблица 3) параллельно получали фрагменты гена mSAASoti с заменой на 5' и 3' конце. После чего проводили объединяющий ПЦР с использованием только внешних праймеров (Стадия 2). ПЦР проводили с использованием высокоточной полимеразы Pfu (СибЭнзим), состав полимеразной смеси соответствовал рекомендациям производителя. Полученные ПЦР-фрагменты последовательно обрабатывали эндонуклеазами рестрикции NdeI и EcoRI согласно протоколу производителя. Дизайн праймеров для ПЦР проводили вручную, синтез праймеров заказывали в ЗАО «Евроген» (Россия).

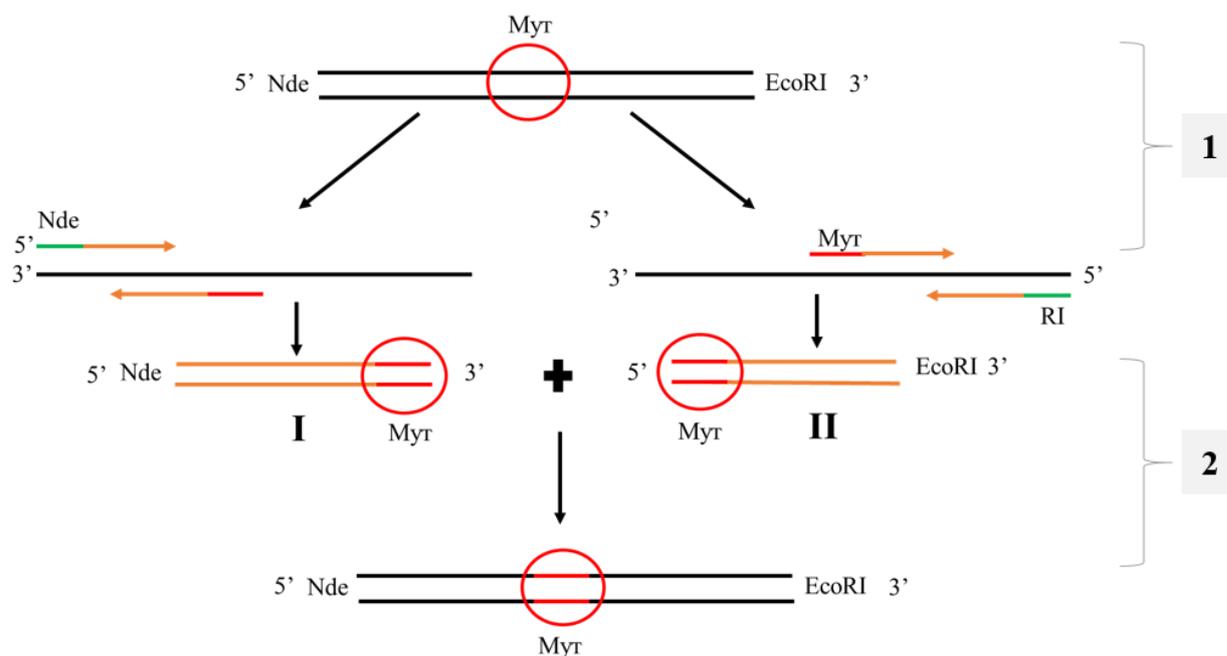


Рисунок 13. Схема получения генов mSAASoti, содержащих замены аминокислотных остатков в определенных положениях методом «Overlap extension PCR», описанная в работе [124]. Мут – вводимая мутация, NdeI и EcoRI – сайты рестрикции, расположенные на 5' и 3' концах гена SAASoti, соответственно.

Таблица 3. Праймеры, используемые для получения различных мутантных форм белка SAASoti. Синтез в ООО «Евроген» (Россия).

Название	Последовательность	T, °C
fw_Nde	TTA TTT CAT ATG ATG GCG CTT TCA AAG C	55
rev_RI	TTG AAT TCT CAA ATT TCG TTT AAA CGA GC	54
SH_f1_RI	TAG AAT TCA GCG GCG ATT CTG GAG TGT ATA AGA CCA TGG	76
SH_f2	GAG TGT ATA AGA CCA TGG CTC TGA GCA AGC AGT AC	75
SH_r -XbaI	TTT CTA GAT CAG ATC TCG TTC AGT CTG GCA	69
C21N_fw	CAC ATG GAT GGC AAC GTC AAT GGG C	61
C21N_rev	GCC CAT TGA CGT TGC CAT CCA TGT G	61
C71V_fw	CAC TAT GGT AAC AGA GTT ATT GTC CAC TAC	59
C71V_rev	GTA GTG GAC AAT AAC TCT GTT ACC ATA GTG	59
C105V_fw	GAT GGC GGA TTT GTG ACA GTC AGT GCA	61
C105V_rev	TGC ACT GAC TGT CAC AAA TCC GCC ATC	61
K112T_fw	TCA GTG CAG ATA TAA CTC TTA AAG ACA A	63
K112T_rev	TTG TCT TTA AGA GTT ATA TCT GCA CTG A	63
K112S_fw	AGT GCA GAT ATA TCA CTT AAA GAC AA	60
K112S_rev	TTG TCT TTA AGT GAT ATA TCT GCA CT	60
K114E_fw	GAT ATA AAA CTT GAG GAC AAC TGC TT	62

<i>Название</i>	<i>Последовательность</i>	<i>T, °C</i>
K114E_rev	AAG CAG TTG TCC TCA AGT TTT ATA TC	62
K114Q_fw	GAT ATA AAA CTT CAA GAC AAC TGC TT	60
K114Q_rev	AAG CAG TTG TCT TGA AGT TTT ATA T	60
C117T_fw	CTT AAA GAC AAC ACA TTC ATT CAC ACA	54
C117T_rev	TGT GTG AAT GAA TGT GTT GTC TTT AAG	54
C117S_fw	CTT AAA GAC AAC TCA TTC ATT CAC ACA	54
C117S_rev	TGT GTG AAT GAA TGA GTT GTC TTT AAG	54
K145P_fw	TCA GTG GGA GCC TTC CAT CGA GAA AAT	68
K145P_rev	ATT TTC TCG ATG GAA GGC TCC CAC TGA	68
M163A_fw	GGC GAT ATT ACG GCT TTC CTG CTG CTG	63
M163A_rev	CAG CAG CAG GAA AGC CGT AAT ATC GCC	63
M163T_fw	GGC GAT ATT ACG ACG TTC CTG CTG CTG	71
M163T_rev	CAG CAG CAG GAA CGT CGT AAT ATC GCC	71
K172H_fw	GGT GGC CAC TAC CGA TGC CAG TTT	69
K172H_rev	CTG GCA TCG GTA GTG GCC ACC T	68
C175A_fw	GGC AAA TAC CGA GCT CAG TTT CAC ACT	60
C175A_rev	AGT GTG AAA CTG AGC TCG GTA TTT GCC	60
F177S_fw	TAC CGA TGC CAG TCT CAC ACT TCT TAC	60
F177S_rev	GTA AGA AGT GTG AGA CTG GCA TCG GTA	60
M163N_fw	GGC GAT ATT ACG NNN TTC CTG CTG CTG *	60-64
M163N_rev	CAG CAG CAG GAA NNN CGT AAT ATC GCC *	60-64
F177N_fw	TAC CGA TGC CAG NNN CAC ACT TCT TAC *	58-63
F177N_rev	GTA AGA AGT GTG NNN CTG GCA TCG GTA *	58-63

где N –A, C, G или T

Конструирование плазмидной ДНК для экспрессии в эукариотических клетках

Вектор pVimentin-SAASoti был сконструирован на основе вектора для экспрессии в клетках млекопитающих pcDNA3 (Invitrogen). Он содержит слитые в единой рамке считывания гены структурного белка виментина, линкерной последовательности –EFSGDSGVYKT– и генов mSAASoti. Гены белка виментина и mSAASoti были амплифицированы с использованием плазмидных ДНК pVimentin-Dendra2 (плазмида была предоставлена К.А. Лукьяновым) и pmSAASoti в качестве матрицы, последовательно

клонированы в вектор pcDNA3. Схема конструкции представлена на Рисунке 14.



Рисунок 14. Схема конструкции pVimentin-SAASoti, созданная на основе вектора pcDNA3

Лигирование ПЦР-фрагментов после получения объединенного ПЦР-фрагмента и вектора после обработки эндонуклеазами рестрикции проводили с использованием ДНК-лигазы T4 (ThermoFischer) согласно протоколу производителя.

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием коммерческого набора QIAGEN Plasmid Mini Kit для выделения плазмидной ДНК, руководствуясь требованиями производителя.

Горизонтальный электрофорез ДНК-фрагментов и плазмидной ДНК в агарозном геле

Чистоту плазмидной ДНК после выделения, а также фрагментов, полученных в результате ПЦР, подтверждали методом гель-электрофореза в 1% агарозном геле. Для последующей визуализации полос, содержащих ДНК, в раствор геля добавляли бромид этидия в концентрации 1 мкг/мл в ТАЭ-буфере. Образец ДНК наносили на гель в буфере для нанесения ДНК (Евроген, Россия). Электрофорез проводили в горизонтальной камере Mini-SUB Cell GT (Bio-Rad, США) в буфере ТАЭ при напряжении 10 В/см. Для определения размера плазмидных ДНК использовали маркер длин ДНК 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия). Полосы ДНК визуализировали в геле с использованием трансиллюминатора (ТСР-15 МХ, Vilber Lourmat) $\lambda=365$ нм.

Приготовление компетентных клеток [125]

Колонию бактериальных клеток *E. coli* вносили с чашки Петри в жидкую питательную среду LB, ночную культуру инкубировали в течение 16 ч при температуре 37 °С и постоянном перемешивании 220 об/мин. Наутро культуру разбавляли в свежей питательной среде и выращивали при 37 °С на 220 об/мин до оптической плотности $OD_{600}=0,375$. Затем бактериальную культуру охлаждали во льду (4 °С) в течение 10 мин, клетки осаждали центрифугированием при 4 °С и 1600 об/мин в течение 7 минут. После удаления надосадочной жидкости осадок ресуспендировали в 10 мл охлаждённого стерильного буфера КЛ и центрифугировали в течение 5 мин при 1100 об/мин. Полученный осадок снова ресуспендировали в 10 мл буфера КЛ и инкубировали во льду (4 °С) в течение 30 минут. После инкубации клетки осаждали центрифугированием при 4 °С на 1100 об/мин в течение 7 мин, удаляли надосадочную жидкость и добавляли 100 мкл свежего буфера КЛ. Клетки хранили при -70 °С. Все процедуры проводили в стерильных условиях.

Трансформация компетентных клеток *E. coli* плазмидной ДНК

К 100 мкл компетентных клеток (BL21 (DE3) или DH5 α) добавляли 10 нг плазмидной ДНК (или лигирующей смеси). После 30-минутной инкубации в ледяной бане (4 °С) смесь подвергали «тепловому шоку» (2 мин при 42 °С, 2 мин при 4 °С). Затем к клеткам добавляли 900 мкл питательной среды LB, инкубировали в течение 1 часа при 37 °С, высевали на селективную среду (агаризованная среда LB, содержащая антибиотик ампициллин 100 мкг/мл на чашке Петри) и инкубировали 16 ч при 37 °С.

Наработка биомассы для последующего выделения мутантных форм mSAASoti

В жидкую питательную среду LB, содержащую антибиотик ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, вносили колонию клеток *E. coli* BL21 (DE3), трансформированных плазмидной ДНК pET22B_SAASoti_X (где X – введенная точечная мутация), и культивировали в течение ночи при 37 °С и

постоянном перемешивании 220 об/мин. Утром ночную культуру обновляли в свежей LB-среде, также содержащей ампициллин (100 мкг/мл) и выращивали при 37 °С и 220 об/мин до достижения оптической плотности $OD_{600}=0,6$. Для индукции биосинтеза мутантных форм SAASoti добавляли раствор изопропилтио-галактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 0,1 мМ. Индукцию проводили при температуре 20 °С при постоянном перемешивании 220 об/мин в течение 24 часов. За степенью созревания флуоресцентных белков следили в клеточной суспензии ($\lambda_{ex}=470$ нм, $\lambda_{em}=519$ нм,) с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian), а также методом ПААГ-электрофореза по Лэммли оценивали степень индукции белка в общем лизате. По истечении 24 ч индукции клетки осаждали центрифугированием при 4700 об/мин и 4 °С в течение 20 минут. Клеточный осадок имел лимонно-желтый цвет (для разных мутантных форм наблюдали свой оттенок). Полученную биомассу хранили при температуре -20°С и использовали для дальнейшего выделения белков.

Выделение рекомбинантных белков

После ресуспендирования в буфере 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4, содержащем также 1 мМ фенилметилсульфонил фторида и 10 мкг/мл ДНКазу I, клетки *E.coli* BL21(DE3) разрушали с использованием френч-пресса (FRENCH Press, Thermo Electron Corporation). Для отделения полученного лизата от клеточного дебриса раствор центрифугировали при 18 000 об/мин в течение 40 мин. К супернатанту добавляли раствор сульфата аммония $(NH_4)_2SO_4$ до 50 % (по объему) и оставляли при +4 °С на 16 часов для осаждения белков. Высоленную фракцию отделяли центрифугированием при 4 °С и 4700 об/мин в течение 20 мин. Окрашенный осадок перерастворяли в буфере 10 мМ Tris-HCl, 1 М $(NH_4)_2SO_4$, pH 7,4 и далее очищали хроматографическими методами с использованием хроматографической системы АКТАPurifier 10 (GE Healthcare, Швеция), снабженной детектором, позволяющим следить за ходом элюирования спектрофотометрически одновременно при нескольких длинах волн ($\lambda=280$ нм и $\lambda=509$ нм).

Гидрофобная хроматография

Перерастворенную в буфере 10 мМ Tris-HCl, 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,4 фракцию, содержащую SAASoti, наносили на хроматографическую колонку HiPrep Butyl FF 16/10 (GE Healthcare, Швеция). Очистку от нецелевых белков производили ступенчато (30 % буфера 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4), после чего дальше снижали концентрацию NaCl в градиенте буфера 10 мМ Tris-HCl, pH 7,4. Фракции после элюирования, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали с использованием центрифужного концентратора Amicon Ultra-15, 10 кДа (Merck, Millipore) и одновременно переводили в 20 мМ NaHCO_3 для последующего проведения анионообменной хроматографии.

Анионообменная хроматография

Перерастворенные в 20 мМ NaHCO_3 образцы SAASoti наносили на хроматографическую колонку MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare, Швеция), элюирование целевого белка проводили созданием градиента NaCl (0 – 50 % 20 мМ NaHCO_3 , 500 мМ NaCl за 15 мин при скорости потока 0,7 мл/мин). Также степень чистоты полученных фракций проверяли методом электрофореза в денатурирующих условиях. Отобранные по чистоте фракции объединяли и концентрировали на центрифужных концентраторах Amicon Ultra-15, 10 кДа, (Merck, Millipore) и переводили в 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4.

Электрофорез белков и клеточных лизатов (гель-электрофорез по Лэммли) проводили в ПААГ (10×10×0,1 см), содержащем 0,1 % (m/V) ДСН, в буфере ТГ при напряжении 90/180 В. Концентрирующий гель (4 % ПААГ в буфере 1 М Tris-HCl, pH 6,8), разделяющий гель (15 % ПААГ в буфере 1,5 М Tris-HCl, pH 8,8). Клеточные лизаты или растворы белков наносили на гель в 20 мкл буфера для нанесения. Перед нанесением на гель пробы прогревали в течение 5 мин при 90 °С, охлаждали в течение 5 мин при 4 °С и центрифугировали 5 мин при 12 000 об/мин. После проведения гель-электрофореза проводили визуализацию белковых полос путем окрашивания

раствором PageBlue™ Protein Staining Solution (Thermo Scientific, США), пример геля после всех стадий очистки для одной из мутантных форм представлен на Рисунке 15.

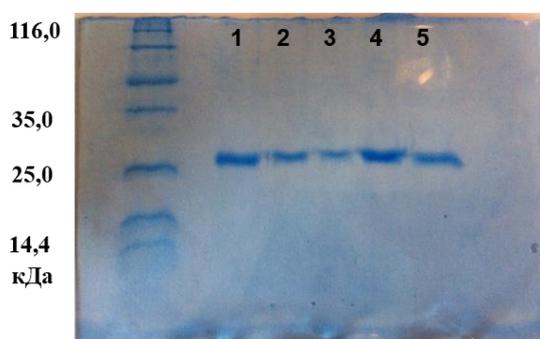


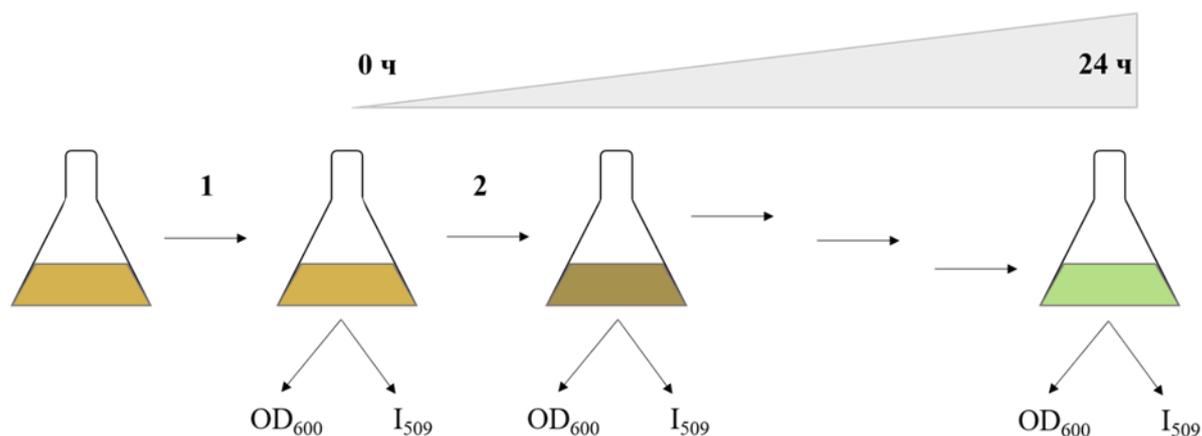
Рисунок 15. ПААГ-электрофорез по Лэммли очищенных фракций мутантной формы C21N mSAASoti, 1-5 – номера собранных в процессе элюирования фракций.

Эксклюзионная хроматография

Оценку олигомерного состояния мутантных форм C21N/wt, C117T, wt, C21N/V127T и V127T SAASoti проводили методом эксклюзионной хроматографии на носителе Superdex 200 100/20 GL (GE Healthcare, Швеция). 50 мкл сконцентрированного раствора анализируемого белка SAASoti наносили на хроматографическую колонку в потоке 0,5 мл/мин буфера 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4. За ходом элюирования следили спектрофотометрически при $\lambda=280$ нм и $\lambda=509$ нм. Молекулярный вес элюируемых белков определяли по калибровочной кривой, построенной с использованием стандартов для гель-фильтрации Gel Filtration Standard #1511901 (BioRad).

Созревание флуоресцентных белков при экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3)

За созреванием флуоресцентных белков следили в суспензии клеток, экспрессирующих различные мутантные формы SAASoti (Рисунок 16). Для этого отбирали по 1 мл суспензии в различные промежутки времени после запуска индукции с помощью раствора ИПТГ (от 0 до 24 ч), каждую фракцию сначала анализировали на спектрофлуориметре ($\lambda_{ex}=470$ нм). Значения максимумов флуоресценции зеленой формы нормировали на значения оптической плотности образцов на длине волны 600 нм для корректного сравнения различных мутантных форм между собой (Рисунок 17). После чего клетки осаждали центрифугированием (7000 об/мин, 5 минут), ресуспендировали в буфере для нанесения белка на гель, содержащем восстанавливающий агент ДТТ (ThermoFisher Scientific), и после 5-минутного прогрева образцов при температуре 90 °С наносили на ПААГ для дальнейшего проведения гель-электрофореза по Лэммли. Визуализацию белковых полос проводили путем окрашивания раствором PageBlue™ Protein Staining Solution (Thermo Scientific, США).



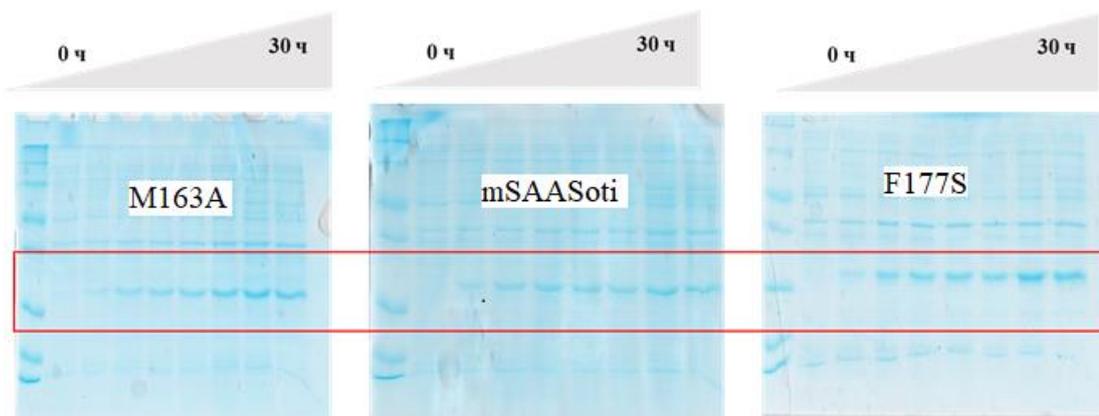


Рисунок 16. Схема проведения эксперимента по изучению созревания ФБ в суспензии клеток *E.coli*. BL21 (DE3). 1 – инкубация клеток при 37°C и 220 об/мин до достижения оптической плотности $OD_{600}=0,6$; 2 – запуск индукции добавлением раствора ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ и инкубация при 20 °С и 220 об/мин. Отбор проб из суспензии клеток в точках 0-30 ч с последующим анализом интенсивности флуоресценции зеленой формы и оптической плотности и анализом методом гель-электрофореза по Лэммли.

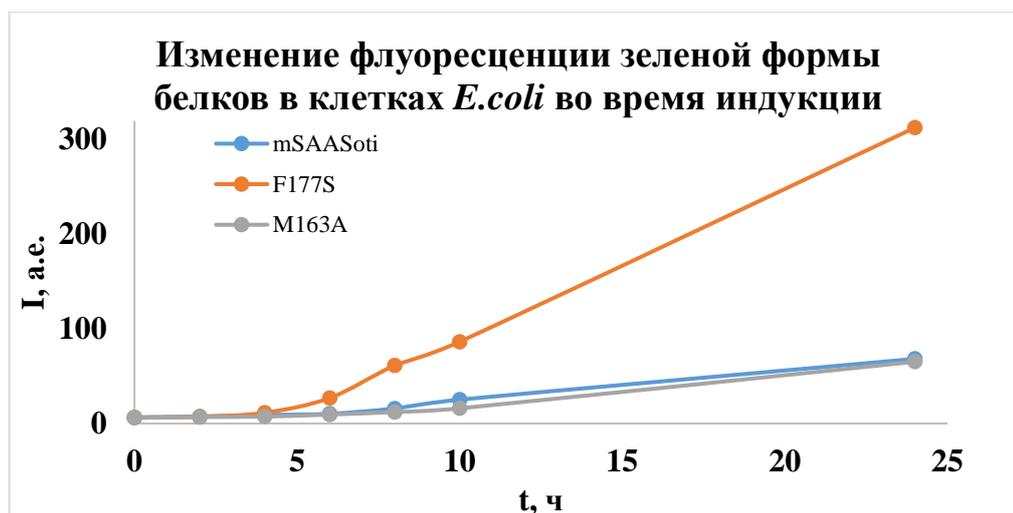


Рисунок 17. Изучение созревания мутантных форм SAASoti при экспрессии в клетках *E. coli* BL21 (DE3). 1 – инкубация клеток при 37°C и 220 об/мин до достижения оптической плотности $OD_{600}=0,6$; 2 – запуск индукции добавлением раствора ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ и инкубация при 20°C и 220 об/мин. Отбор проб из суспензии клеток в точках 0-24 ч с последующим анализом интенсивности флуоресценции зеленой формы и оптической плотности.

Спектральные методы

Спектры поглощения регистрировали с использованием спектрофотометра Cary 60 (Agilent).

Концентрации белков оценивали по закону Бугера-Ламберта-Бера в логарифмической форме (Уравнение 1):

$$A = \varepsilon * l * c \quad (1)$$

где A – оптическая плотность раствора (о.е.), ε – коэффициент молярного поглощения ($M^{-1} * cm^{-1}$), l – длина оптического пути (см), c – концентрация поглощающего вещества (M).

Молярные коэффициенты поглощения (ε_{509}) определяли в растворах очищенных образцов SAASoti в буфере 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4, при этом использовали теоретически рассчитанные значения ε_{280} (<https://web.expasy.org/protparam/>), A_{280} (по спектру поглощения).

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

Установки для проведения фототрансформаций флуоресцентных белков

Для облучения образцов белков в кювете и изучения изменения их спектральных свойств под действием света была сконструирована установка согласно схеме на Рисунке 18. Флуоресцентная кювета с оптическим путем 3 мм помещалась в держатель для кювет. Свет от светодиодного источника SpectraX (Lumencor, США) заводился с помощью 3 мм кварцевого световода и был сколлимирован линзой. Заводимый пучок полностью покрывал окошко кюветы. Мощность заводимого излучения определяли с помощью измерителя мощности (Newport, США) на расстоянии, эквивалентном расстоянию до стенки кюветы. Плотность мощности рассчитывали, как отношение измеренной мощности к площади детектора.

Таблица 4. Параметры мощности в полученной установке

λ , нм	400	470	550
Плотность мощности мВт/см ²	146,0	167,4	535,5

Спектры эмиссии флуоресценции регистрировали при облучении с помощью спектрометра с волоконным входом SpectrCluster (Россия). Также

кювету перемещали в спектрофотометр и спектрофлуориметр для получения спектров облученного образца.

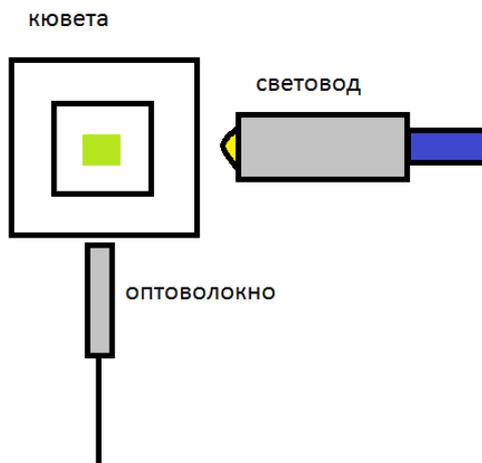


Рисунок 18. Схема флуоресцентной установки, собранная для облучения растворов белков в кювете.

Для отбора наиболее перспективных мутантных форм после сайт-насыщенного мутагенеза была собрана установка на основе микроскопа Olympus BX-43. Схема и фотография установки изображены на Рисунке 19. Четыре светодиода Thorlabs (390, 450, 470 и 560 нм) были коллимированы ахроматическими конденсорными линзами Thorlabs ACL2520-A и объединены тремя дихроичными зеркалами Thorlabs DMLP425R, DMLP490R и Edmund Optics #67-078, 458 нм отсекающий фильтр. Спектральные полосы выделялись с помощью полосовых фильтров Thorlabs MF390/18 и Chroma ET448/19x, ET470/24m, ZET561/10x или ET560/25x. Для получения более однородного светового пучка была использована схема Кёлера после объектива микроскопа. Луч света после коллимирующих линз фокусировался на задней плоскости объектива ахроматической линзой (Thorlabs AC254-125-A), затем свет после ахромата отражался светоделителем 50/50 на объектив. Флуоресцентное изображение проецировалось на CCD-камеру после светоделителя с помощью тубусной линзы после фильтров Chroma 500LP и notch-фильтра ZET562NF. Камера использовалась для фокусировки и ориентации образцов. Одновременно ахроматическая линза фокусировала изображение на входную щель спектрометра ASP-75 (Avesta, Россия) через

второй светодетель 70/30. Светодиоды управлялись драйвером Thorlabs LEDD1B и самодельным USB-ЦАП. К установке было разработано ПО с использованием языка программирования Python, которое позволяет переключать светодиоды с временным разрешением 1 мс и одновременно регистрировать спектры эмиссии во время облучения. После объектива Olympus PlanApo 20x/0,4 NA были получены следующие значения максимальной плотности световой мощности:

Таблица 5. Параметры мощности в полученной установке

λ , нм	390	450	470	560
Плотность мощности мВт/см ²	282,4	528,4	706,1	45,6

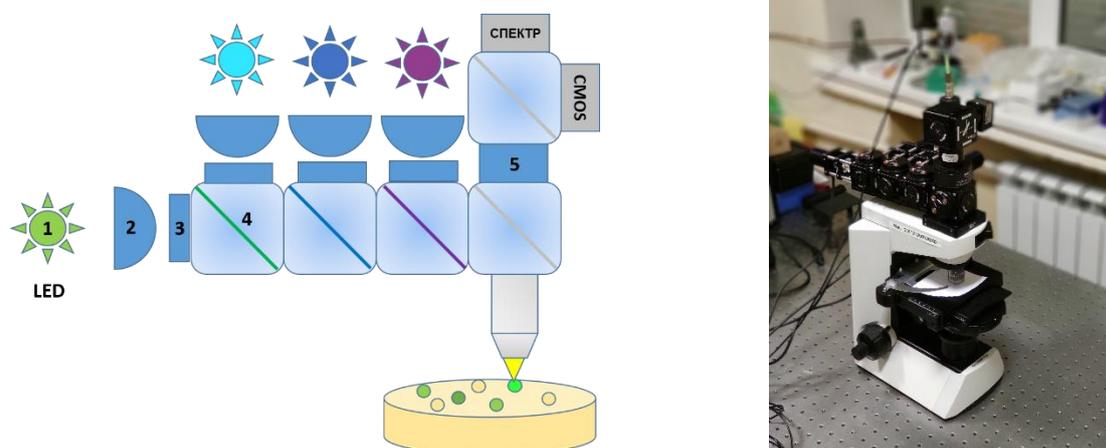


Рисунок 19. Схема и фото флуоресцентной установки, используемая для скрининга колоний, экспрессирующих флуоресцентные белки. 1) Источник света LED; 2) конденсорная линза; 3) узкополосный светофильтр; 4) дихроическое зеркало; 5) тубусная линза.

При исследовании фототрансформаций вариантов fusion-конструкций виментин-mSAASoti в клетках HeLa Kyoto изображения клеток и кинетику фототрансформаций получали, используя флуоресцентный микроскоп Olympus IX-71 с объективом $\times 100$, NA 1,49. Измерения проводили в широкопольном режиме. Для возбуждения использовали LED осветитель Lumencor SpectraX с длиной волны 390/22 нм (10% — 1,4 мВт/см² перед объективом), 434/17 нм, 485/25 нм (10% — 2,9 мВт/см²), 548/10 нм (20 % — 5 мВт/см²), при регистрации использовали оригинальные блоки фильтров Olympus U-MWB2 в зеленом канале и U-MWG2 в красном канале. Для

регистрации изображений использовалась камера Andor iXon 888 EMCCD. Экспозиция подбиралась по интенсивности свечения исследуемого объекта. Изображения анализировались с использованием ПО ImageJ.

Фотоконверсия из зеленой флуоресцентной формы в красную образцов SAASoti (10 мкМ) проводилась в микрокювете Hellma (Германия), оптический путь 3 мм, при облучении светом $\lambda_{ex}=395$ нм (150 мВт/см²) в течение 10 минут с использованием SpectraX LED (Lumencor, США) в качестве источника света и установки SpectrCluster (Россия) для регистрации спектров эмиссии флуоресценции во времени.

Обратимое переключение зеленой (и красной – для вариантов M163A и F177S mSAASoti) формы регистрировали на описанной выше установке, однако для облучения использовали диоды $\lambda_{ex}=470$ нм (167 мВт/см²) и $\lambda_{ex}=550$ нм (300 мВт/см²), соответственно. Для переключения в яркую форму использовали длины волн 400 и 450 нм, для зеленой и красной формы соответственно. Мощность света и экспозицию подбирали, чтобы восстановление интенсивности было максимальным, а фотодеструкция была минимальной.

Кинетические кривые образования красной формы, а также переключения в темную форму строили по максимумам спектров эмиссии в зависимости от времени. Кривые анализировали по экспоненциальному закону, как мономолекулярные процессы с использованием ПО Origin 8.5. При исследовании термической релаксации облученный образец помещали в спектрофотометр с термостатируемой ячейкой и наблюдали за изменением спектров поглощения. Кинетику релаксации обрабатывали аналогично кинетике переключения.

* * *

Растворы белков C21N, C71V, C105V, C117S, C117T, C175A, C21N/C71V, C21N/C175A и C21N/C71G/C175A (Раздел 3.2), а также F177S, C21N/F177S, C21N/M163A, C21N/M163T, mSAASoti (Раздел 3.6.1) облучали с

использованием установки, изображенной на Рисунке 17. Флуоресцентный скрининг на клетках *E. coli* BL21(DE3), экспрессирующих белки после сайт-насыщенного мутагенеза по положениям 163 и 177 (Раздел 3.6.1), проводили с использованием установки на Рисунке 18. Облучение клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих fusion-конструкции мутантных форм mSAASoti с виментином (Раздел 3.6.3), проводили на установке на основе микроскопа Olympus IX-71.

Определение константы кислотности хромофора (pKa) в возбуждённом состоянии

Константу кислотности возбужденного состояния хромофора измеряли по нормированным спектрам флуоресценции образца растворов белков при различных значениях pH (Рисунок 20). Для этого готовили растворы мутантных форм mSAASoti в буферах с pH 4-9 с шагом 0,5 и определяли интенсивность флуоресценции каждого образца. Для приготовления серии буферных растворов с pH < 6 использовали 200 мМ цитрат натрия, pH > 6 – 200 мМ фосфат натрия.

Расчет величины pKa проводили с использованием формулы Хендерсона-Хассельбальха (2),

$$H^+ + Chrom^- \rightleftharpoons CromH \quad I([H^+]) = \frac{I_0 K}{K + [H^+]} + c, \quad (2)$$

где I – интенсивность флуоресценции образца, I₀ – максимальная интенсивность флуоресценции при высоких значениях pH, K – константа кислотности хромофора в возбуждённом состоянии, [H⁺] – концентрация ионов водорода. Анализ данных проводился путем аппроксимации экспериментальных данных по Уравнению 2 с использованием программного пакета Origin 8.5.

Таблица 6. Пример расчета величины pKa хромофора

M163A			C21N/M163G	
R ²	0,989		R ²	0,997
	Величина	Станд. ошибка	Величина	Станд. ошибка
I ₀	343,8	11,3	I ₀	148,5
				1,9

K	2,236E-7	3,64E-8	K	9,37E-8	5,12E-9
c	5,28	8,17	c	0	-

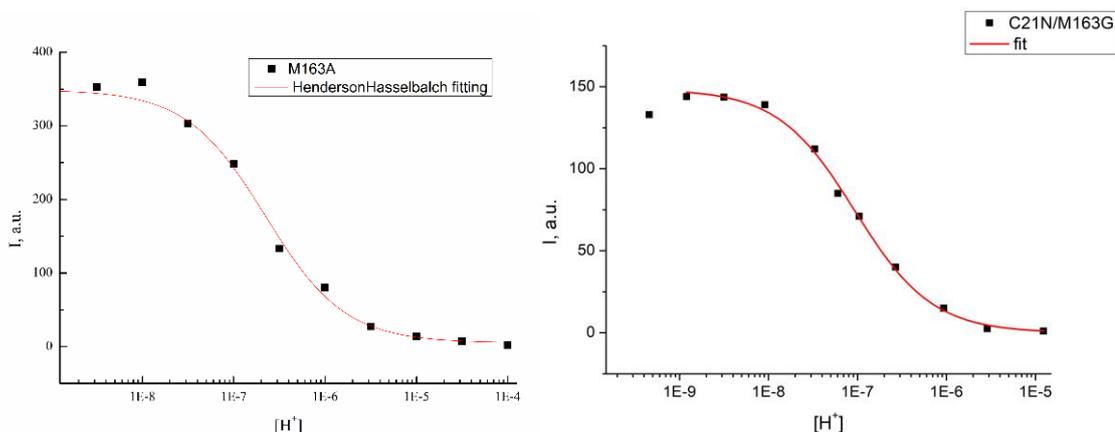


Рисунок 20. Пример расчета величины рКа для мутантных форм М163А и С21N/М163G mSAASoti. Точки – экспериментальные данные, красная линия – fitting.

Определение квантового выхода

Относительный квантовый выход новых мутантных форм SAASoti определяли в сравнении с определенным ранее значение для mSAASoti [10]. Для этого для каждой мутантной формы и для mSAASoti готовили 5 образцов растворов с оптической плотностью на длине волны возбуждения, не превышающей значения 0,1. Для каждого образца регистрировали значение оптической плотности и исправленный спектр флуоресценции. Квантовый выход определяли по отношению зависимостей площадей под спектрами флуоресценции к оптической плотности образца.

Получение препаративных количества белка mSAASoti для кристаллизации

Последовательности C21N mSAASoti и mSAASoti были клонированы в вектор pEt22b по сайтам рестрикции NdeI и XhoI, для получения слитной конструкции, содержащей 6 аминокислотных остатков гистидина на С-конце в слитной конструкции, а также – в плазмиду pHisParSpm (плазида на основе вектора pEt21d, где вместо NcoI-EcoRI His-тег, для получения слитной конструкции, содержащей 6 аминокислотных остатков гистидина на N-конце.

Полученные генетические конструкции после подтверждения секвенированием (ЗАО «Евроген») были экспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3). После инкубации при 37 °С до OD 0,6. Индукцию запускали добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ и проводили при температуре 20 °С при постоянном перемешивании 220 об/мин в течение 24 часов. За степенью созревания флуоресцентных белков следили в клеточной суспензии ($\lambda_{ex}=470$ нм, $\lambda_{em}=519$ нм,) с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian). В случае белков, содержащих 6 а.о. гистидина на N-конце, не наблюдали созревание хромофора белка в клетках (бесцветные клетки), после разрушения клеток и проведения аналитического гель-электрофореза по Лэммли было установлено, что белки экспрессируются, однако, созревание не происходит. По истечении 24 ч индукции клетки осаждали центрифугированием при 4700 об/мин и 4 °С в течение 20 минут. Полученную биомассу хранили при температуре -20°С и использовали для дальнейшего выделения белков. После ресуспендирования клеток *E.coli* BL21(DE3) в буфере 20 мМ Tris-HCl, 200 мМ NaCl, pH 7,4, содержащем также 1 мМ фенилметилсульфонил фторида, их разрушали с использованием ультразвука. Для отделения полученного лизата от клеточного дебриса раствор центрифугировали при 15 000 об/мин в течение 20 мин (центрифуга Optima XPN-100 Ultracentrifuge Beckman Coulter). Супернатант наносили на колонку Ni-NTA agarose (QIAGEN), промывали буферами, содержащими 5мМ имидазол (от неспецифически связанных белков) и 20 мМ имидазол. Элюирование целевых белков проводили ступенчато путем нанесения буферов, содержащих 200 и 500 мМ имидазол. Фракции, содержащие ФБ, объединяли и переводили в буфер для нанесения на колонку MonoQ с использованием центрифужного концентратора Amicon Ultra 10 kDa и далее очищали методом анионо-обменной хроматографии с использованием хроматографической системы АКТАPurifier 10 (GE Healthcare, Швеция), снабженной детектором, позволяющим следить за ходом элюирования спектрофотометрически одновременно при нескольких длинах волн ($\lambda=280$ нм

и $\lambda=509$ нм). Перерастворенные в 20 мМ NaHCO₃ образцы SAASoti наносили на хроматографическую колонку MonoQ 5/50 GL (GE Healthcare, Швеция), элюирование целевого белка проводили созданием градиента NaCl (0 – 50 % 20 мМ NaHCO₃, 500 мМ NaCl за 15 мин при скорости потока 0,7 мл/мин). Также степень чистоты полученных фракций проверяли методом электрофореза в денатурирующих условиях. Отобранные по чистоте фракции проверяли методом гель-электрофореза по Лэммли и аналитической гель-фильтрацией (Superdex 200), как показано на Рисунке 21.

Перечень используемых буферов представлен ниже.

Таблица 7. Буферы и их состав, используемые для проведения аффинной хроматографии.

Название буфера	Состав буфера
<i>Буфер для нанесения</i>	20 мМ Tris/HCl, 200 мМ NaCl, pH 7,4
<i>Промывочный буфер</i>	20 мМ Tris/HCl, 200 мМ NaCl, 5 мМ имидазол, pH 7,4
<i>Буфер для элюирован. 1</i>	20 мМ Tris/HCl, 200 мМ NaCl, 20 мМ имидазол, pH 7,4
<i>Буфер для элюирован. 2</i>	20 мМ Tris/HCl, 200 мМ NaCl, 200 мМ имидазол, pH 7,4
<i>Буфер для элюирован. 3</i>	20 мМ Tris/HCl, 200 мМ NaCl, 500 мМ имидазол, pH 7,4

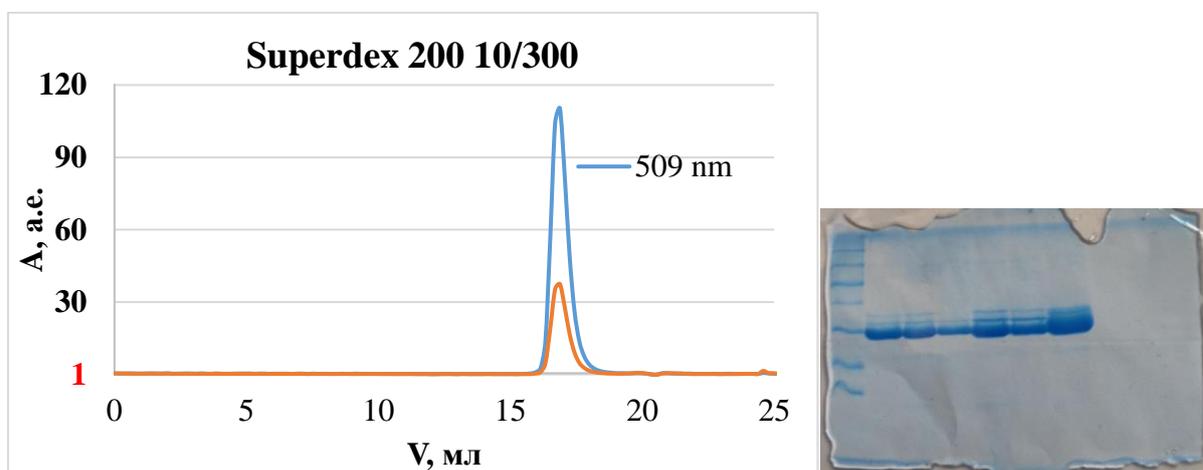


Рисунок 21. Аналитическая гель-фильтрация образца C21N mSAASoti, содержащего 6 а.о. гистидина на С-конце. Маркер – SM0431, дорожки 1-6 – фракции белка после очистки анионо-обменной хроматографией.

Кристаллизационный скрининг

Первичный кристаллизационный скрининг был проведен с использованием автоматической кристаллизационной системы (Oryx4, Douglas Instruments, UK) и коммерчески доступных 96-луночных планшетов (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) при температуре 15 °С методом диффузии паров в висячей капле. Концентрация белка была 5,7 мг/мл в буфере 20 mM TrisHCl. Примерно через 1 месяц в условиях 0,1 M TrisHCl, pH 8,0, 30% w/v mPEG 2000 были получены кристаллы, которые впоследствии использовали для установления кристаллической структуры.

Диффракционные данные были получены от одного кристалла при температуре 100 K с использованием рентгеновского дифрактометра Rigaku XtaLAB Synergy-S (Rigaku, USA). Данные были проиндексированы и интегрированы с использованием программы XDS [126] и масштабированы с помощью Aimless [127]. Разрешение структуры проводили с использованием программы MOLREP [128] с использованием структуры ФБ Dronpa (PDB ID - 6NQP) в качестве стартовой модели. Уточнение структуры было выполнено с использованием программы Refmac5 [129], реализованного в пакете CCP4. Визуальный осмотр карт электронной плотности и ручное восстановление модели были выполнены с использованием COOT [130]. При доработке использовался протокол PROsmart со структурой флуоресцентного белка Dronpa в качестве эталонной модели, а также ограничения TLS и NCS. В окончательной модели асимметричная единица содержала две копии белка по 218 остатков каждая, два хромофора и четыре молекулы растворителя.

Ведение клеточных культур млекопитающих

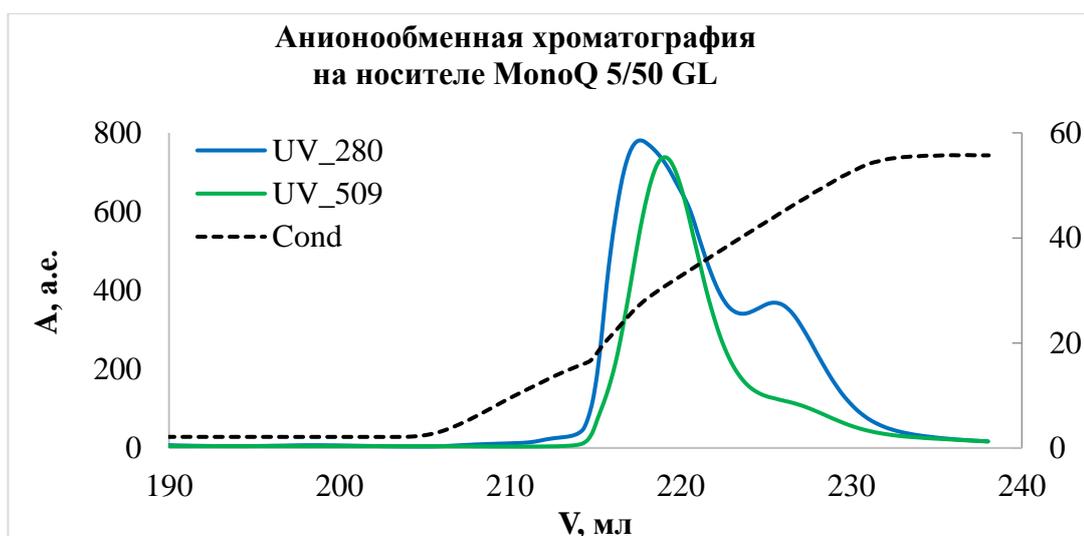
Для проверки поведения слитых конструкций с мутантными формами mSAASoti в клетках млекопитающих использовали клеточную линию HeLa Kyoto, которая была любезно предоставлена к.б.н Алексеем М. Богдановым (ИБХ РАН). Культуру выращивали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (ПанЭко, Россия), содержащей 5% FBS, 0,5% (по объему)

пенициллина-стрептомицина (ПанЭко, Россия) при 37 °С в увлажненной атмосфере с содержанием CO₂ 5% в инкубаторе СВ-150 (Binder, Германия). Перед трансфекцией клетки пересевали на 35 мм чашки с дном из покровного стекла, обработанные желатином. Клетки трансфицировали реагентом GenJect-39 (Moloca, Россия) согласно протоколу производителя при достижении конфлюэнтности ~70%. Флуоресценцию регистрировали через 24 часа после трансфекции, сразу же проводили эксперименты по фототрансформации.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Подбор условий для очистки флуоресцентного белка SAASoti хроматографическими методами

Наиболее часто флуоресцентные белки очищают с использованием металл-хелатной [131] и анионообменной хроматографии [132], однако встречаются также примеры с применением методов органической экстракции [133], эксклюзионной [134] и гидрофобной хроматографии [135]. Введение последовательности из нескольких гистидинов на N- или C-конец для проведения, например, металл-хелатной хроматографии в случае флуоресцентных белков может приводить к изменению их флуоресцентных характеристик, поэтому ранее [10], [11], [123] флуоресцентный белок mSAASoti очищали двумя последовательными стадиями анионообменной хроматографии. Как видно из хроматограмм, представленных на Рисунке 22, степень чистоты образца белка, получаемого таким способом, является недостаточной по соотношению поглощения A_{509}/A_{280} , поэтому целью первого этапа работы являлась оптимизация условий выделения и очистки препаративных количеств флуоресцентного белка mSAASoti для дальнейшего получения кристаллической структуры и исследования различных фотохимических превращений.



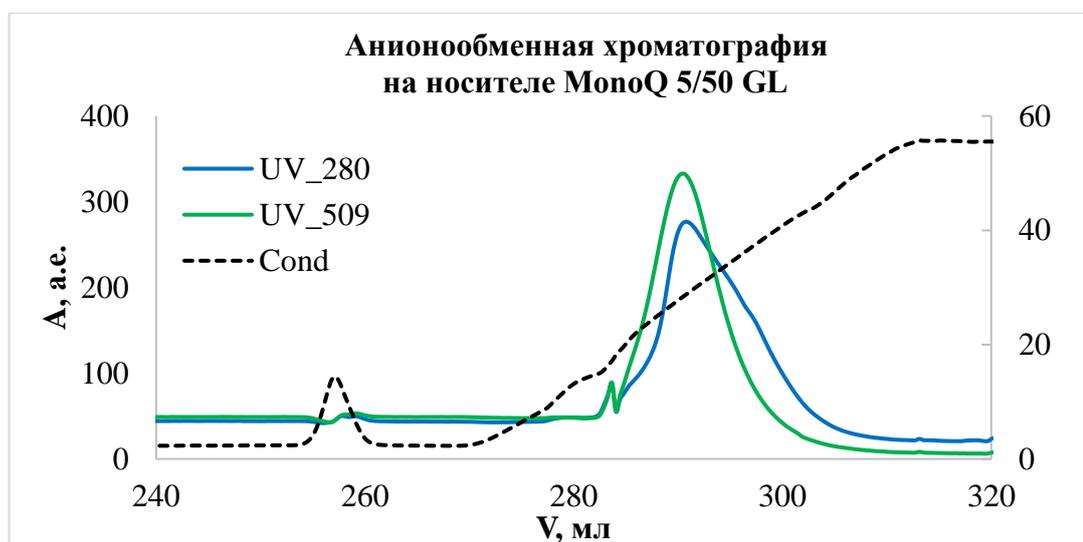


Рисунок 22. Анионообменной хроматографии образца V127T SAASoti A) I-ая стадия и B) II-ая стадия Носитель MonoQ 5/50 GL. Буфер для нанесения: 20 мМ NaHCO₃, буфер для создания градиента 20 мМ NaHCO₃, 0,5 М NaCl.

В литературе была описана возможность использования гидрофобной хроматографии для выделения и очистки GFP-подобных белков [135], поэтому в качестве альтернативного метода была предложена следующая схема очистки белка из раствора клеточного лизата:

*осаждение белков сульфатом аммония → гидрофобная хроматография
→ анионообменная хроматография.*

В ходе исследования были проведены две параллельные стадии гидрофобной хроматографии с разными носителями – HiPrep Phenyl FF (high sub) 16/10 и HiPrep Butyl FF 16/10 (V=20 мл). Для нанесения белка использовался буфер 10мМ Tris-HCl, содержащий 1М (NH₄)₂SO₄, элюирование проводили уменьшением концентрации NaCl (буфер 10 мМ Tris-HCl). Сильное взаимодействие mSAASoti с гидрофобным носителем при использовании HiPrep Phenyl FF 16/10 колонки привело к тому, что элюирование белка происходило лишь в деионизованной воде (milliQ). В случае колонки HiPrep Butyl FF 16/10 взаимодействие носителя с SAASoti явно слабее, в результате элюирование mSAASoti происходило при уменьшении концентрации соли сульфата аммония и созданием градиента раствора буфера 10мМ Tris-HCl. После анионообменной хроматографии данного образца на

носителе MonoQ 5/50 GL была достигнута желаемая степень очистки $A_{509}/A_{280}=3/1$ (Рисунок 23).

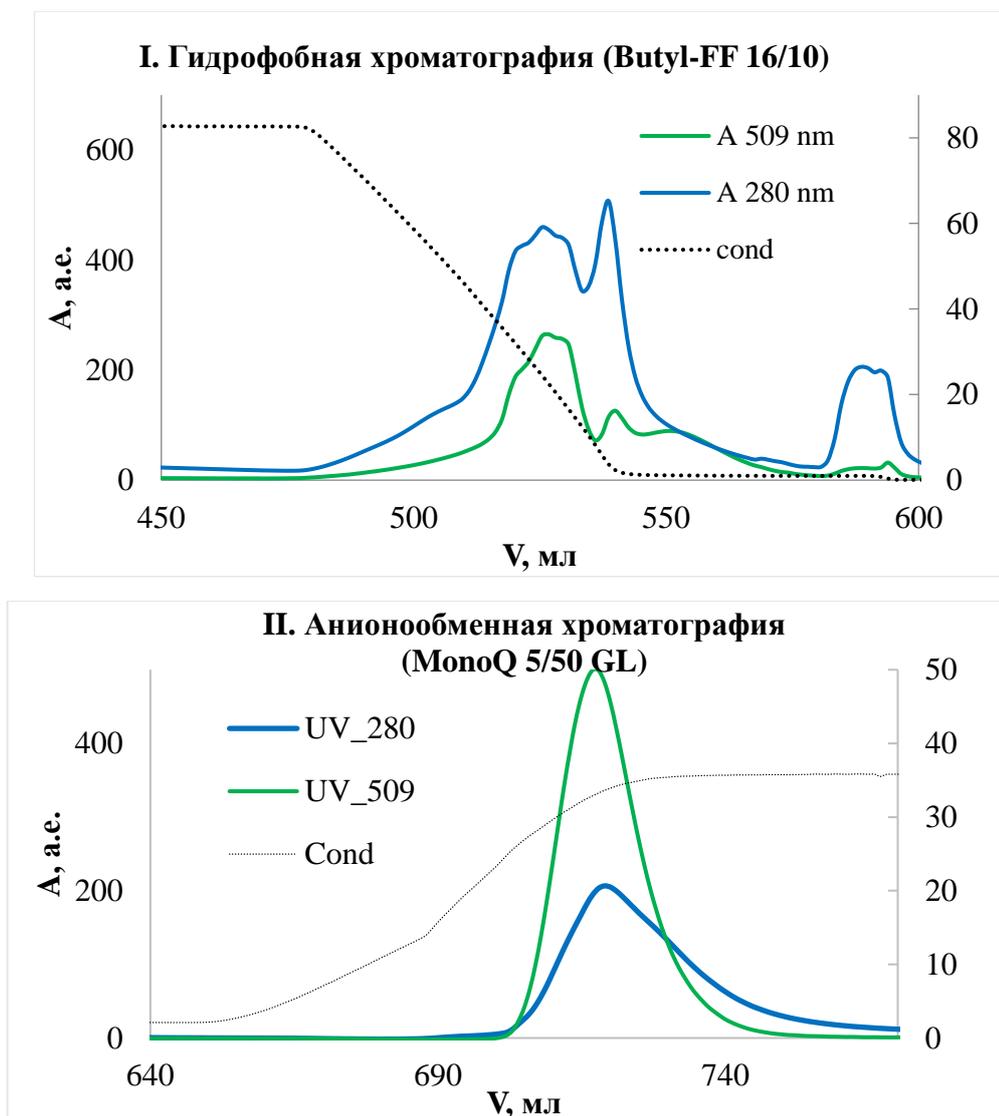


Рисунок 23. А) I-ая стадия – гидрофобная хроматография V127T SAASoti. Носитель: HiPrep Butyl FF 16/10, буфер для нанесения: 10 mM Tris-HCl, 1M (NH₄)₂SO₄, буфер для создания градиента 10 mM Tris-HCl; Б) II-ая стадия – анионообменная хроматография V127T SAASoti. Носитель: MonoQ. Буфер для нанесения: 20 mM NaHCO₃, буфер для создания градиента 20 mM NaHCO₃, 0,5 M NaCl.

Преимуществом этой схемы очистки помимо более высокой степени чистоты образца является отсутствие необходимости промежуточных стадий переведения образца/диализа в буферы с другим составом, что, во-первых, уменьшает время проведения эксперимента, а во-вторых, сокращает потери белка на этих стадиях. Таким образом, нами была выбрана трёхэтапная схема очистки: *осаждение белков сульфатом аммония → гидрофобная хроматография → анионообменная хроматография*. По выбранной схеме

было получено, очищено и передано для дальнейшей кристаллизации около 20 мг флуоресцентного белка mSAASoti.

3.2. Роль остатков цистеина в аллостерической модуляции фототрансформаций mSAASoti

3.2.1. Анализ остатков цистеина, находящихся на поверхности

Одним из требований для получения кристаллической структуры белка является гомогенность препарата и химическая устойчивость. Однако, в случае mSAASoti было обнаружено, что он склонен к частичной димеризации при повышенных концентрациях, как видно на хроматограмме после гель-фильтрации, представленной на Рисунке 24. Важно отметить, что при добавлении к образцу белка и в буферный раствор дитиотреитола (до конечной концентрации 10 мМ) димер разрушается.

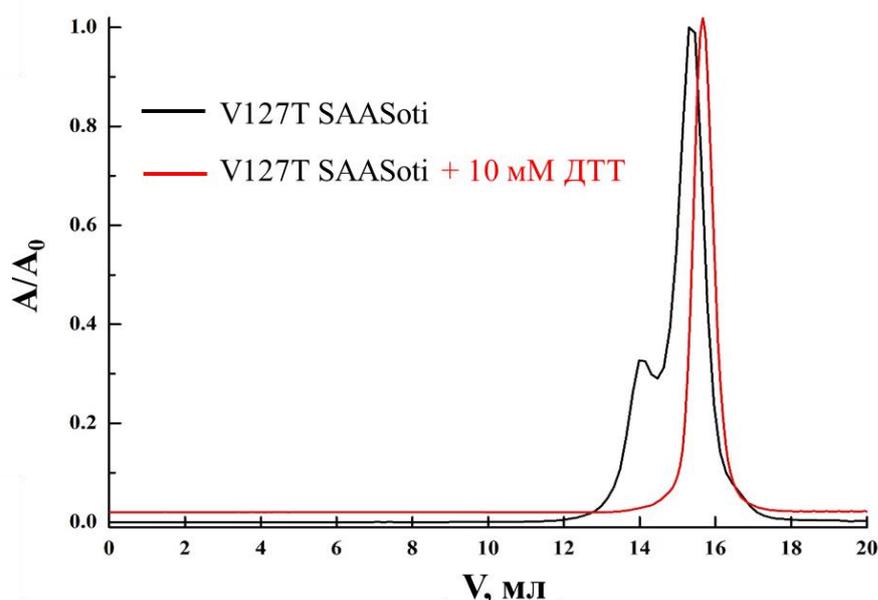


Рисунок 24. Гель-фильтрация образцов mSAASoti без (черная полоса) и с (красная полоса) добавлением дитиотреитола. Superdex G200 100/20 GL в буфере 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4. Детекция по поглощению на длине волны 509 нм.

Согласно 3D-модели структуры mSAASoti (Рисунок 25), которая была создана с использованием кристаллической структуры гомологичного белка IrisFP (PDB-код: 2VVH), боковые цепи 3 а.о. цистеина – C21, C71 и C117 – ориентированы наружу β -бочонка, причем остатки 21 и 117, предположительно, участвуют в образовании межмолекулярных S-S связей,

слабых ионных взаимодействиях и, таким образом, вносят вклад в формирование агрегатов более высокой молекулярной массы. На первом этапе было решено заменить остатки цистеина (C21 и C117) в диком типе белка SAASoti, так как они могут участвовать в формировании химических связей между субъединицами. Как видно на модели тетрамера SAASoti (Рисунок 25), остатки цистеина в положении 21 экспонированы в область, так называемого, гидрофобного интерфейса, замена V127T в котором ранее привела к мономеризации SAASoti [10]. Аминокислотный остаток C117 находится на поверхности уже самого тетрамера и не участвует в его формировании, но, возможно, отвечает за дальнейшую олигомеризацию тетрамеров в белке дикого типа.

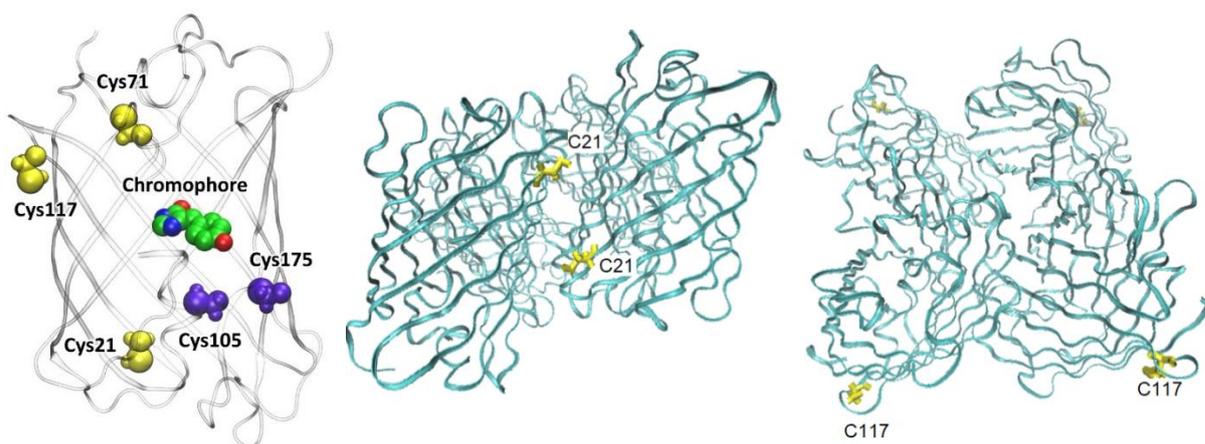


Рисунок 25. (Слева) 3D-модель структуры mSAASoti. Модель мономера с отмеченными а.о. цистеина. Окраска атомов хромофора соответствует элементам (зеленый – С, красный – О, синий – N). Остатки цистеина окрашены желтым, если SH-группа боковой цепи экспонирована на поверхности β -бочонка, сиреневым – в случае «внутренних» остатков. (Справа) 3D-модель структуры тетрамера с отмеченными а.о. C21 в гидрофобном интерфейсе и C117 на поверхности тетрамера.

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 (Таблица П2), а также при учете успешного опыта получения тох-вариантов белков Dendra2 [117] и

Marple3 [118]. 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 (Таблица 8). В случае варианта C117T/wt введенная замена, наоборот, привела к увеличению количества агрегатов большей молекулярной массы (Рисунок П2). 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 – V127T.

Таблица 8. Результаты аналитической эксклюзионной хроматографии для определения молекулярной массы мутантных форм SAASoti. V – удерживаемый объем, Mw – рассчитанная молекулярная масса. Анализ проводили с использованием системы АКТА Purifier 10 (GE Healthcare) на носителе Superdex 200 10/300 GL в 20 mM Tris-HCl 150 mM NaCl (pH 7,4) при скорости потока 0,5 мл/мин со спектрофотометрическим детектором на двух длинах волн (280нм/ 509 нм).

Белок	с, μM	V, мл	Mw, кДа
wt	20	7,4	2859
		11,3	330
		12,5	169
		14,2	67
		10,1	629
C21N/wt	65	11,1	374
		12,3	194
		14,1	70
		7,7	2842
		11,1	399
C117T/wt	50	12,7	177
		14,3	64
		15,4	36
		14,1	73
mSAASoti	220	15,7	30
		15,8	28
mSAASoti +ДТТ	220	15,7	30
C21N mSAASoti	354	15,8	28

Также следует отметить, что даже во время гидрофобной хроматографии образца C21N mSAASoti изменился профиль элюирования: хроматографический пик, соответствующий mSAASoti, был симметричной формы (Рисунок П1) в отличие от варианта mSAASoti. Как видно из результатов, представленных на Рисунке 26, 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.

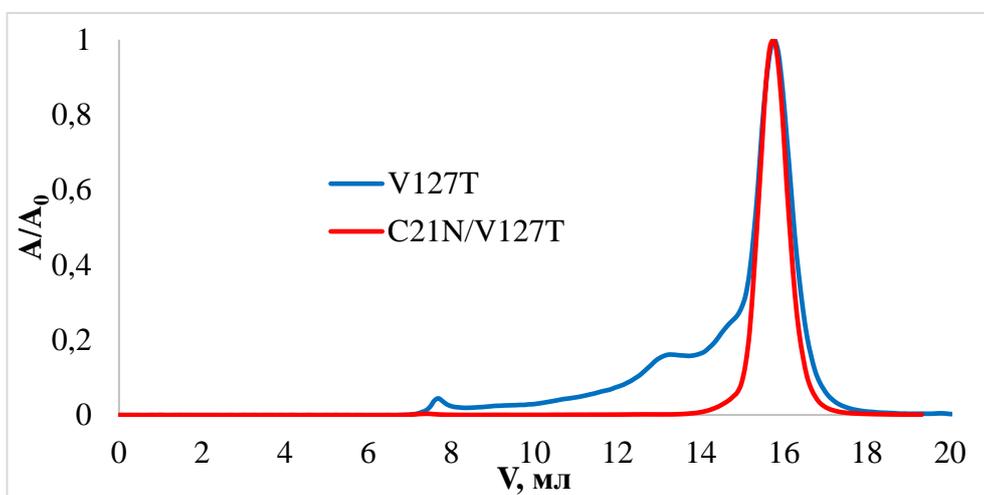


Рисунок 26. Эксклюзионная хроматография образцов V127T (прерывистая линия) и C21N/V127T (сплошная линия) SAASoti на носителе Superdex G200 100/20 GL в буфере 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4. Детекция по поглощению на длине волны 509 нм. Концентрация 0,22 мМ и 0,354 мМ для образцов V127T и C21N/V127T SAASoti, соответственно.

3.2.2. Анализ остатков цистеина, находящихся «внутри» β -бочонка SAASoti

Аминокислотные остатки цистеина могут также подвергаться фотоокислению и, тем самым, влиять на свойства фототрансформируемого белка, особенно при проведении последовательных многочисленных циклов облучения светом разной длины волны. Поэтому методом сайт-направленного мутагенеза были получены мутантные формы mSAASoti, содержащие единичные (C21N, C71V, C105V, C117S, C117T, C175A), двойные (C21N/C71V, C21N/C175A) и тройную (C21N/C71G/C175A) замены на основании анализа последовательностей гомологичных белков. 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 – C21N/C71V/C175A – привело к получению нефлуоресцирующего варианта mSAASoti, был проведен сайт-насыщенный мутагенез в положении 71, в результате которого получен вариант C21N/C71G/C175A с высокой яркостью. Для всех выделенных белков были определены основные физико-химические и флуоресцентные свойства. Как можно видеть из данных, приведенных в Таблице 9, точечные замены приводят к спектральному сдвигу красных форм, заметному возрастанию значений pKa красных форм, особенно для варианта C175A mSAASoti. Вариант C21N/C71V имеет наименьшее значение коэффициента молярной экстинкции, однако квантовый выход флуоресценции для новых форм практически не изменился.

Таблица 9. Основные физико-химические и флуоресцентные параметры полученных мутантных форм mSAASoti.

	$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$	pK _a	$\epsilon, *1000$ M ⁻¹ * cm ⁻¹	ϕ	яркость ($\phi * \epsilon$)
mSAASoti	509/519	6,3±0,1	75,0	0,59±0,02	44,3
	573/579	6,6±0,1	24,0		
C21N	509/519	6,4±0,1	82,4	0,61±0,02	50,3
	579/590	7,5±0,1			
C105V	509/519	6,5±0,1	61,0	0,60±0,02	36,6
	576/589	7,1±0,1			
C71V	509/519	6,5±0,1	65,1	0,63±0,04	41,0
	577/590	7,0±0,1			
C175A	509/519	6,7±0,1	80,1	0,55±0,05	44,0
	580/587	7,8±0,1			
C117S	509/519	6,2±0,1	66,3	0,54±0,03	35,8
	580/590	6,7±0,1			
C21N/C71V	509/519	6,3±0,1	48,9	0,58±0,02	28,4
	577/589	7,0±0,1			
C21N/C175A	509/519	6,3±0,1	65,4	0,55±0,03	36,0
	580/590	7,4±0,1	12,7		
C21N/C71G/C175A	509/519	6,4±0,1	83,8	0,60±0,02	50,3
	577/589	7,2±0,2	14,8		

Фотоконверсию из зеленой в красную форму проводили путем облучения растворов белков светом 400 нм и строили кинетические кривые по максимумам эмиссии красной формы (Рисунок 27). Кинетика образования

красной формы описывается биэкспоненциальной моделью (Уравнение 3), где первая компонента отвечает за образование красной формы, а вторая – за ее фотодеструкцию, c – фоновый сигнал.

$$I_{red}(t) = I * \frac{k_1}{k_2 - k_1} * (\exp(-k_1 * t) - \exp(-k_2 * t)) + c \quad (3)$$

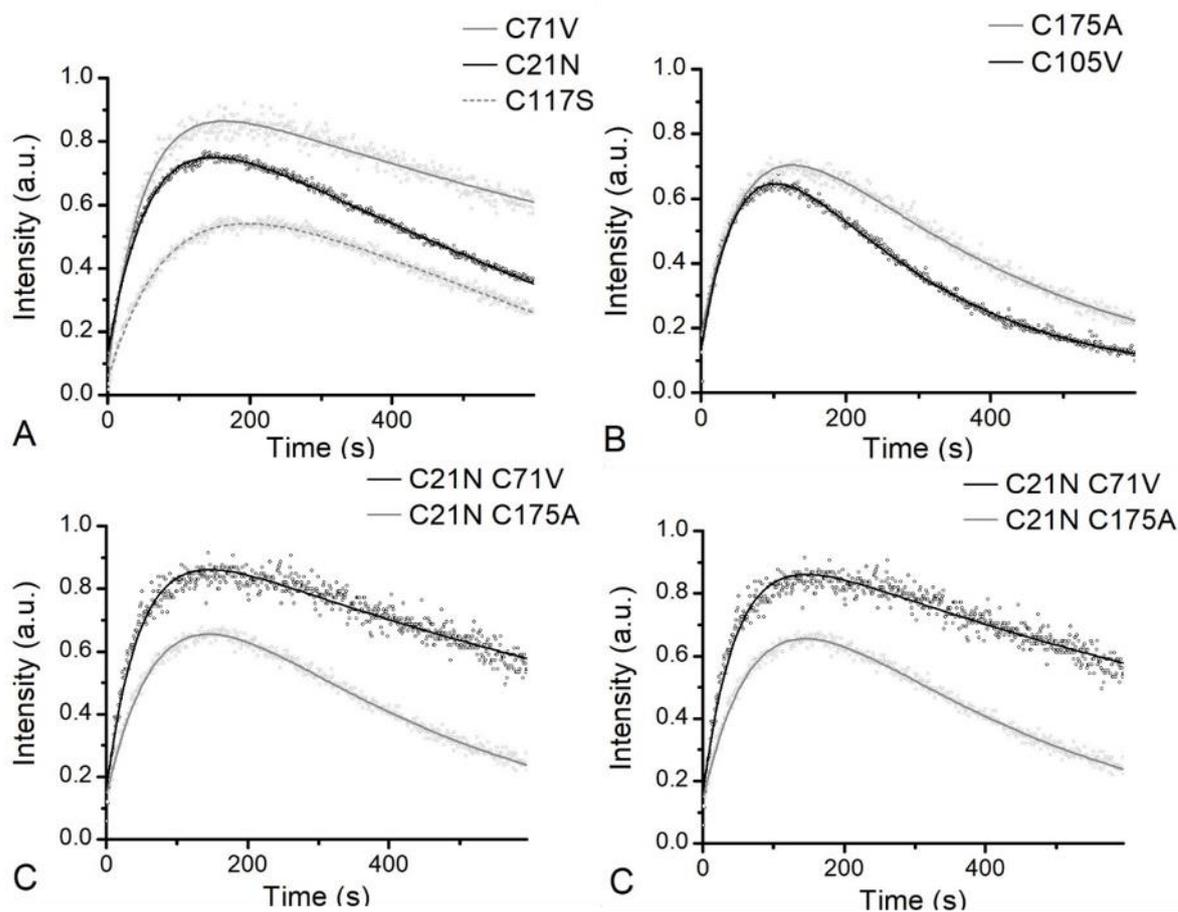


Рисунок 27. Кинетика фотоконверсии из зеленого в красный для различных мутантных форм mSAASoti ($\lambda_{em} = 590$ нм), зарегистрированная в течение 10 минут при освещении светом $\lambda=400$ нм (146 МВт/см²). Экспериментальные данные представлены в виде точек, фиттинг – в виде линий.

Как видно из констант скорости фотоконверсии, представленных в Таблице 11, 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). Остаток C71 находится, предположительно, на α -спирали в непосредственной близости от хромофора,

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 β -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 полученных мутантных форм mSAASoti изучали путем облучения растворов белков в кювете светом 470 нм в течение 10 минут и регистрировали спектры флуоресценции зеленой формы во времени, кинетику переключения изучали по максимумам эмиссии зеленой формы. Как говорилось ранее, механизм фотопереключения обусловлен фотоизомеризацией хромофора, сопряженной с изменением его протонированного состояния, поэтому последующее быстрое облучение светом 400 нм в течение 10 секунд приводит белок во флуоресцирующее состояние, так как протонированная форма поглощает при 400 нм, при этом образцы белков были в 20 мМ NaHCO₃ (pH 9,2) во избежание фотоконверсии. Вариант C105V продемонстрировал максимальную скорость переключения, в то время как варианты с заменой C175 переключались медленнее всего (Рисунок 28).

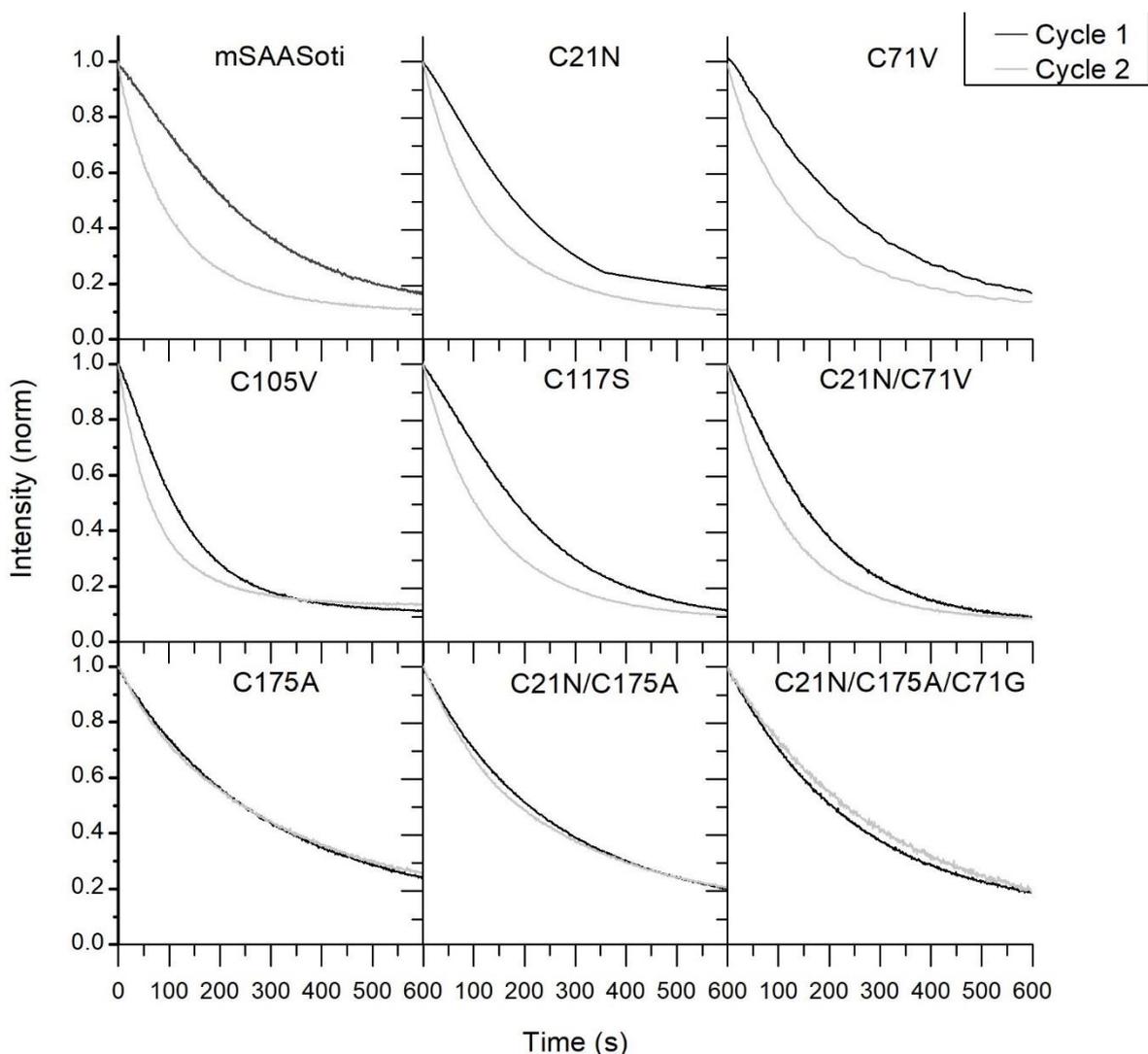


Рисунок 28. Кривые фотопереключения зеленой формы образцов mSAASoti, построенные по максимумам флуоресценции зеленой формы при облучении растворов белков в кювете светом 470 нм.

Для образца дикого типа, а также для всех образцов mSAASoti, не содержащих замену C175A, наблюдали спектральный сдвиг (1-3 нм) на спектрах эмиссии флуоресценции, возникающий в процессе облучения светом 470 нм (Рисунок 29 и Таблица 10).

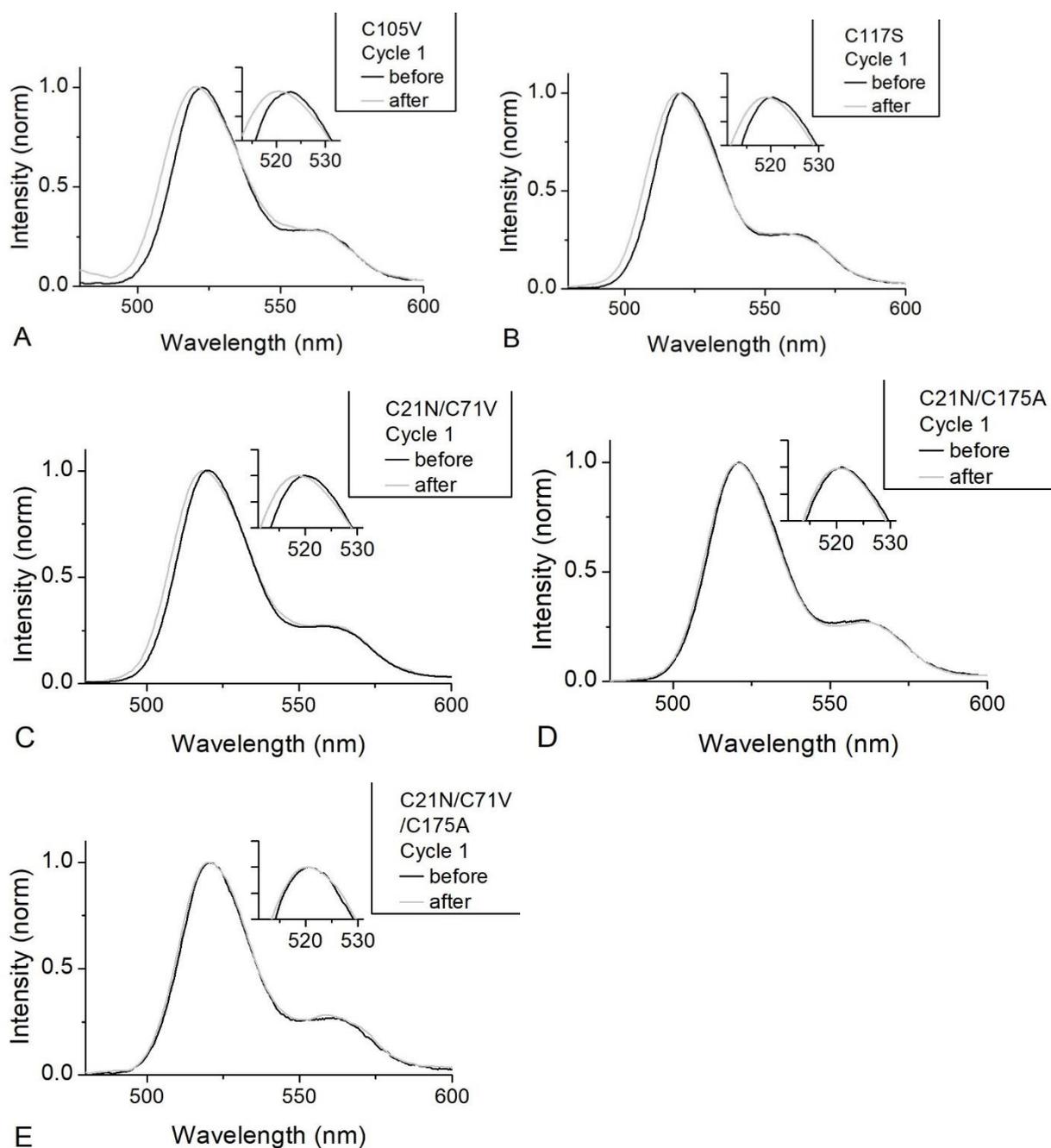


Рисунок 29. Спектры эмиссии флуоресценции зеленой формы до (черный) и после (серый) облучения светом 470 нм.

Таблица 10. Величина спектрального сдвига после 300 и 500 с облучения светом 470 нм.

$\Delta \max$	Цикл 1			Цикл 2	
	300 с (нм)	500 с (нм)	1 с (нм)	300 с (нм)	500 с (нм)
C21N	1,5	2,0	1,5	2,5	3,0
C105V	2,0	2,0	1,5	3,0	2,5
C117S	1,0	1,0	1,0	1,5	2,0
C21N/C71V	1,0	1,5	1,0	1,0	1,0
C175A	0,5	0,5	0,0	1,0	1,0
C21N/C175A	0,5	0,5	0,0	0,5	0,5
C21N/C71G/C175A	0,5	0,5	0,0	0,5	1,0

На Рисунке 30 представлены циклы последовательного облучения образцов светом 470 нм (10 мин) и 400 нм (10 с). Кинетика фотопереключения первого цикла отличается от последующих. Во всех случаях, за исключением вариантов, содержащих замену С175А, переключение в первом цикле происходит согласно Уравнению 4, в то время как во втором и последующих циклах – согласно Уравнению 5:

$$I = I_1 * \exp(-k_1 t) - I_2 * \exp(-k_2 t) + c \quad (4)$$

$$I = I_1 * \exp(-k_1 t) + I_2 * \exp(-k_2 t) + c \quad (5)$$

где k – константа скорости реакции, I – предэкспоненциальный множитель, c – фоновый и остаточный сигнал. Все рассчитанные константы для обоих циклов приведены в Таблице 11.

Также белки с заменой С175А имеют наибольшую степень фотодеструкции при переходе к последующим циклам. 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) и спектральный сдвиг. При проведении масс-спектрометрического анализа не удалось детектировать пептид с данным а.о. [123]

Термическую релаксацию изучали путем регистрации спектров поглощения предварительно «выключенных» (светом 470 нм) в темное состояние растворов белков во времени. Кинетика релаксации подчиняется моноэкспоненциальной модели (Уравнение 6).

$$A = A_0 * (1 - \exp(-k * t)) + c \quad (6)$$

Константы скорости релаксации представлены в Таблице 11 (Столбец Off-to-on переключение). Для белков с заменой С175А наблюдается самая медленная скорость релаксации, а самый быстрый переход наблюдался для белка дикого типа mSAASoti.

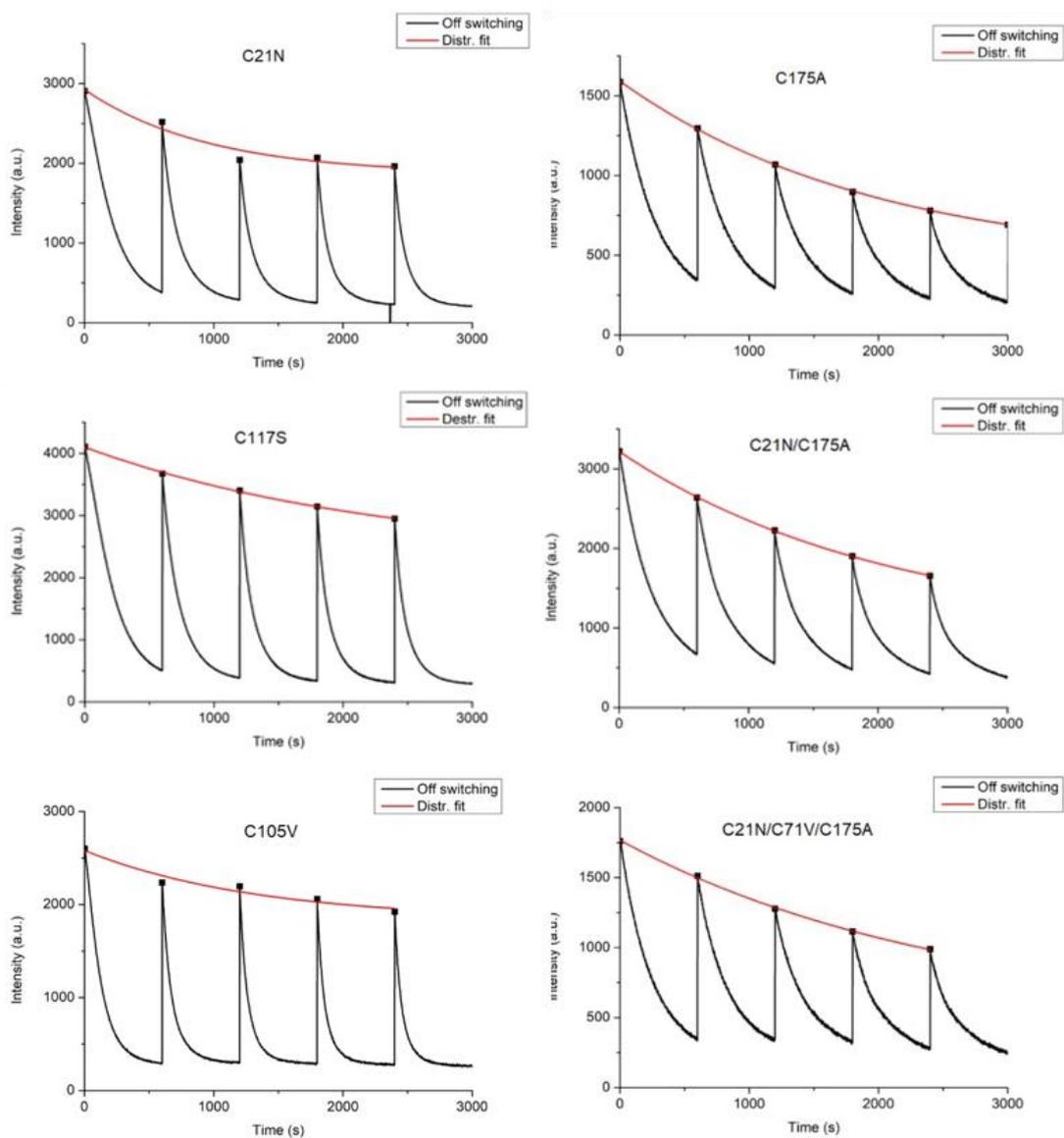


Рисунок 30. Циклы обратимого фотопереключения зеленой формы при облучении светом 470 нм (10 минут) с последующей регенерацией флуоресцентной формы (400 нм, 10 с).

Таблица 11. Кинетические параметры для on-off переключения, off-on и фотоконверсии из зеленого в красный, рассчитанные согласно Уравнениям 4, 5, 3, 6.

<i>SAASoti</i>	On-to-Off фотопереключение						Off-to-on переключение ^c	Фотоконверсия из зеленого в красный ^d	
	1 ^й Цикл ^a			2 ^й Цикл ^b				$k \cdot 10^3, c^{-1}$	$k_1 \cdot 10^3, c^{-1}$
	I_2/I_1	$k_1 \cdot 10^3, c^{-1}$	$k_2 \cdot 10^3, c^{-1}$	I_2/I_1	$k_1 \cdot 10^3, c^{-1}$	$k_2 \cdot 10^3, c^{-1}$			
mSAASoti	0,27	5,5±0,2	9,8±0,7	0,26	7,8±0,1	24,7±0,8	22±1	11±0,1	2±0,01
C21N	0,27	5,7±0,1	15,7±0,1	0,76	5,3±0,1	13,7±0,2	9,5±0,2	14±0,1	2±0,02
C21N/C71V	0,26	6,8±0,1	15,6±0,6	0,2	7,4±0,1	22,8±0,8	12,5±0,2	22±0,4	1±0,02
C71V	0,14	4,5±0,2	14,2±2,0	0,4	5,1±0,2	15±2	15,5±0,2	21±0,3	1±0,02
C105V	0,22	9,1±0,1	34,3±0,7	2,06	7,1±0,2	17,9±0,2	17,9±0,4	15±0,4	5±0,01
C117S	0,09	6,4±0,1	10,9±0,3	0,24	6,4±0,1	15,6±0,5	9,7±0,3	9±0,1	3±0,05
		1 ^й Цикл ^b			2 ^й Цикл ^b				
C175A		3,5±0,1		0,12	3,1±0,1	16±1	5,5±1,2	15±0,2	3±0,03
C21N/C175A	–	4,1±0,1	–	0,98	1,5±0,3	7,5±0,3	2,5±0,1	13±0,2	3±0,03
C21N/C71G/ C175A	–	4,0±0,1	–	–	4,4±0,1	–	4,5±0,1	46±2	9±0,1

^a согласно Уравнению 4

^b согласно Уравнению 5

^c согласно Уравнению 6

^d согласно Уравнению 3.

3.3. Получение кристаллической структуры белка SAASoti

3.3.1. Получение мутантной формы mSAASoti для последующих структурных исследований

Как отмечалось ранее, дикий тип SAASoti – агрегированный белок, имеющий также примесь тетрамерной формы. При концентрировании очищенного препарата белка до значений, необходимых для получения кристаллов (10 мг/мл), белок дикого типа SAASoti выпадает в аморфный осадок. На основании данных, полученных ранее [10], на первом этапе было предложено получить кристаллические структуры вариантов mSAASoti и C21N mSAASoti. Белки были наработаны в клетках BL21 (DE3) *E. coli*, выделены и очищены методами гидрофобной и анионо-обменной хроматографии и переданы для дальнейшего кристаллизационного скрининга. Однако, эти эксперименты не привели к получению кристаллов. Предположительно, введение замены V127T, необходимой для получения мономерной формы, разрушает взаимодействия в тетрамере, которые необходимы для упаковки белка в кристалле. Поэтому была проанализирована модель тетрамера SAASoti, созданная на основе структуры белка Kaede (PDB-код: 2GW3). Как обсуждалось ранее [10], поверхность SAASoti содержит избыточное по сравнению с гомологичными белками количество остатков лизина на поверхности, боковые цепи остатков 145, 149, 172 ориентированы внутрь тетрамера, поэтому их замена может повлиять на его устойчивое образование. В работе [10] было показано, что варианты K145E и K145N – устойчивые тетрамеры, замена K172N привела к дальнейшей олигомеризации тетрамеров в агрегаты большей молекулярной массы, при этом примесь тетрамера минимальная. По данным FCS [10], полученным в лаборатории физической биохимии, K145E – устойчивый тетрамер в нМ концентрации, однако, в белке с двойной заменой K145E/V127T отсутствует созревание хромофора. При концентрировании очищенного препарата белка K145E SAASoti с использованием центрифужного концентратора был обнаружен осадок на мембране. В положении 145 у гомологичных белков находится

остаток пролина и, реже, аланина. Предположительно, он имеет стерические ограничения с соседней субъединицей, поэтому были получены мутантные формы K145A и K145P. Также на основании данных литературы по гомологичным белкам были выбраны замены и методом сайт-направленного мутагенеза получены следующие мутантные формы SAASoti: K112T, K112S, K114Q и K114E. Все мутантные формы были выделены и очищены, после чего методом эксклюзионной хроматографии оценили их агрегатное состояние в растворе. Как видно из хроматограммы, представленной на Рисунке 31, замена K145P единственная привела к увеличению доли тетрамера в смеси ($V=14$ мл), при этом в растворе также наблюдаются формы большей молекулярной массы и агрегаты. Примечательно, что в случае K114E SAASoti большая часть белка находится в растворе в форме октамера, но при этом присутствует примесь мономера. При хранении в темноте при температуре $+4$ °C был обнаружен осадок белка K114E. Таким образом, не удалось получить тетрамерную форму SAASoti, подходящую для условий кристаллизации, так как даже в нМ концентрации присутствуют фракции более высокого молекулярного состояния.

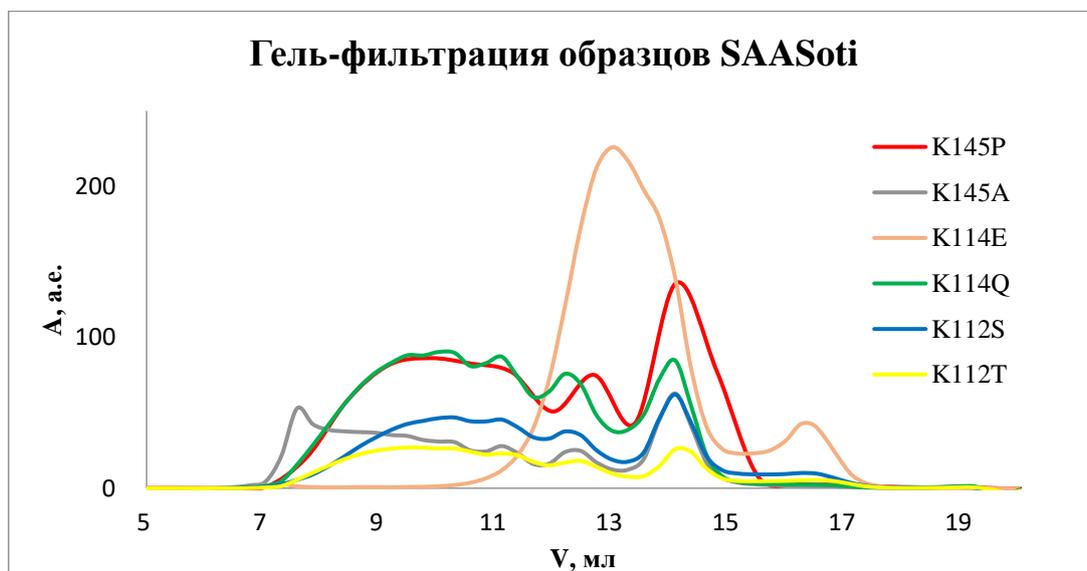


Рисунок 31. Гель-фильтрация образцов SAASoti на носителе Superdex G200 100/20 GL в буфере 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4. Детекция по поглощению на длине волны 509 нм.

Однако, следует отметить, что клетки *E. coli*, экспрессирующие форму K145P SAASoti имели яркую лимонно-желтую окраску, что, возможно, обусловлено увеличением скорости созревания хромофора или увеличением доли созревшей формы хромофора.

Из литературы известно, что чаще последовательность из нескольких а.о. гистидина отрицательно сказывается на растворимости белка и как следствие на кристаллизации [136, 137]. Однако этот эффект сильно зависит от природы белка и иногда может способствовать кристаллизации за счет образования новых взаимодействий [138].

Следующий этап работы включал получение форм mSAASoti, содержащих последовательность из 6 а.о. гистидина. Было решено оставить замену V127T, отвечающую за мономеризацию. Так, получены две конструкции на основе белков mSAASoti и C21N mSAASoti, содержащие последовательность из 6 а.о. гистидина на N- и C-концах флуоресцентного белка, и клонированы в векторы pEt21d и pEt22b, соответственно. После подтверждающего секвенирования конструкции были трансформированы в клетки BL21 (DE3) *E. coli* и соответствующие белки были наработаны стандартным методом. Мутантные формы mSAASoti с гистидином на N-конце не созревали в клетках (отсутствие цвета и флуоресценции), качественный гель-электрофорез по Лэммли образцов до и после индукции показал, что белок в клетках экспрессируется, однако, хромофор не созревает. В литературе описано отрицательное влияние на экспрессию GFP с гистидиновым тегом на N-конце [139]. Вариант с тегом на C-конце, напротив, созревал в клетках *E. coli*. Белки mSAASoti и C21N mSAASoti, содержащие последовательность из 6 а.о. гистидина, были выделены и очищены металло-хелатной и последующей анионо-обменной хроматографиями. После концентрирования белков был поставлен кристаллизационный скрининг методом диффузии в парах. Кристаллы выращивали в течение месяца при температуре 4 °C. Кристаллы наблюдали только в случае белка C21N-mSAASoti-His.

Кристаллическая структура белка C21N mSAASoti-His в его включенном зеленом состоянии была получена с разрешением 3,0 Å. Анализ кристаллических контактов показал, что C21N mSAASoti является мономером, что подтверждается биохимическими данными (Рисунок 26). C21N mSAASoti имеет типичную для флуоресцентных белков структуру β-бочонка 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. Кислород карбонильной группы хромофора связан водородом с боковой цепью H120, в то время как кислород имидазольного фрагмента связан боковой цепью с двумя остатками 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 32). Наложение структур белков C21N mSAASoti и IrisFP (PDB-код 2VVH) демонстрирует сходную конформацию остатков, координирующих хромофор.

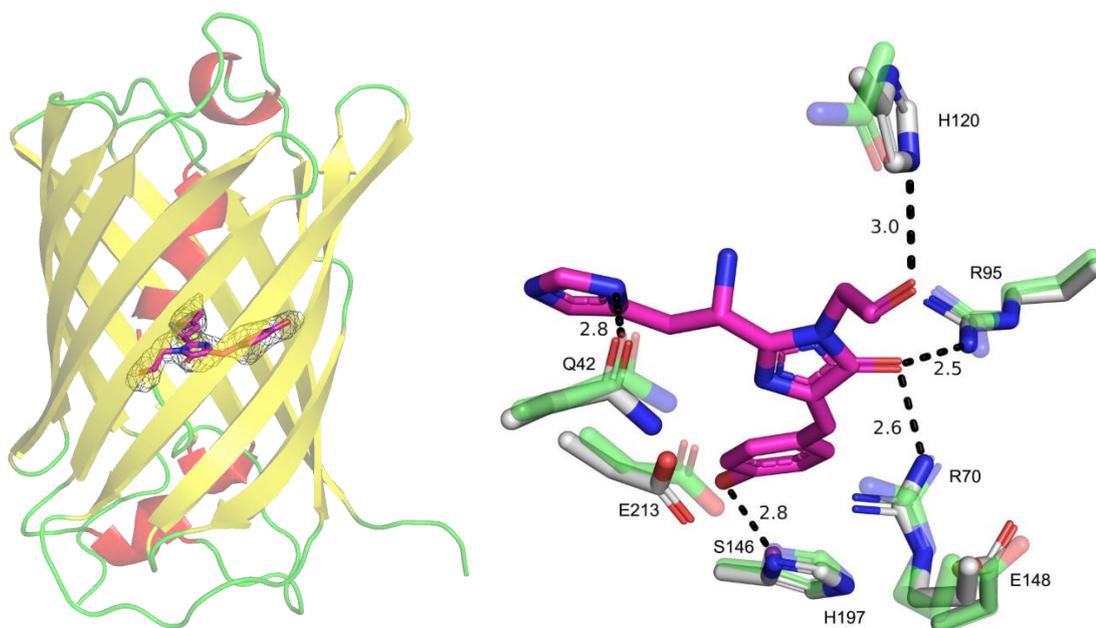


Рисунок 32. Кристаллическая структура белка C21N mSAASoti. (Слева) Окрашивание белка по вторичной структуре. Электронная плотность хромофора (3σ) показана в виде серой сетки. (Справа) Наложение структуры флуоресцентных белков C21N mSAASoti (белый цвет) и IrisFP, PDB-код 2VVH, (зеленый цвет) вблизи хромофора.

3.4. Молекулярное моделирование вариантов mSAASoti, содержащих замены аминокислотных остатков цистеина

3.4.1. Увеличение pKa хромофора красной формы

Остаток C21 находится на удалении от хромофора, его боковая цепь ориентирована в раствор. Экспериментально было установлено, что кинетические параметры фотопереключения аналогичны с белком SAASoti дикого типа. Однако, было отмечено значительное изменение величины pKa красной формы в сторону более высоких значений pH. Для установления причин, ответственных за изменения значения pKa красной формы от 6,6 до 7,5 при введении замены C21N, было проведено молекулярно-динамическое моделирование с потенциалами КМ/ММ красных форм обоих вариантов белков (mSAASoti и C21N mSAASoti). Анионная форма хромофора имеет две таутомерные формы (Рисунок 33). Значение pKa хромофора должно уменьшаться, если равновесие смещается в сторону формы с отрицательным зарядом на фенольном атоме кислорода. Было проанализировано динамическое поведение хромофора в обеих таутомерных формах и изучена

корреляция геометрического параметра R (C-O) – длины ковалентной связи, при этом отрицательный заряд находится на атоме кислорода, порядок связи вычисляется из лапласиана электронной плотности и заряда NBO (Natural Bond Orbital). Среднее расстояние C-O в фенильном фрагменте хромофора составляет 1,261 Å и 1,255 Å для белков mSAASoti и C21N mSAASoti, соответственно. Из траекторий молекулярной динамики были извлечены несколько кадров для оценки величин, основанных на электронной плотности и ответственных за изменения в величинах pK_a . На Рисунке 33 показана корреляция между зарядом NBO и параметром R (длина связи C-O). Увеличение расстояния ковалентной связи приводит к смещению заряда NBO к более отрицательным значениям. Таким образом, MD-структуры с большей длиной связи имеют меньший отрицательный заряд на атоме кислорода и имеют меньшее сродство к протонированию; другими словами, они должны иметь более высокие значения pK_a . Другой критерий – порядок связей Лапласиана (LBO) – учитывает различные особенности связи, включая полярность связи. Уменьшение LBO является мерой увеличения полярности связи, вследствие чего она увеличивается с увеличением расстояния C-O, что согласуется с другими результатами вычислений. Таким образом, изучение локальных свойств хромофора помогает понять вариации pK_a , вызванные даже отдаленными мутациями аминокислот.

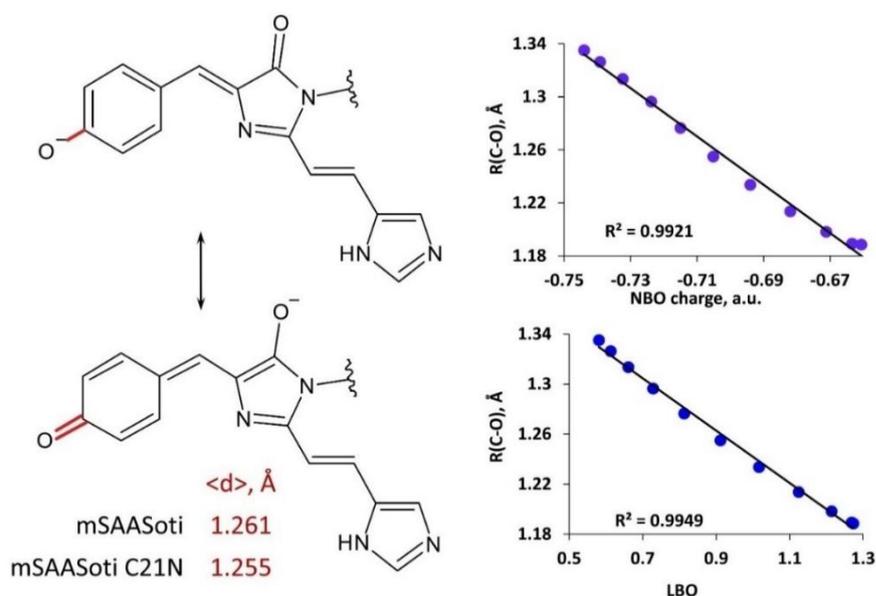


Рисунок 33. Две таутомерные формы анионной формы хромофора. Изучаемая связь С-О выделена красным (сверху). Корреляция между параметрами, связанными с электронной плотностью, NBO (слева), LBO (справа) и длиной связи С-О.

3.4.2. Влияние замены С175А на скорость релаксации зеленой формы

Согласно результатам экспериментальных исследований, единичная мутация С175А приводит к наиболее выраженному снижению скорости релаксации зеленой формы из темного во флуоресцентное состояние (Таблица 11). Чтобы понять происхождение, было проведено *классическое молекулярно-динамическое моделирование* вариантов mSAASoti и С175А mSAASoti (по 200 нс каждое). Сравнение динамического поведения обеих этих систем было проведено путем анализа кросс-корреляционных карт, RMSD и гибкости аминокислотных остатков в хромофорной области (Рисунок 34). Движения остатков в белке mSAASoti более коррелированы по сравнению с вариантом С175А. Это хорошо видно по более интенсивной окраске пикселей в массе, соответствующей более высоким абсолютным значениям парных корреляций. Было выполнено выравнивание всех тяжелых атомов из всех MD-фреймов для обоих белков. Стандартное отклонение RMSD, рассчитанное только для основных атомов, меньше в белке mSAASoti, что указывает на то, что белковая складка в нем более жесткая. Напротив, 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 обнаружено, что остаток F177 ведет себя по-разному в этих двух белках (Рисунок 34). 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 (0,5 Å). 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.

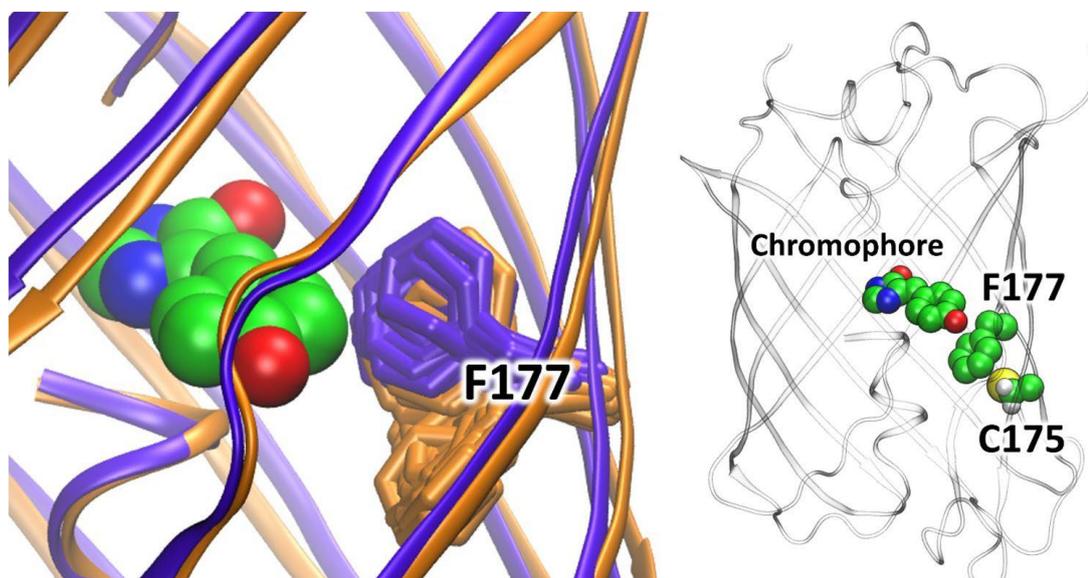


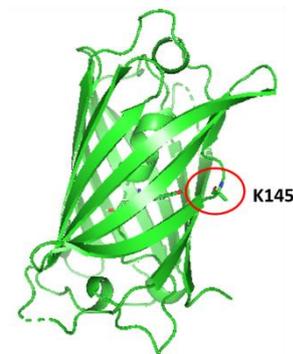
Рисунок 34. Выравнивание молекулярных моделей белков WT (оранжевый) и C175A (фиолетовый) SAASoti.

3.5. Получение яркой формы mSAASoti

Выравнивание последовательности mSAASoti с другими фотоконвертируемыми белками выявило, что в положении 145 (нумерация по mSAASoti) в случае гомологичных белков находится достаточно консервативный остаток пролина (Таблица 12).

Таблица 12. Выравнивание первичной структуры некоторых фотоконвертируемых белков

ФБ	Аминокислотная последовательность		
	130	140	150
SAASoti	...PADGPVMQRKTIQWEK	SIEKMTVSDGIVKG...	
Dendra2	...PPNGPVMQKKTLLKWE	PSTEKLHVRDGLLVG...	
Dronpa	...PANGPVMQKRTVKWE	PSTEKLYVRDGVVKG...	
Kaede	...PPNGPVMQKKTLLKWE	ASTEKMYLRDGVVLTG...	
EosFP	...PANGPVMQKKTLLKWE	PSTEKMYVRDGVVLTG...	



В случае белков семейства Dronpa [59] замена в данном положении привела к значительному увеличению яркости флуоресцентного белка (а также коэффициента экстинкции). Аминокислотный остаток P145 расположен на формирующем β -бочонок тяже, а именно – в месте его неструктурированного перегиба, характерном для белков данного типа. Вероятно, наличие пролина в этом положении необходимо для поддержания жесткой структуры. Методом сайт-направленного мутагенеза была получена и выделена мутантная форма K145P mSAASoti, охарактеризованы ее физико-химические свойства. Увеличение яркости было отмечено уже на этапе экспрессии белка K145P mSAASoti в клетках *E.coli* BL21 (DE3). На стадии выделения и очистки белка из лизата бактерий было отмечено, что элюируемые фракции как после гидрофобной хроматографии, так и после анионообменной обладают большей гомогенностью по сравнению с mSAASoti.

Как видно из данных, представленных в Таблице 13, добавление замены K145P привело к увеличению коэффициента молярной экстинкции для зеленой формы, в то время как красная форма приобрела более низкое значение. Как известно, в растворе флуоресцентный белок может находиться в нескольких формах, а замена K145P сама по себе могла изменить равновесие между ними, увеличив при этом долю белка с правильно созревшим хромофором.

Таблица 13. Физико-химические и флуоресцентные параметры белков K145P и mSAASoti

	mSAASoti	K145P
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (зел.)	509/ 519	509/518
$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ (красн.)	578/ 589	578/ 589
$\epsilon, M^{-1} * cm^{-1} / 1000$ (зел.)	75,0	87,8
$\epsilon, M^{-1} * cm^{-1} / 1000$ (красн.)	24,0	20,5
pKa зеленой формы	6,3±0,1	5,7±0,1
pKa красной формы	6,6±0,1	6,7±0,1

3.6. Получение мутантных форм mSAASoti с повышенной скоростью фотопереключения

Как говорилось ранее, флуоресцентный белок mSAASoti является единственным описанным на данный момент бифотохромным флуоресцентным белком дикого типа, в то время как остальные гомологичные белки были получены путем замены аминокислотных остатков M163 или F177. Авторы [60] объясняли этот факт увеличением конформационной подвижности хромофора и изменением цепи взаимодействий между остатками вблизи хромофора, при этом в случае mSAASoti фенилаланин и метионин занимают эти же положения (Таблица П1). Однако, в случае mSAASoti обратимо переключаться в темное состояние может только зеленая форма. В связи с этим было интересно узнать, как изменятся флуоресцентные характеристики mSAASoti после введения аналогичных замен.

При наложении структур бифотохромного флуоресцентного белка IrisFP [60] (PDB-код: 2VVH), находящегося во флуоресцентной форме и *цис*-конформации хромофора, и структуры C21N mSAASoti было установлено, что ключевые аминокислотные остатки, стабилизирующие хромофор (S146, H197, M163, F177, C175), находятся в тех же положениях в случае mSAASoti (Рисунок 32).

3.6.1. Характеристика физико-химических и флуоресцентных параметров мутантных форм с заменами в положении 163 и 177

Для получения форм mSAASoti с повышенной скоростью фотопереключения методом рационального и сайт-насыщенного мутагенеза были получены мутантные формы mSAASoti, содержащие замены в положениях 163 и 177. В качестве исходной матрицы были использованы варианты C21N, K145P и mSAASoti. Также были получены мутантные формы с комбинациями этих замен. Все формы, полученные сайт-направленным мутагенезом, были экспрессированы в клетках *E. coli* BL21(DE3), выделены, очищены и проанализированы их флуоресцентные параметры. Ранее планировалось вводить также замену C105V (максимальная скорость фотопереключения для всех вариантов с заменой цистеинов), однако во время экспрессии белков в клетках *E. coli* наблюдали значительное уменьшение флуоресцентного сигнала, при этом коэффициент молярной экстинкции изменился не критично, что, наиболее вероятно, связано с замедлением скорости созревания хромофора в клетках. Замена K145P, напротив, ускорила созревание хромофора и привела к получению более яркой формы. Замена C21N была выбрана как положительно влияющая на агрегатное состояние белка при повышенных концентрациях, а также привела к удалению реакционноспособных остатков с поверхности белка. После сайт-насыщенного мутагенеза с помощью собранной установки, позволяющей облучать колонии клеток светом разной длины волны и регистрировать эмиссию флуоресценции, проводили селекцию наиболее перспективных с точки зрения флуоресцентных параметров белков, после чего выделяли соответствующие плазмидные ДНК и отдавали на секвенирование (ООО «Евроген»). В Таблице 14 представлен полный перечень всех полученных мутантных форм mSAASoti.

После флуоресцентного скрининга часть мутантных форм mSAASoti выделили, очистили хроматографическими методами и охарактеризовали основные физико-химические и флуоресцентные параметры (коэффициент

молярной экстинкции (ϵ), $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, pKa). При экспрессии в клетках *E.coli* белков с заменой F177S mSAASoti была отмечена высокая яркость, однако, увеличение коэффициента экстинкции при этом не было измерено. Как видно из Рисунка 16 (Материалы и методы), в случае замены F177S это не связано с увеличением количества экспрессируемого белка, однако, могло повлиять на созревание хромофора и увеличение доли созревшего белка. Замены аминокислотных остатков в положениях 163 и 177 во всех комбинациях отразились на спектрах возбуждения и эмиссии флуоресценции, во всех белках наблюдался сдвиг в более коротковолновую область и изменение формы (уширение пиков) спектров (Рисунок 35).

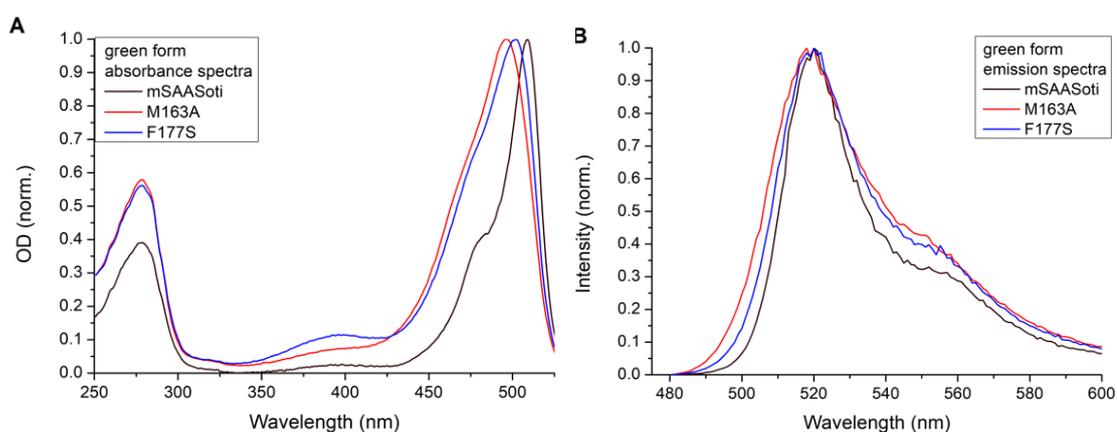


Рисунок 35. Нормированные спектры поглощения (A) и эмиссии флуоресценции (B) для мутантных форм mSAASoti, M163A и F177S, зарегистрированные в буфере 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4 при использовании приборов Cary 60 и Cary Eclipse, соответственно.

3.6.2. Причина уширения спектров поглощения

Было проведено молекулярно-динамическое моделирование с использованием потенциалов КМ/ММ, чтобы объяснить происхождение уширения полосы поглощения вариантов M163A и F177S mSAASoti по сравнению с mSAASoti. Уже было показано для флуоресцентных белков с хромофором типа GFP, что величина изменения длины связи (BLA – bond length alteration – разница между длинами связей C-C в мостике C=C-C хромофора, Рисунок 36) коррелирует с максимумом полосы поглощения [140, 142]. 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 36) отвечает за более эффективную *цис-транс*-изомеризацию, что экспериментально наблюдается для M163A и F177S по сравнению с mSAASoti.

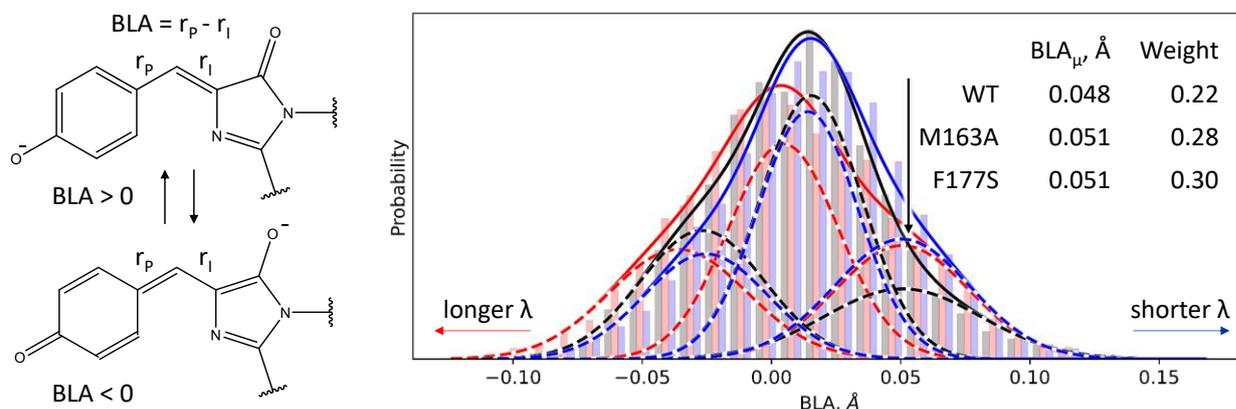


Рисунок 36. Изменение длины связи (BLA) в хромофоре типа GFP и его распределение в зеленой анионной форме mSAASoti (черные полосы и линии) и его вариантах M163A (красные полосы и линии) и F177S (синие полосы и линии). Фиттинг каждого распределения выполняется для трех гауссиан; веса и средние значения, соответствующие наиболее смещенной вправо составляющей для каждой модели, показаны и отмечены стрелкой.

3.6.3. Изучение обратимого переключения полученных мутантных форм mSAASoti

Новые мутантные формы были изучены в реакции обратимого переключения зеленой и красной форм. Для этого либо колонии клеток *E. coli*, экспрессирующие различные мутантные формы, либо выделенные белки (в растворе) облучали светом соответствующей длины волны. Кривые обратимого фотопереключения строили по максимумам интенсивности эмиссии флуоресценции и проводили кинетический анализ. В Таблице 14 значения в двух последних столбцах представляют собой константы фотопереключения зеленой формы (или красной, в последнем столбце), нормированные на константу переключения зеленой формы дикого типа mSAASoti и рассчитанные по Уравнению 7:

$$k_{\text{выкл норм}} = \frac{(A'_1 * k_1 + A'_2 * k_2)}{(A_1 + A_2) * k_{\text{выкл (mSAASoti)}}} \quad (7)$$

Данная нормировка была использована для удобного сравнения скорости переключения между различными мутантными формами mSAASoti и белком дикого типа. Как и предполагалось ранее, введение замен в положениях 163 и 177, действительно, приводит к ускорению реакции фотопереключения зеленой формы и появлению переключения для красной формы хромофора. 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. Интересно, что наибольшую скорость продемонстрировали варианты C21N/M163T и C21N/K145P/M163A (скорость переключения превышает mSAASoti в 33 и 36 раз, соответственно). Для вариантов C21N/M163A и M163A константа скорости в 17 и 13 раз больше, соответственно. В случае белков M163A, C21N/M163T и F177S mSAASoti константа красной формы была нормирована на константу переключения зеленой формы mSAASoti и отношение плотностей мощности облучения, т.к. красная форма дикого типа mSAASoti не переключается.

Таблица 14. Основные флуоресцентные параметры для всех быстропереключаемых вариантов mSAASoti.

форма	λ_{ex} зел./кр., нм	λ_{em} зел./кр., нм	ϵ зел./кр. /1000 M ⁻¹ *см ⁻¹	pKa зел./кр.	к зел выкл_ норм	к кр выкл_ норм
mSAASoti	509/578	519/589	75/24	6,3/6,6	1,0	
C21N	509/579	519/590	82/25,4	6,4/7,5	1,0	
K145P	509/578	578/589	88/20,5*	5,7/6,7	1,0	
C21N/K145P	509/578	519/589	87/16*	5,8/6,7	1,1	
M163A	496/560	519/587	62/0,3*	6,7/7,5	13,1	1,9
C21N/M163A					17,3*	
C21N/M163S					19,3*	
C21N/M163L					21,3*	
C21N/M163T	498/565	516/580	53,5/12,6	5,9/7,2	33,0	14,9
C21N/M163G	496/558	516/581	50/5,3*	5,6/7,0	22,0	
C21N/K145P/M163A	494/-	515/-	43/-	6,2/-	36,1	
C21N/K145P/M163F					0,73*	
C21N/K145P/M163C					13,6*	
C21N/K145P/M163I					15,5*	
C21N/K145P/M163V					13,6*	
C21N/K145P/M163P					1,1*	
F177S	501/560	519/588	51/1*	6,8/7,8	9,8	9,2
C21N/F177S	502/568	518/587	47/3*	6,7/7,7	9,0*	
C21N/F177A	503/566	518/588	42/3*	6,3/7,7	10,3	
C21N/F177N	503/564	517/587	55/4*	6,2/7,8	9,7	
C21N/F177T	506/573	518/588	66/4,5*	6,2/7,6	6,7	
C21N/K145P/F177S	501/568	518/584	47/0,3*	6,3/	9,8	
C21N/K145P/F177T					4,3*	
C21N/K145P/F177L					1,0*	
C21N/K145P/F177C					4,7*	
C21N/K145P/F177Q					3,2*	
C21N/K145P/F177G					1,8*	
C21N/K145P/M163A /F177S	496/	516/	46/3,2*	6,0/	13,4	

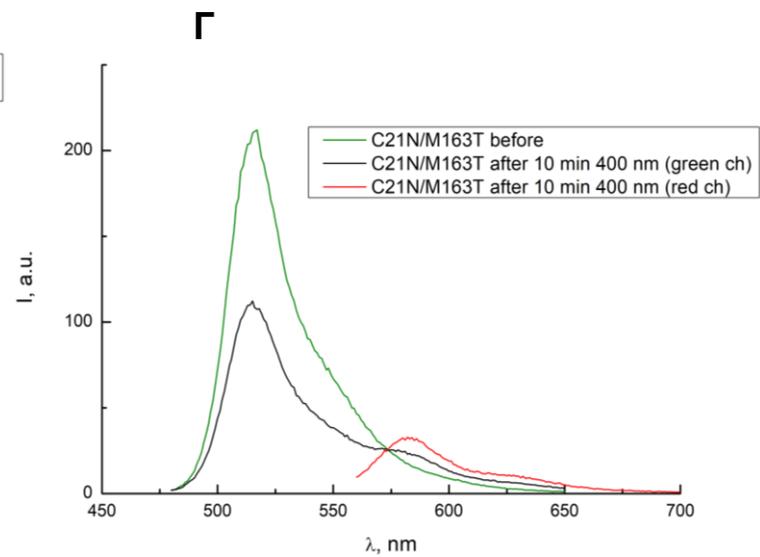
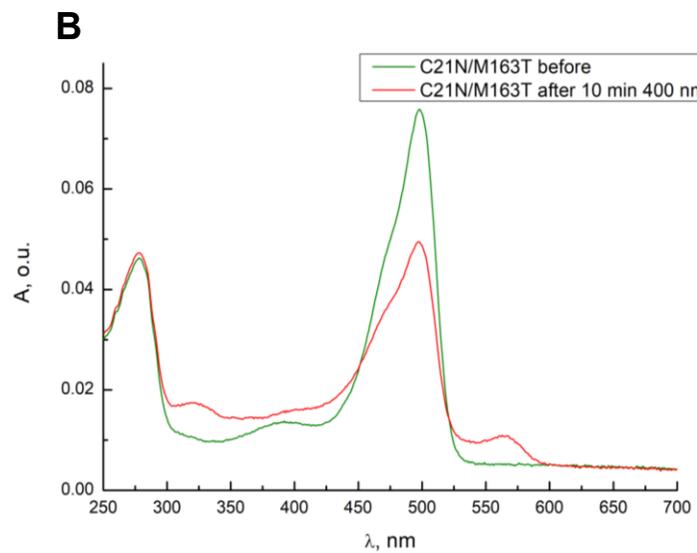
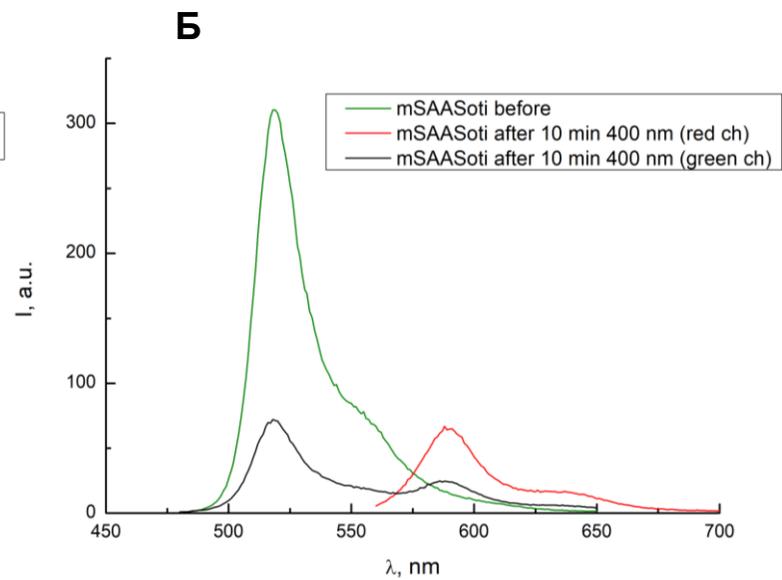
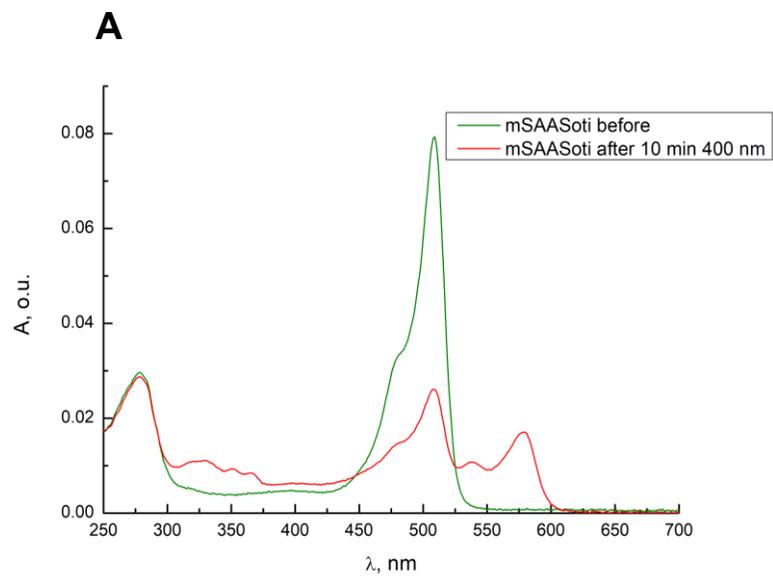
Не удалось детектировать фотоконверсию из зеленого в красный для белка C21N/K145P/M163A. Несмотря на то, что в случае белка M163A величина pKa сильно смещена, эмиссию флуоресценции можно регистрировать, в то же время красная форма C21N/M163T регистрируется лучше, ее удалось охарактеризовать, и она также сравнительно быстро переключается. Интересно, что замена на остаток треонина, чья боковая цепь занимает больший объем, чем в случае аланина, позволила максимально ускорить переключение (а близкий по структуре серин в C21N/M163S – ускорение в 19,3 раза). Также для C21N/M163T наблюдали лучший контраст между on- и off-формами, что является положительным качеством с точки зрения использования в методах супер-разрешающей микроскопии. На

данный момент вариант C21N/M163T был выбран как наиболее перспективный бифотохромный вариант mSAASoti. Примечательно, что комбинация замен M163A/F177S (в белке C21N/K145P) не приводит к еще большему ускорению фотопереключения, константа скорости переключения варианта C21N/K145P/M163A/F177S больше, чем в белке дикого типа, лишь в 13,4 раза, в то время как для C21N/K145P/M163A и C21N/K145P/F177S – в 36,1 и в 9,8, соответственно.

* * *

Таким образом, в результате флуоресцентного скрининга для последующего анализа в клетках млекопитающих были отобраны следующие белки mSAASoti: C21N/M163T, C21N/M163A и C21N/F177S. Для выбранных образцов были получены спектры поглощения и эмиссии флуоресценции для всех типов фотопревращений. Для исследования реакции фотоконверсии из зеленого в красный растворы белков облучали в кювете светом 390 нм и сразу регистрировали спектры поглощения и эмиссии флуоресценции. Как видно на спектрах поглощения, представленных на Рисунке 37, облучение фиолетовым светом приводит к уменьшению поглощения максимума зеленой анионной формы – 509, 498 и 502 нм – и увеличению поглощения в области красной формы – 578, 565 и 568 нм – для mSAASoti, C21N/M163T и C21N/F177S, соответственно. В случае белков C21N/M163T и, особенно, C21N/F177S наблюдается также увеличение поглощения в области 450 нм, что соответствует протонированной форме красного хромофора и объясняет увеличение значения r_{Ka} красной формы хромофора. Образцы белков до и после фотоконверсии в результате облучения светом 390 нм были проанализированы также методом гель-электрофореза по Лэммли ввиду того, что реакция фотоконверсии представляет собой фотохимический процесс, сопряженный с разрывом пептидной цепи. Как видно после визуализации белков полос (Рисунок 38), введение замены M163T негативно влияет на процесс фотоконверсии (минимальный % разрыва пептидной цепи среди всех образцов), однако, такого количества красной формы оказалось достаточно

для проведения реакции обратимого фотопереключения. Спектры поглощения (Рисунок 39) зеленой и красной форм регистрировали до и сразу после облучения светом 470 и 550 нм, соответственно. На спектрах поглощения зеленой формы заметно увеличение поглощения протонированной зеленой формы в области 390 нм и уменьшение поглощения анионной формы хромофора. Облучение фотоконвертированных белков (красной формы) светом 550 нм также приводит к уменьшению поглощения в области 570 нм (анионная красная форма).



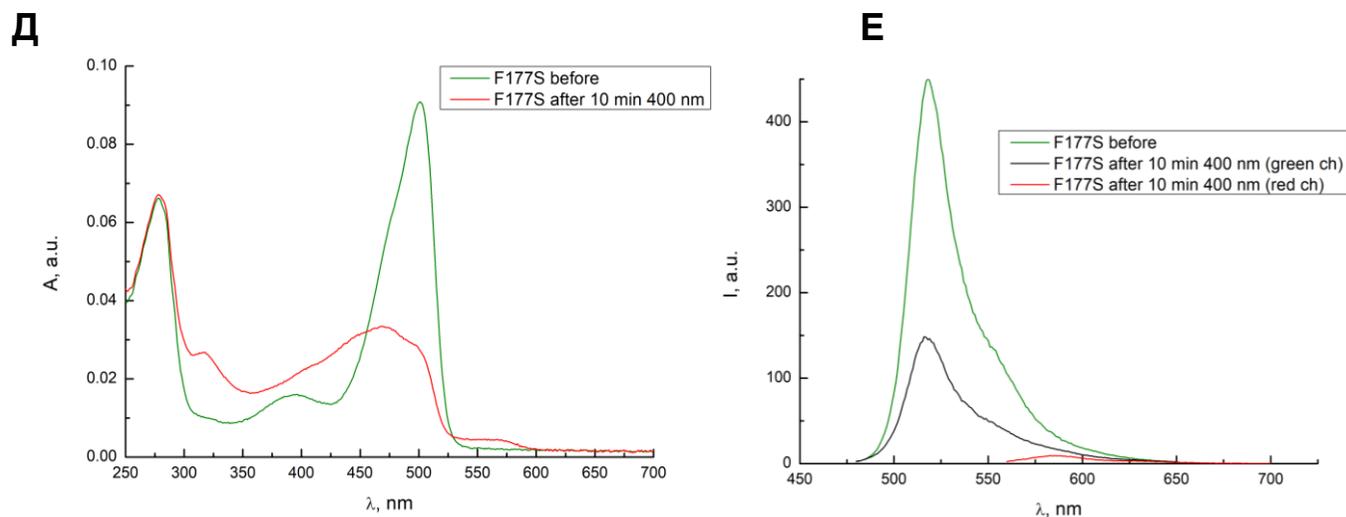
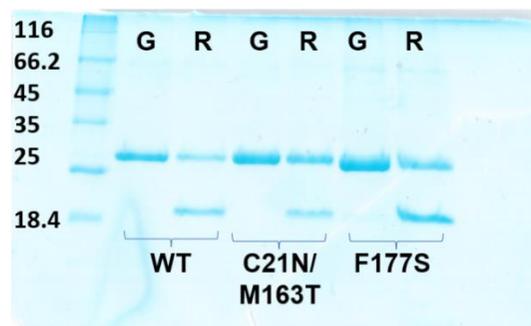


Рисунок 37. Спектры поглощения (А, В, Д) и эмиссии флуоресценции (Б, Г, Е) вариантов mSAASoti, C21N/M163T и F177S, зарегистрированные до (зеленая линия) и после (красная линия) облучения образцов в кювете светом $\lambda=400$ нм в течение 10 минут. Белки находились в буфере 200 мМ Tris-HCl, pH 7,4 с использованием приборов Cary 60 и Cary Eclipse. Зеленую и красную форму возбуждали светом $\lambda=470$ нм (зеленый канал) и 550 нм (красный канал), соответственно.



mSAASoti	% гидролиза
Wt*	55
C21N/M163T	28
F177S	55

Рисунок 38. ПААГ по Лэмбли образцов mSAASoti (WT) C21N/M163T и F177S до (линии G) и после (линии R) облучения светом $\lambda=390$ нм в течение 600 с. Нижняя белковая полоса возникает в результате фотоиндуцированного расщепления пептидной цепи. В Таблице справа приведены значения % расщепления, рассчитанные с помощью ПО ImageJ. WT* – mSAASoti.

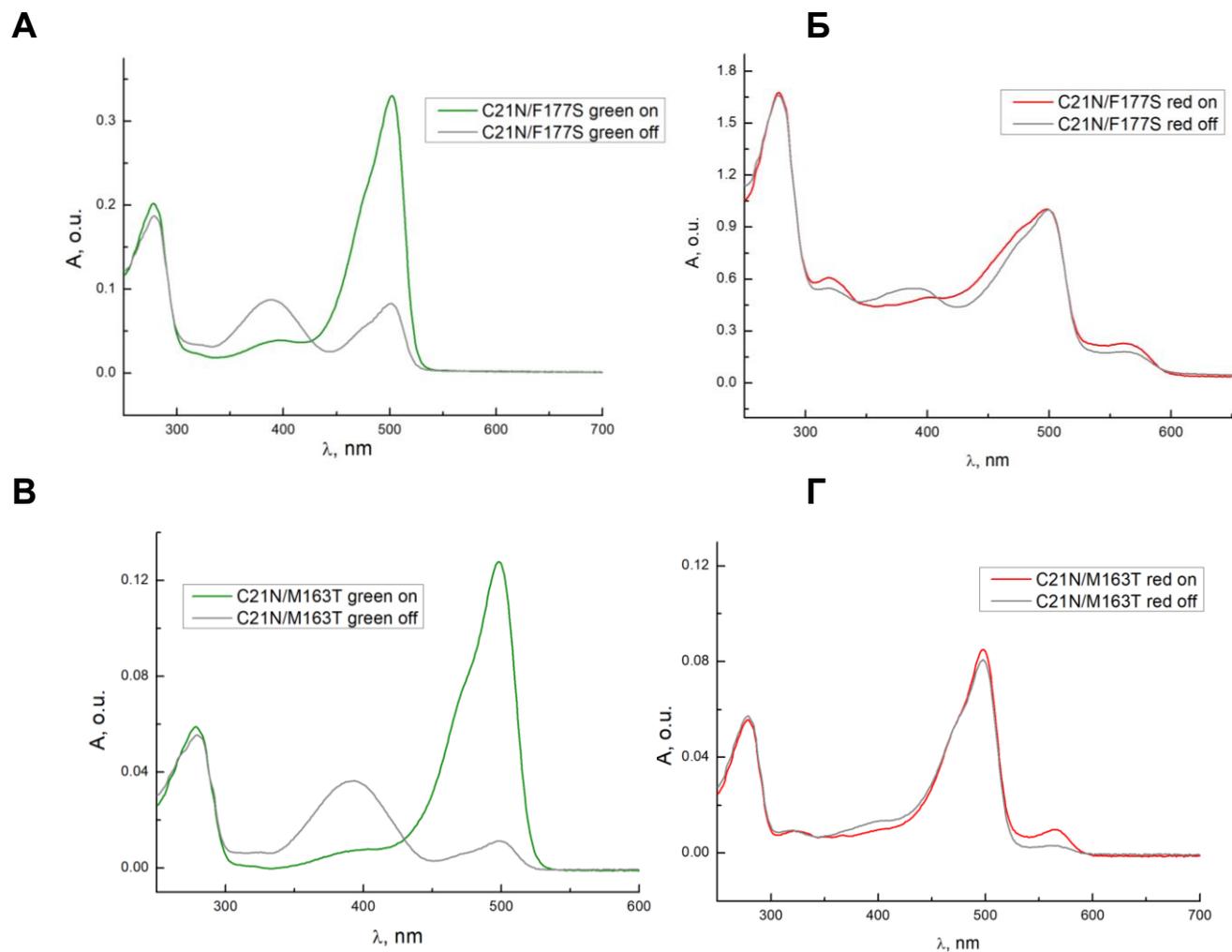


Рисунок 39. Спектры поглощения образцов зеленой и красной форм белков C21N/F177S (А, Б) и C21N/M163T (В, Г) mSAASoti. Белки находились в буфере 200 мМ Tris-HCl, pH 7,4, спектры регистрировали с использованием спектрофотометра Cary 60. Зеленую форму переключали путем облучения кюветы с раствором соответствующего белка светом $\lambda=485$ нм (200 с), а красную – светом $\lambda=550$ нм (600 с). и красную форму возбуждали светом $\lambda=470$ нм (зеленый канал) и 550 нм (красный канал), соответственно.

3.6.4. Визуализация клеточных структур с использованием мутантных форм mSAASoti

Для изучения выбранных белков в эукариотических клетках были получены fusion-конструкции с белком виментином. Структурный белок виментин был выбран для избежания диффузии флуоресцентных белков в клетках, так как планировалось проводить облучение образцов светом различной длины волны для осуществления всех видов фототрансформации – фотоконверсии из зеленого в красный, «выключения-включения» зеленой и красной форм. Мутантные формы C21N, C21N/M163T, C21N/M163A и C21N/F177S mSAASoti были клонированы в вектор pcDNA3 в единую рамку считывания с геном виментина. Клетки HeLa Kyoto были трансфицированы полученными конструкциями и через 24 ч после трансфекции были зарегистрированы флуоресцентные изображения. Как видно на Рисунке 40, во всех случаях хорошо визуализируется структура белка виментина.

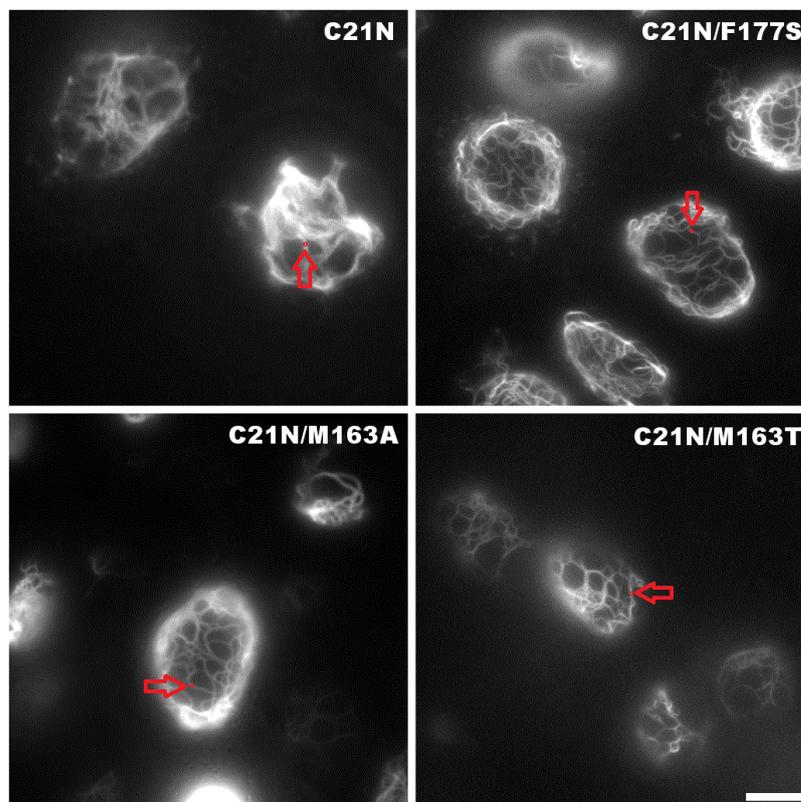


Рисунок 40. Экспрессия фьюжн-конструкций виментина, меченных различными мутантными формами mSAASoti на C-конце, через 24 ч после трансфекции. Конструкции экспрессировались в клетках HeLa Kyoto. Шкала 10 мкм. Изображения были получены в зеленом канале. Интенсивность флуоресценции для кинетических измерений обратимого фотопереключения (описанных ниже) изучали в точках, обозначенных красной стрелкой.

Чтобы сравнить скорость и эффективность переключения между различными вариантами mSAASoti, была проанализирована кинетика обратимого переключения для обеих форм – красной и зеленой – для полученных конструкций 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 39).

Фотопереключение красной формы. Сначала проводили генерацию красной формы путем облучения светом длиной волны 390 нм. Для обратимого выключения использовали лазер длиной волны 548 нм, в то время как включение проводили с помощью лазера 434 нм, что соответствует поглощению красного протонированного хромофора (Рисунок 39).

На Рисунке 41 изображены циклы последовательного включения-выключения для зеленой и красной форм, полученные при облучении клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих мутантные формы C21N, C21N/M163T, C21N/M163A и C21N/F177S mSAASoti во fusion-конструкции с виментином. Уменьшение сигнала флуоресценции в клетках во всех случаях подчиняется моноэкспоненциальному закону как для зеленой, так и для красной форм (Уравнение 8).

$$I(t) = A * \exp(-k * t) + c \quad (8)$$

Как видно из результатов кинетического анализа, представленных в Таблице 15, максимальная скорость переключения для обеих форм наблюдалась для варианта C21N/M163T. Интересно, что красная форма M163A переходит в выключенное состояние медленнее, чем в случае M163T, однако, их зеленые формы переключаются с сопоставимой скоростью. Проведение последовательных циклов выключения-включения показало, что

замены M163A и M163T приводили к более фотостабильным вариантам, что, по-видимому, связано с исключением стадии фотоокисления метионина [123], тогда как в случае вариантов F177S/C21N и C21N mSAASoti исходное значение интенсивности флуоресценции заметно уменьшается при переходе от цикла к циклу. Для варианта M163T/C21N наблюдали также максимальную контрастность переключения (98% и 97% для зеленой и красной форм, соответственно). Освещение светом с длиной волны 548 нм красной формы C21N mSAASoti приводило только к фотодеструкции с минимальным фотопереключением (Рисунок 41 В).

Таблица 15. 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

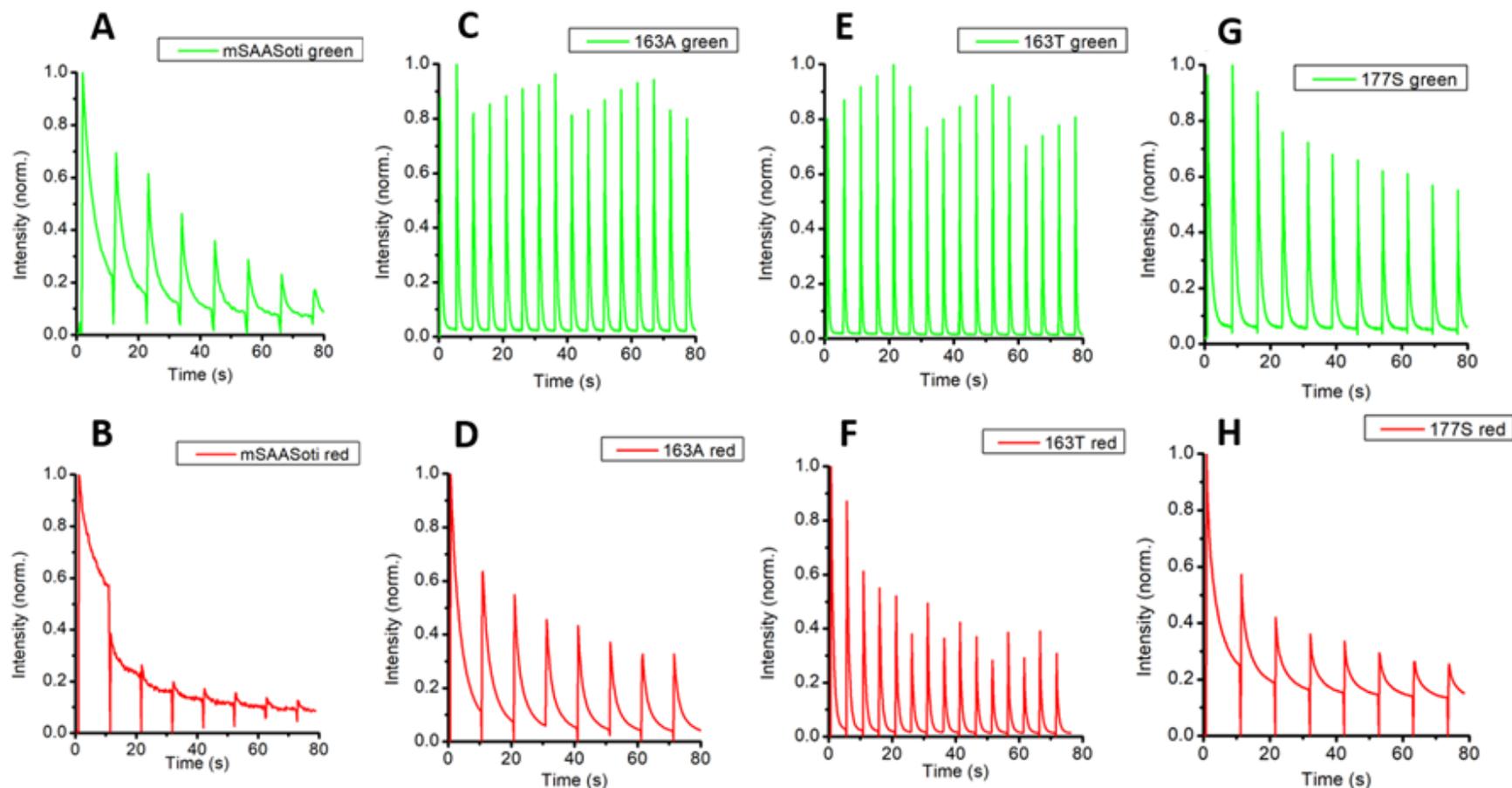


Рисунок 41. Кинетика фотопереключения в эукариотических клетках (HeLa Kyoto), экспрессирующих различные фьюжн-конструкции виментин-mSAASoti: C21N (A, B), C21N/M163A (C, D), C21N/M163T (E, F), C21N/F177S (H, G). Переключение on-off зеленой формы было осуществлено светом $\lambda=485$ нм (10 с) с последующим облучением светом $\lambda=390$ нм (0,5 с). Красную форму получали облучением светом $\lambda=390$ нм (5 с), переводили в выключенное состояние светом $\lambda=548$ нм (10 с) и активировали флуоресценцию форму светом 434 нм. Кинетические кривые строили по максимумам эмиссии флуоресценции обеих форм, данные нормированы на максимумы начальной флуоресценции.

3.7. Происхождение фотопереключения во флуоресцентных белках

Для определения структурных причин явления фотопереключения, а также *цис-транс* изомеризации хромофора некоторых мутантных форм mSAASoti был проведен динамический сетевой анализ. Для этого был получен набор моделей как с зеленой, так и с красной формами хромофора в анионной *цис*-форме для mSAASoti и его вариантов C21N, C21N/M163T, M163A и F177S. Были смоделированы траектории в течение 300 нс для каждой модельной системы. Для всех рассмотренных систем фотопереключение наблюдается для зеленой формы, а в красной форме оно наблюдается только в вариантах с заменами либо в 163, либо в 177 положениях. Динамический сетевой анализ выявил группы аминокислотных остатков с коррелированным движением. Были определены остатки, принадлежащие к той же группе, что и фенильный фрагмент хромофора (Рисунок 42). Согласно результатам расчетов, системы, которые могут подвергаться изомеризации, имеют отличительную особенность: фенильный фрагмент хромофора и бывший остаток H66, входящий в состав красного хромофора, принадлежат к одному сообществу. Важно отметить, что этот критерий работает как для красных, так и для зеленых форм, несмотря на значительные различия в этой области белка. В красной форме обе π -системы боковой цепи остатка H66 и зеленая форма хромофора объединены в расширенную сопряженную π -систему.

Были исследованы соседние аминокислотные остатки, которые могут отвечать за способность к изомеризации. Однако не было обнаружено сходства между рассмотренными системами в этом отношении. Даже у структурно сходных остатков в белках mSAASoti и C21N mSAASoti, расположенных близко к фенильной части хромофора, остатки F177, M163 и I161 «действуют» по-разному. В красной форме движение фенильной части хромофора коррелирует с остатками F177 в mSAASoti и с M163 и I161 – в варианте C21N. Аналогичным образом, участие M163 и I161 наблюдается для варианта F177S и не наблюдается для белка с заменой в 163-м положении.

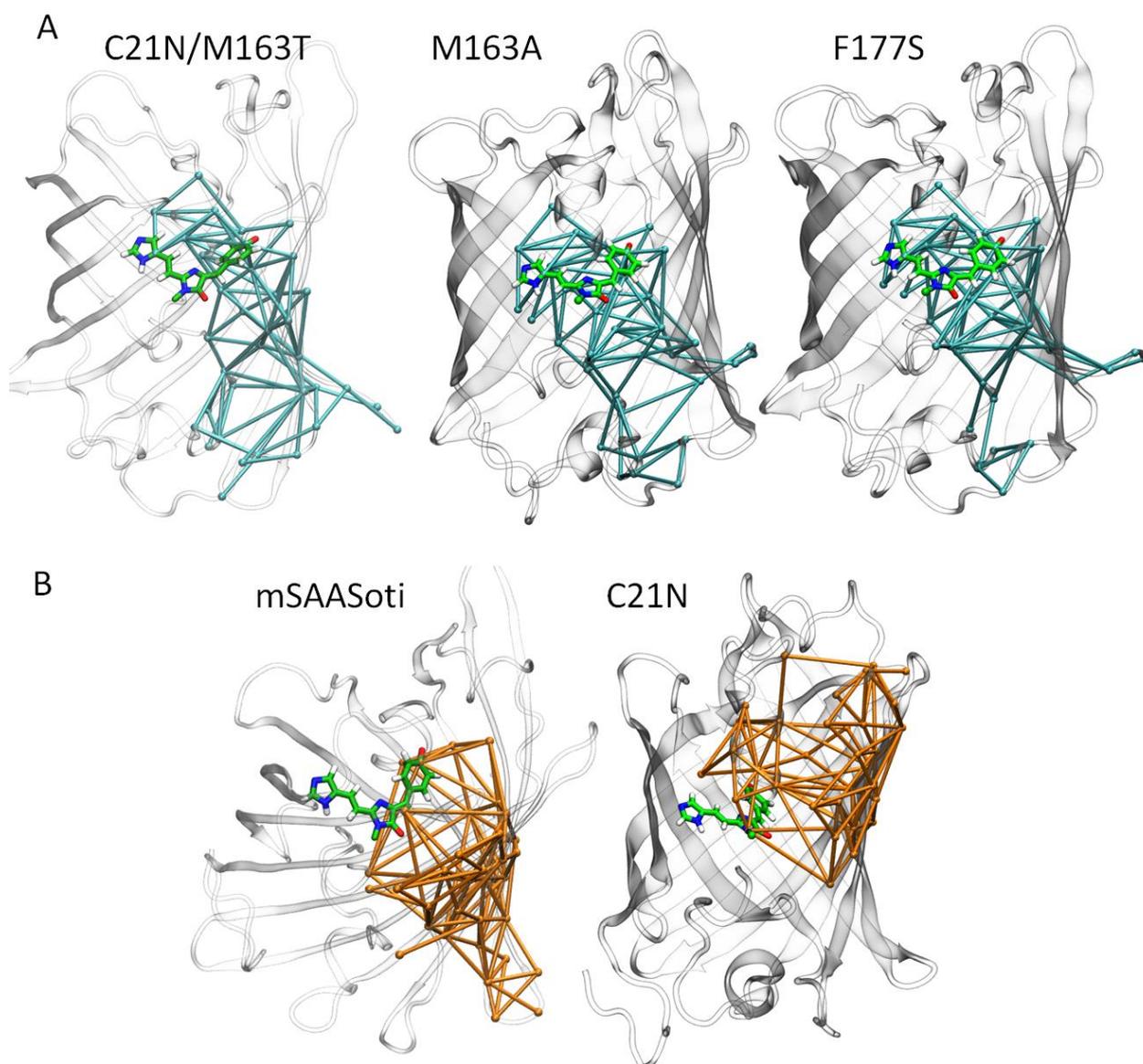


Рисунок 42. Сообщества, содержащие фенильный фрагмент красной формы хромофора в различных вариантах mSAASoti. (A) Для вариантов с экспериментально наблюдаемой фотоизомеризацией красной формы фенильный фрагмент хромофора и бывшая боковая цепь остатка Н66 принадлежат к одному и тому же сообществу (показано голубыми палочками). (B) Для неизомеризующихся белков эти два фрагмента принадлежат к разным сообществам (сообщества с фенильным фрагментом показаны оранжевым цветом). Цветовой код: углерод – зеленый, кислород – красный, азот – синий, водород – белый.

Глава 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа является еще одним подтверждением того факта, что для получения флуоресцентных белков (а также их производных) с заданными свойствами нельзя ограничиваться лишь сайт-направленным мутагенезом, эффективнее оказывается комбинация с сайт-насыщенным мутагенезом. С помощью кинетического анализа можно предположить особенности механизмов фотопревращений, а моделирование структур в динамике позволяет представить процесс фотоизомеризации не отдельно взятого хромофора, а всей белковой глобулы (скоррелированные движения).

В ходе определения физико-химических параметров ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$, pK_a , ϵ , ϕ) было показано, что введенные замены, даже в случае поверхностных аминокислотных остатков, значительно влияют на флуоресцентные свойства mSAASoti. Например, замены C21N и C175A привели к заметному изменению величины pK_a красной формы в сторону более высоких значений pH. Методом моделирования молекулярной динамики с использованием потенциалов КМ/ММ красных форм белков C21N и mSAASoti было показано, что более высокое значение pK_a для красной формы в случае C21N SAASoti связано с уменьшением средней длины C-O в фенильном фрагменте хромофора, смещением таутомерного равновесия. При анализе остатков цистеина C21 и C117 на поверхности было обнаружено, что остаток C21 отвечает за частичную димеризацию mSAASoti при высоких концентрациях, его замена – C21N – привела к образованию стабильного мономерного белка, поэтому белок C21N mSAASoti был выбран в качестве нового улучшенного варианта mSAASoti. Формы с замещенным 71 цистеином продемонстрировали повышенную скорость фотоконверсии из зеленого в красный, а тройной мутант C21N/C71G/C175A mSAASoti – максимальную скорость, но при освещении 400 нм фотостабильность генерируемой красной формы также значительно снижается. Во-первых, остаток C71 расположен в непосредственной близости от хромофора по сравнению с другими остатками цистеина, кроме того,

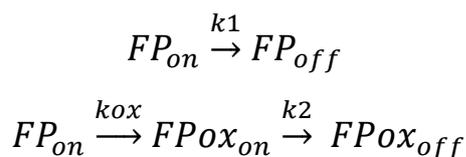
он расположен вблизи достаточно консервативного для белков данного семейства остатка R70 (Таблица П1, П2). Из литературы также известно, что R70 может участвовать в формировании кратковременного темного состояния [142] и фотообесцвечивании [12, 98, 143]. Микроокружение хромофора (H193, E211) служит катализатором в этой фотохимической реакции [91]. Замена C71V может повлиять на стереометрию связей вокруг хромофора путем влияния на соседние остатки, что, в свою очередь, может повлиять на взаимодействие между остатками в очень консервативной тетраде R66-E144-H193-E211, а также – на скорость реакции фотоконверсии.

Любопытным фактом является также то, что C117S mSAASoti фотоконвертируется в красную форму с наименьшей скоростью, в то время как эта аминокислота находится "на поверхности". Авторы [117] сообщили о незначительном увеличении скорости и степени фотоконверсии для toxDendra2 по сравнению с Dendra2, это явление было объяснено улучшением коэффициентов экстинкции как для зеленой, так и для красной форм toxDendra2.

Согласно модели 3D-структуры mSAASoti, боковая цепь аминокислотного остатка C105 расположена внутри β -бочонка, и, по-видимому, находится далеко от хромофора, тем не менее, вариант C105V продемонстрировал самую быструю кинетику фотопереключения и релаксации.

Все варианты mSAASoti, не содержащие замену C175A при повторных циклах фотопереключения, изменяли скорость переключения, при этом смещались максимумы спектров поглощения/эмиссии. В то же время мутантные формы, содержащие замену C175A, имели различную кинетику фотопереключения, при этом не наблюдалось каких-либо изменений спектра при переходе к последующим циклам фотопереключения, что указывает на возможную фотохимическую модификацию (окисление) остатка 175 цистеина в остальных вариантах mSAASoti. Возможно, как в этом, так и в случае, описанном выше, имеет место некоторый аллостерический эффект. C175A является заменой вблизи хромофора, авторы [98] показали, что не только M159 может быть окислен при освещении синим светом,

но также и соответствующий остаток цистеина (171 в случае IrisFP). Кинетика переключения из флуоресцирующего в темное состояние для белков, содержащих замену С175А, описывается моноэкспоненциальным уравнением. Наряду с тем фактом, что формы с заменой С175А не имеют спектрального сдвига, можно предположить, что цистеин 175 может подвергаться фотоокислению во время первого цикла фотопереключения, а затем эта новая популяция также подвергается фотопереключению. Предполагаемая кинетическая схема:



При такой схеме изменение интенсивности во времени описывается Уравнением:

$$I_{at\ x\ nm}(t) = FP_{on\ 0} * \left((i_1 + i_2 * \frac{k_{ox}}{k_2 - k_1 - k_{ox}}) * \exp(-(k_1 + k_{ox}) * t) - \right. \\ \left. - FP_{on\ 0} * i_2 * \frac{k_{ox}}{k_2 - k_1 - k_{ox}} * \exp(-k_2 * t) \right) \quad (9)$$

Термическая релаксация в вариантах с С175А mSAASoti также протекает медленнее по сравнению с mSAASoti. Что интересно, авторы [98] продемонстрировали, что в зависимости от интенсивности света могут быть реализованы два различных механизма фотопереключения. Например, при освещении лазерным лучом высокой интенсивности ($\approx 0,1$ кВт/см², 488 нм) происходит декарбоксилирование аминокислотного остатка глутамата в положении 212, и, как следствие, значительная перестановка водородных связей вокруг хромофора, а также заметная модификация, тогда как при освещении низкой интенсивности (≈ 10 Вт/см², 488 нм) авторы наблюдали окисление серосодержащих остатков М163 и С175 (нумерация по mSAASoti), удерживающих хромофор в темном состоянии. Однако замена С175А отрицательно повлияла на фотостабильность mSAASoti при повторных циклах фотопереключения. С175 расположен между и немного выше остатков М163 и F177 (М159 и F173, EosFP). Мы предполагаем, что замена С175А может привести к стерическим ограничениям, усложняющим реакцию фотоизомеризации. В случае mSAASoti ранее [123] было

показано, что под воздействием света 470 нм фотоокислению подвергается остаток M163. Было проведено классическое молекулярно-динамическое моделирование варианта mSAASoti и C175A с последующим анализом карт взаимной корреляции, RMSD и гибкости аминокислотных остатков в области хромофора. Аминокислотные остатки в белке mSAASoti демонстрировали более коррелированные движения по сравнению с вариантом C175A. Было также установлено, что боковая цепь F177 в случае C175A mSAASoti менее гибкая, более того, фенилаланин в основном занимает то же пространственное положение в C175A, что и фенильная часть хромофора. Другими словами, реакция фотопереключения в mSAASoti облегчается благодаря конформационной гибкости F177. Таким образом, было продемонстрировано влияние аллостерической регуляции на фотофизические и фотохимические свойства бифотохромного белка mSAASoti.

Замена P145I была введена в белок Padron – производное Dronpa, которое переключается из стабильного выключенного состояния во включенное (положительное фотопереключение) [73]. Для получения белка с более гидрофильным интерфейсом также был создан вариант P145R (Padron*), характеризующийся меньшей склонностью к олигомеризации. Согласно структурным исследованиям белка Padron 0,9 [62] остаток P145 не влияет на изменение природы переключения; однако он определяет различия в структурных перестройках во время переключения хромофора и спектральные изменения. После замены P145L не наблюдалось серьезного смещения аминокислотных остатков выключенной формы по сравнению с включенным состоянием (Padron0.9 по сравнению с Dronpa [144]), но наблюдались сильные искажения системы сопряжения хромофоров, а белковый матрикс оставался практически неизменным. Таким образом, стоит отметить, что жесткость β -бочонка не столь критична для фотопереключения, что также подтверждается молекулярным моделированием [121]. В то же время белки с P145 обладают большими значениями коэффициента экстинкции, и благодаря сходным значениям квантового выхода они обладают

большей яркостью (среди вариантов Dronpa). Интересно также отметить, что механизм изомеризации двойной связи самого хромофора может зависеть от упаковки кристалла [145]. Наличие полости в области хромофора допускает локальную перегруппировку остатков во время *цис-транс*-изомеризации хромофора [98]. Как упоминалось ранее, различия в поведении белков с R145 связаны с подвижностью белкового скелета. В случае белка Padron [62] сдвиг S146 приводит к ситуации, когда H193 не может переместиться в полость, которая есть у Dronpa; таким образом, R66 занимает его место, и хромофор вынужден изомеризоваться в ограниченном пространстве. Эти ключевые а.о. также присутствуют в mSAASoti; следовательно, мы предполагаем, что в случае с SAASoti все может протекать по тому же сценарию.

Аминокислотные замены вблизи хромофора (163, 177) увеличивают его подвижность [60]; следовательно, можно зарегистрировать множество конформаций хромофора в основном состоянии. Это может объяснить расширение спектра поглощения. Уменьшение времени жизни может указывать на возможное тушение конформеров дестабилизированного хромофора. Спектры эмиссии менялись меньше, и, возможно, возбужденное состояние было ближе к белку дикого типа. Аналогичные изменения спектральных свойств наблюдались для гомологичных белков и их F177X и M163X мутантных форм [12]. Синий сдвиг в спектрах поглощения был объяснен увеличением доли имидазольного фрагмента, находящегося в равновесии с таутомерной формой хромофора. Интересно, что замена M163A в белке C21N/K145P ограничила фотоконверсию из зеленого в красный, тогда как мутантная форма C21N/K145P mSAASoti имела как зеленую, так и красную формы с относительно высокими значениями ϵ . Другими словами, этот кумулятивный аллостерический эффект был результатом тройной замены, и только остаток метионина находился в непосредственной близости от хромофора. Замена K145P в сочетании с M163A и F177S также резко повлияла на эффективность фотоконверсии, но она все же возможна, в отличие от формы C21N/K145P/M163A. Белок C21N/K145P/M163A mSAASoti продемонстрировал

максимальную скорость фотопереключения зеленой формы, биекспоненциальный характер фотопереключения наблюдался ранее [11]. Следует отметить, что белки SkyJan [146, 147] и mGeos [148], фотопереключаемые варианты mEos2, у которых отсутствует способность к фотоконверсии из зеленого в красный, были получены путем замены H62, очень консервативного остатка в хромофорообразующей триаде для фотоконвертируемых флуоресцентных белков, в то время как C21N/K145P/M163A mSAASoti с гистидином не фотоконвертируется. Подводя итог, можно сказать, что C21N/K145P/M163A может быть использованы в методах сверхразрешения, таких как быстрая PALM микроскопия [149], SOFI (оптическая флуктуационная визуализация с высоким разрешением) [146, 150], RESOLFT [151] и NL-SIM [147] в качестве зеленого быстропереключаемого варианта mSAASoti с возможностью фотопереключения с большим количеством циклов и лучшим восстановлением флуоресценции, поскольку свет с длиной волны 400 нм, необходимый для обратного переключения из темной формы в яркую, не вызвал бы конкурирующей реакции фотоконверсии и фотодеструкции.

Для всех полученных мутантных форм mSAASoti с заменами в положениях 163 и 177 наблюдали значительные различия в физико-химических и флуоресцентных свойствах, в первую очередь, в сдвиге величины рКа зеленой и красной форм в область более высоких значений рН, уширении спектров поглощения, увеличении скорости фотопереключения и восстановлении флуоресцентного состояния, фотохимической стабильности.

Гомологичная замена M163A в случае флуоресцентного белка EosFP [12], наоборот, приводит к значительному сдвигу величины рКа зеленой формы в сторону более низких значений рН – 4,3 вместо 5,3, что, по-видимому, является причиной потери способности к фотоконверсии. M163- и F177-замещенные варианты EosFP и Dendra2 [12], а также мутантные формы mSAASoti имеют спектры излучения со смещением в более коротковолновую область спектра. Биекспоненциальный характер затухания флуоресценции наблюдался у белков M163/F177 mEosFP и Dendra2, в то время как время жизни исходных белков было

выше, а затухание флуоресценции подчинялось моноэкспоненциальному закону. Биэкспоненциальная зависимость затухания флуоресценции может быть связана с присутствием различных излучающих конформеров, вероятно, образующихся в результате особой подвижности хромофора. Молекулярно-динамическое моделирование с использованием потенциалов КМ/ММ показало, что уширение спектров в случае новых мутантных форм может быть объяснено изменением распределения между двумя резонансными формами отрицательно заряженного хромофора. Снижение квантового выхода флуоресценции, вероятно, связано с повышенной гибкостью хромофора, как описано ранее [12], но в случае SAASoti он значительно снизился для зеленой формы.

Замена M163T в случае C21N mSAASoti привела к большему ускорению фотопереключения с максимальным контрастом переключения как для зеленой, так и для красной форм, в то время как белок оставался фотоконвертируемым в красную форму. Замены M163 и F177 способствовали появлению фотопереключения красной формы без предварительного облучения зеленой формы синим светом, как это было ранее обнаружено для исходного mSAASoti [123]. Стоит отметить, что для фотоконвертируемого варианта pcDronpa фотопереключению подвергается только зеленая форма белка [90]. В случае mEosFP и Dendra2 именно замена F177S привела к получению наиболее быстрых вариантов, способных к фотопереключению как зеленой, так и красной форм, в результате были получены перспективные флуоресцентные маркеры – IrisFP и NijiFP, соответственно. Однако, в случае mSAASoti максимальное переключение наблюдали для вариантов с заменой M163. Максимальным ускорением при аналогичной замене M163T обладал только фотопереключаемый белок Dronpa [152].

Замены M163 приводили к повышению фотостабильности при повторном фотопереключении. Повторное фотопереключение, при котором наблюдается снижение интенсивности флуоресценции от цикла к циклу, также связано с фотоокислением метионином 163 [123], и его замена позволяет проводить больше

циклов переключения без снижения общего флуоресцентного сигнала. Стоит отметить, что результатом окисления M163 также является увеличение скорости переключения зеленой формы SAASoti (было показано в данной работе) и появление незначительных фотоперехлещений красной формы [123]. Окисление метионина и повышенная стабильность белка в результате его замены были также отмечены для других бифотохромных белков при облучении светом низкой мощности [61, 98].

Фотоконвертируемые флуоресцентные белки обладают слабой способностью к фотоперехлещению [12, 153]; однако она на много порядков ниже, чем у бифотохромных белков [12], и сравнима по константам скорости с необратимой фотодеструкцией. Ограниченная подвижность хромофоров затрудняет *цис-транс*-изомеризацию и может выглядеть как скачки интенсивности при низкой контрастности. Следует отметить, что регистрировалась небольшая амплитуда фотоперехлещений красной формы для mSAASoti, полученной из предварительно потушенной зеленой формы. Позже было показано фотоокисление остатка M163 с помощью масс-спектрометрии [8]. С другой стороны, авторы [153] наблюдали большую амплитуду переключения, особенно для красной формы в случае белка mMarle, и после облучения зеленым светом в спектрах поглощения было зарегистрировано повышенное количество протонированного красного хромофора.

Впервые с разрешением 3,0 Å была получена кристаллическая структура C21N mSAASoti в зеленом состоянии, и она хорошо согласуется с ранее рассчитанной 3D-моделью. Структурное соответствие с белком IrisFP (PDB-код: 2VVH) показало, что остатки E148, R70, H197, E212 (нумерация в соответствии с mSAASoti) занимают одинаковое положение вокруг хромофора. Интересно, что как консервативная триада Glu144 – His194 – Glu212 "улавливает" конфигурацию *цис*-хромофора, так и триада Glu144 – Arg66 — Glu212 в *транс*-конфигурации в IrisFP29 занимают одинаковое положение в mSAASoti. Методом динамического сетевого анализа впервые было продемонстрировано, что способность хромофора

к изомеризации как красной, так и в зеленой форм определяется специфичностью движения его фенильного фрагмента. Если его движение коррелирует с движением H66 и эти фрагменты принадлежат к одному сообществу, может произойти изомеризация. Важно отметить, что этот вывод справедлив, несмотря на различную химическую структуру красного и зеленого хромофоров.

Все полученные в ходе данной работы новые варианты mSAASoti можно представить в виде дерева мутаций, представленного на Рисунке 43. Самыми интересными «плодами» этого дерева автор бы назвал C21N – как истинный мономер, к тому же, с подтвержденной кристаллической структурой, C21N/M163T – как самый быстропереключаемый бифотохромный белок с максимальным контрастом переключения, а также C21N/K145P/M163A – как самый быстропереключаемый зеленый флуоресцентный белок без возможности фотоконверсии из зеленого в красный.

Таким образом, как следует из данных, полученных в ходе данного исследования, а также благодаря имеющейся информации о других флуоресцентных белках, критическим параметром является динамика белковой глобулы, β -бочонка, что, в свою очередь, определяет параметры самого хромофора (изменение зарядов, длин связей и т.д.) в каждом конкретном белке или мутантной форме и объясняет многообразие и богатство семейства GFP-подобных белков по спектральным и физико-химическим свойствам. Именно поэтому в случае флуоресцентных белков, как видно на примере mSAASoti, очень часто наблюдается аллостерический эффект при введении точечных замен, а внутри семейства GFP-подобных белков наблюдается высокая гомология третичной структуры в отличие от первичной последовательности.

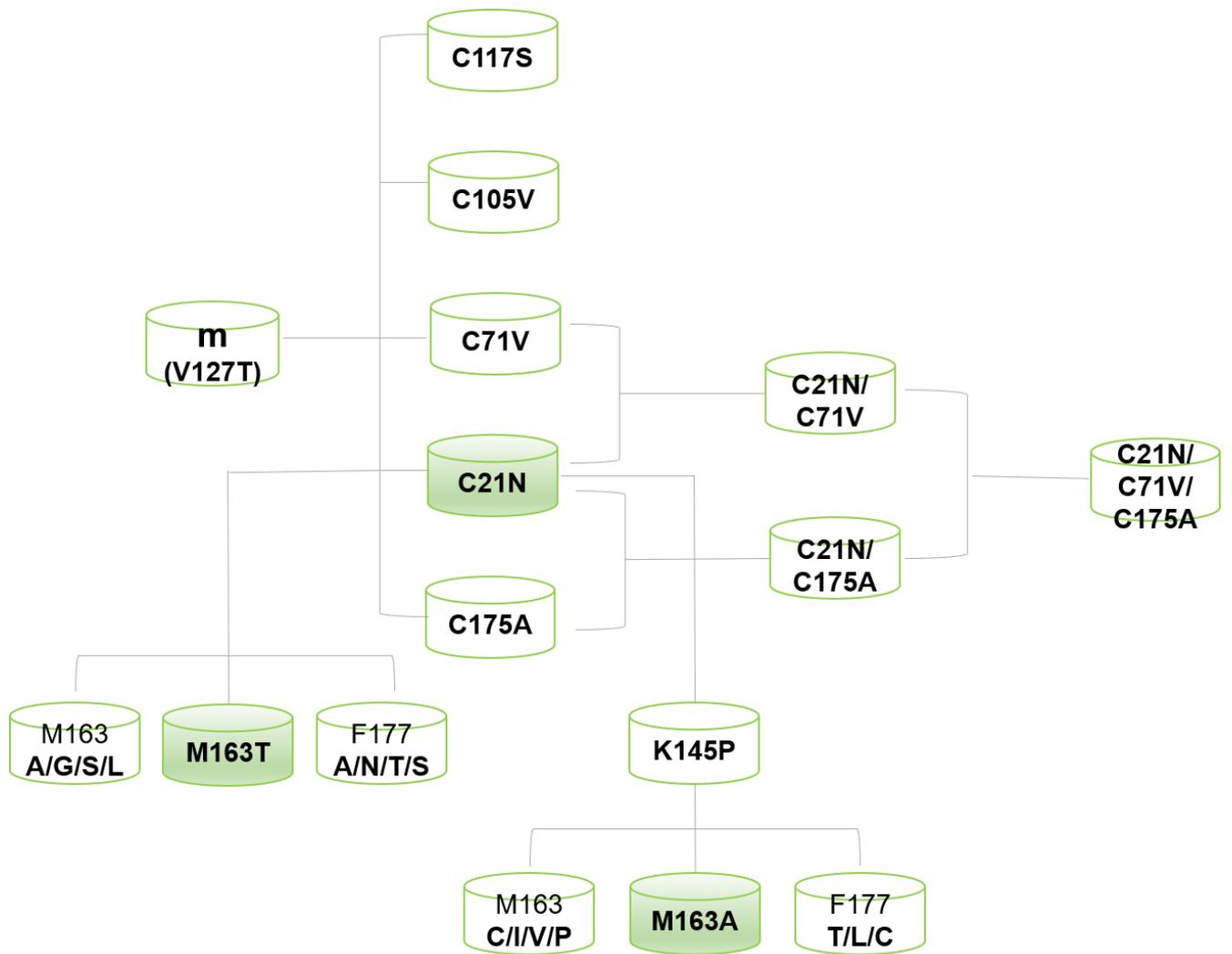


Рисунок 43. Дерево мутаций mSAASoti.

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).

Публикации по теме работы

Публикации:

- 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. // *Sci. Rep.* – 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. // *Int. J. Mol. Sci.* – 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. // *Sci Rep.* – 2024. – Vol. 14. – 8754. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-59364-1>.

Тезисы конференций:

- 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.*

Список используемой литературы

1. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* // *Journal of Cellular and Comparative Physiology* – 1962. – Vol. 59 – P. 223-239.
2. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // *Science*. – 1994. – Vol. 263. – P. 802-805.
3. Heim R., Prasher D.C., Tsien R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1994. – Vol. 91 – P. 12501-12504.
4. Hell S. W., Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy // *Optics Letters*. – 1994. – Vol. 19(11). – P. 780.
5. Betzig E., Patterson G. H., Sougrat R., Lindwasser O. W., Olenych S., Bonifacino J. S., Hess H. F. Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution // *Science*. – 2006. – Vol. 313(5793). – P. 1642-1645.
6. Lambert T. База данных флуоресцентных белков FPbase, Harvard Medical School – 2018 URL: <https://www.fpbases.org/>
7. Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V. *et al.* A genetically encoded photosensitizer // *Nature Biotechnology*. – 2006. – Vol. 24(1). – P. 95-9.
8. Brakemann T., Stiel A.C., Weber G. *et al.* A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching // *Nat. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 29. – P. 942-947.
9. Lapshin G., Salih A., Kolosov P. et al. Fluorescence Color Diversity of Great Barrier Reef corals // *Journal of Innovative Optical Health Sciences*. – 2015. – Vol. 8(4). – P. 1550028.
10. Solovyev I.D., Gavshina A.V., Katti A.S. et al. Monomerization of the photoconvertible fluorescent protein SAASoti by rational mutagenesis of single amino acids // *Scientific reports*. — 2018. — Vol. 8(1).

11. Solovyev I.D., Gavshina A.V., Savitsky A.P. Reversible photobleaching of photoconvertible SAASoti-FP // *Journal of Biomedical Photonics & Engineering*. — 2017. — Vol. 3, no. 4. — P. 040303-(1-5).
12. Adam V., Moeyaert B., David C. C. *et al.* Rational Design of Photoconvertible and Biphotochromic Fluorescent Proteins for Advanced Microscopy Applications // *Chemistry & Biology*. – 2011. – Vol. 18(10). – P. 1241-1251.
13. Davenport D., Nicol J. A. C. and Russell F. S. Luminescence in Hydromedusae // *Proc. R. Soc. Lond.* – 1955. B144399-411.
14. Hastings J.W., Morin J.G. Calcium-triggered light emission in *Renilla*. A unitary biochemical scheme for coelenterate bioluminescence // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1969. – Vol. 37. – P. 493-498.
15. Shimomura O. Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein // *FEBS Letters*. – 1979. – Vol. 104(2). – P. 220-222.
16. Ormo M., Cubitt A.B., Kallio K. *et al.* Crystal Structure of the *Aequorea Victoria* Green Fluorescent Protein // *Science* – 1996. – Vol. 273. – P. 1392-1395.
17. Carpentier P., Violot S., Blanchoin L. *et al.* Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed // *FEBS Lett.* – 2009. – Vol. 583(17). – P. 2839-2842.
18. Pletnev S., Gurskaya N. G., Pletneva N. V. *et al.* Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed // *J. Biol. Chem.* – 2009. Vol. 284(46). – P. 32028-32039.
19. Barondeau D. P., Kassmann C. J., Tainer J. A. *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.
20. Ong W.J.-H. Alvarez S., Leroux I.E. *et al.* Function and structure of GFP-like proteins in the protein data bank // *Mol. Biosyst.* – 2011. – Vol. 7(4). – P. 984.
21. Barondeau D.P., Putnam C.D., Kassmann C.J. *et al.* Mechanism and energetics of green fluorescent protein chromophore synthesis revealed by trapped intermediate

- structures // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 2003. – Vol. 100(21). – P. 12111-12116.
22. Barondeau D.P., Kassmann C.J., Tainer J.A. et al. Understanding GFP chromophore biosynthesis: Controlling backbone cyclization and modifying post-translational chemistry, // Biochemistry. – 2005. – Vol. 44(6). – P. 1960-1970.
23. Rosenow M.A., Huffman H.A., Phail M.E. et al. The crystal structure of the Y66L variant of green fluorescent protein supports a Cyclization–Oxidation–Dehydration mechanism for chromophore maturation, // Biochemistry. – 2004. – Vol. 43(15). – P. 4464-4472.
24. Muslinkina L., Roldán-Salgado A., Gaytán P. et al. Structural factors enabling successful GFP-like proteins with alanine as the third chromophore-forming residue // J. Mol. Biol. – 2019. – Vol. 431(7). – P. 1397-1408.
25. Yang F., Moss L.G., Phillips G.N. The Molecular Structure of Green Fluorescent Protein // Nature Biotechnology – 1996. – Vol. 14(10). – P. 1246-1251.
26. Simkovitch R., Huppert A., Huppert D. et al. Proton Transfer in Wild-Type GFP and S205V Mutant Is Reduced by Conformational Changes of Residues in the Proton Wire // The Journal of Physical Chemistry B. – 2013. – Vol. 117(40). – P. 11921-11931.
27. Catala R. Fluorescence effect from corals irradiated with ultra-violet rays// Nature. – 1959. – Vol. 183. – P. 949.
28. Burns R.E., Greer J.E., Mikhail G. et al. The Significance of Coral-Red Fluorescence of the Skin // Arch Dermatol. – 1967. – Vol. 96(4). – P. 436-440.
29. Kawaguti S. Effect of the green fluorescent pigment on the productivity of reef corals // Micronesia. – 1969. – Vol. 5. – P. 313.
30. Schlichter D., Bajorat K.H., Buck M. et al. Epidermal nutrition of sea anemones by absorption of organic compounds dissolved in the oceans // Zool. Beitr. N. F. – 1986. – Vol. 30. – P. 29-47.
31. Mazel C.H. Spectral measurements of fluorescence emission in Caribbean cnidarians // Mar Ecol Prog Ser. – 1995. – Vol. 120. – P. 185-191.

32. Hoegh-Guldberg O., Jones R.J. Photoinhibition and photoprotection in symbiotic dinoflagellates from reef-building corals // *Marine Ecology Progress Series*. – 1999. – Vol. 183. – P. 73-86.
33. Zawada D.G., Jaffe J.S. Changes in the fluorescence of the Caribbean coral *Montastraea faveolata* during heat-induced bleaching // *Limnology and Oceanography*. – 2003. – Vol. 48. – P. 412-425.
34. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A et al. Fluorescent Proteins from Nonbioluminescent Anthozoa Species // *Nature Biotechnology* – 1999. – Vol. 17 (10). – P. 969-973.
35. Myers M.R., Hardy J.T., Mazel C.H. et al. Optical spectra and pigmentation of Caribbean reef corals and macroalgae // *Coral Reefs*. – 1999. – Vol. 18. – P. 179-186.
36. Dove S.G., Hoegh-Guldberg O., Ranganathan S. Major colour patterns of reef-building corals are due to a family of GFP-like proteins // *Coral Reefs*. – 2001. – Vol. 19. – P. 197-204.
37. Lukyanov K.A., Fradkov A.F., Gurskaya N.G et al. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog // *J.Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275 – P. 25879-25882.
38. Mazel C.H., Lesser M.P., Gorbunov M.Y et al. Green-fluorescent proteins in Caribbean corals // *Limnology and Oceanography*. – 1995. – Vol. 48 – P. 402-411.
39. Shinzato C., Shoguchi E., Kawashima T. et al. Using the *Acropora digitifera* genome to understand coral responses to environmental change // *Nature*. – 2011. – Vol. 476. – P. 320-323.
40. Shoguchi E., Shinzato C., Kawashima T. et al. Draft assembly of the *Symbiodinium minutum* nuclear genome reveals dinoflagellate gene structure // *Curr.Biol.* – 2013. – Vol. 23. – P. 1399-1408.
41. Kawaguti S. On the physiology of reef corals VI. Study on the pigments // *Palao Tropical Biological Station Studies*. – 1944. – Vol. 2. – P. 617-673.

- 42.Salih A., Larkum A., Cox G. et al. Fluorescent pigments in corals are photoprotective // *Nature*. – 2000. – Vol. 408. – P. 850-853.
- 43.Bou-Abdallah F., Chasteen D.N., Lesser M. Quenching of superoxide radicals by green fluorescent protein / *Biochim Biophys Acta*. – 2006. – Vol. 1760. – P. 1690-1695.
- 44.Palmer C. V., Roth M.S., Gates R.D. Red Fluorescent Protein Responsible for Pigmentation in Trematode-Infected *Porites compressa* Tissues // *Biological Bulletin*. – 2009. – Vol. 215 – P. 68.
- 45.Roth M.S., Deheyn D.D. Effects of cold stress and heat stress on coral fluorescence in reef-building corals // *Scientific reports*. – 2013. – Vol. 3. – P. 1421.
- 46.Gilmore A.M., Larkum A.W., Salih A. et al. Simultaneous Time Resolution of the Emission Spectra of Fluorescent Proteins and Zooxanthellar Chlorophyll in Reef-building Corals.//*Photochemistry and Photobiology*. – 2003. – Vol. 77(5). – P. 515-523.
- 47.Mazel C.H., Fuchs E. Contribution of fluorescence to the spectral signature and perceived color of corals // *Limnol Oceanogr*. – 2003. – Vol. 48. – P. 390-401.
- 48.Roth M.S., Latz M.I., Goericke R. et al. Green fluorescent protein regulation in the coral *Acropora yongei* during photoacclimation // *Journal of Experimental Biology*. – 2010. – Vol. 213. – P. 3644-3655.
- 49.D'Angelo C., Denzel A., Vogt A. et al. Blue light regulation of host pigment in reef-building corals // *Marine Ecology Progress Series*. – 2008. – Vol. 364 – P. 97-106.
- 50.Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W. et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein // *Gene*. – 1992. – Vol. 111. – P. 229-233.
- 51.Inouye S., Tsuji F.I. *Aequorea* green fluorescence protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein // *FEBS Lett*. – 1994. – Vol. 341. – P. 277-280.
- 52.Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S.A. et al. Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues // *Physiological Reviews*. – 2010. – Vol. 90(3). – P. 1103-1163

53. Germond A., Fujita H., Ichimura T. et al. / Design and development of genetically encoded fluorescent sensors to monitor intracellular chemical and physical parameters // *Biophysical Reviews*. – 2016. – Vol. 8(2). – P. 121-138.
54. Bourgeois D., Regis-Faro A., Adam V. Photoactivated structural dynamics of fluorescent proteins // *Biochem. Soc. Trans.* 2012. Vol. 40(3). – P. 531-538.
55. Acharya A., Bogdanov A.M., Grigorenko B.L. et al. Photoinduced Chemistry in Fluorescent Proteins: Curse or Blessing? // *Chemical Reviews*. – 2017. – Vol. 117(2). – P. 758-795.
56. Dickson R.M., Cubitt A.B., Tsien R.Y. et al. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein // *Nature*. – 1997. – Vol. 388(6640). – P. 355-8.
57. Ando R., Mizuno H., Miyawaki A. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting // *Science*. – 2004. – Vol. 306(5700) – P.1370-3.
58. Nienhaus K., Nienhaus G.U. et al. Fluorescent proteins for live-cell imaging with super-resolution // *Chemical Society Reviews* – 2014. – Vol. 43(4). – P. 1088-1106.
59. Stiel A.C., Trowitzsch S., Weber G. 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.
60. Adam V., Lelimosin M., Boehme S. 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.
61. Duan C., Byrdin M., El Kathib M. et al. Rational design of enhanced photoresistance in a photoswitchable fluorescent protein // *Methods Appl. Fluoresc.* – 2015. – Vol 3. – P. 014004.
62. Brakemann T., Weber G., Andresen M. et al. Molecular basis of the light-driven switching of the photochromic fluorescent protein Padron // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285. – P. 14603-14609.

63. Shelaev I., Mironov V. A., Rusanov A. et al. The origin of radiationless conversion of the excited state in the kindling fluorescent protein (kfp): femtosecond studies and quantum modeling // *Laser Physics Letters*. – 2011. – Vol. 8(6). – P. 469-474.
64. Kummer A.D., Wiehler J., Schüttrigkeit T.A. Picosecond Time-Resolved Fluorescence from Blue-Emitting Chromophore Variants Y66F and Y66H of the Green Fluorescent Protein // *ChemBioChem*. – 2002. – Vol. 3 – P. 659-663.
65. Kummer D., Kompa C., Niwa H. et al. Viscosity-Dependent Fluorescence Decay of the GFP Chromophore in Solution Due to Fast Internal Conversion // *J. Phys. Chem. B*. – 2002. – Vol. 106(30) – P. 7554-7559.
66. Meech S. R. Excited state reactions in fluorescent proteins / *Chem. Soc. Rev.* – 2009. – Vol. 38. – P. 2922-2934.
67. Shu X., Shaner N.C., Yarbrough C.A. et al. Novel chromophores and buried charges control color in mFruits // *Biochemistry*. – 2006. – Vol. 45. – P. 9639-9647.
68. Yadav D., Lacombe F., Dozova N. et al. Real-time monitoring of chromophore isomerization and deprotonation during the photoactivation of the fluorescent protein Dronpa // *J. Phys. Chem. B*. – 2015. – Vol. 119. – P. 2404-2414.
69. Woodhouse J., Nass Kovacs G., Coquelle N. et al. Photoswitching mechanism of a fluorescent protein revealed by time-resolved crystallography and transient absorption spectroscopy // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11. – P. 741.
70. Coquelle N., Sliwa M., Woodhouse J. et al. Chromophore twisting in the excited state of a photoswitchable fluorescent protein captured by time-resolved serial femtosecond crystallography // *Nature Chemistry*. – 2017. – Vol. 10(1). – P. 31-37.
71. Chudakov D. M., Feofanov A. V., Mudrik N. N. et al. Chromophore environment provides clue to kindling fluorescent protein riddle. *Journal of Biological Chemistry*, – 2003. – Vol. 278(9). – P. 7215-7219.
72. Quillin M., Anstrom D. M., Shu X. et al. Kindling fluorescent protein from *Anemonia sulcata*: dark-state structure at 1.38 Å resolution. // *Biochemistry* – 2005. – Vol. 44(15) – P. 5774-5787.

73. Andresen M., Stiel A.C., Fölling J. et al. Photoswitchable fluorescent proteins enable monochromatic multilabel imaging and dual color fluorescence nanoscopy // *Nature Biotechnology*. – 2008. – vol 26(9). P.1035-40.
74. Byrdin M., Duan C., Bourgeois D. et al. A Long-Lived Triplet State Is the Entrance Gateway to Oxidative Photochemistry in Green Fluorescent Proteins // *Journal of the American Chemical Society*. – 2018. – Vol. 140(8). – P. 2897-2905.
75. Berardozzi R., Adam V., Martins A. et al. Arginine 66 Controls Dark-State Formation in Green-to-Red Photoconvertible Fluorescent Proteins // *Journal of the American Chemical Society*. – 2016. – Vol. 138(2). – P. 558-565.
76. De Zitter E., Thédié D., Mönkemöller V. Mechanistic investigation of mEos4b reveals a strategy to reduce track interruptions in sptPALM // *Nature Methods*. – 2019. – Vol. 16. – P. 707-710.
77. Dertinger T., Colyer R., Iyer G. et al. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106(52). – P. 22287-22292.
78. van Thor J.J., Gensch T., Hellingwerf K.J. et al. Phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate 222 // *Nature Structural Biology*. – 2002. – Vol. 9(1). – P. 37-41.
79. Patterson G.H., Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells // *Science*. – 2002. – Vol. 297(5588). – P. 1873-7.
80. Subach F.V., Patterson G.H., Manley S. et al. Photoactivatable mCherry for high-resolution two-color fluorescence microscopy // *Nature Methods*. – 2009. – Vol. 6(2). – P. 153-159.
81. Subach F.V., Patterson G.H., Renz M. et al. Bright Monomeric Photoactivatable Red Fluorescent Protein for Two-Color Super-Resolution sptPALM of Live Cells // *Journal of the American Chemical Society*. – 2010. – Vol. 132. – P. 6481-6491.

82. Gunewardene M.S., Subach F.V., Gould T.J. et al. Superresolution Imaging of Multiple Fluorescent Proteins with Highly Overlapping Emission Spectra in Living Cells // *Biophysical Journal*. – 2011. – Vol. 101. – P. 1522-1528.
83. Elowitz M.B., Surette M.G., Wolf P.-E. et al. Photoactivation turns green fluorescent protein red // *Current Biology*. – 1997 – Vol. 7(10). – P. 809-12.
84. Bogdanov A.M., Mishin A.S., Yampolsky I.V Green fluorescent proteins are light-induced electron donors // *Nature Chemical Biology*. – 2009. – Vol. 5(7). – P. 459-461.
85. Ando R., Hama H., Yamamoto-Hino M. 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.
86. Wiedenmann J., Ivanchenko S., Oswald F. et al. EosFP, a Fluorescent Marker Protein with UV-Inducible Green-to-Red Fluorescence Conversion // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2004. – Vol. 101 (45). – P. 15905-015910.
87. Labas Y. A., Gurskaya N. G., Yanushevich Y. G et al. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2002. – Vol. 99(7). – P. 4256-4261.
88. Tsutsui H., Karasawa S., Shimizu H. et al. Semi-Rational Engineering of a Coral Fluorescent Protein into an Efficient Highlighter // *EMBO reports*. – 2005. – Vol. 6 (3). – P. 233-238.
89. Hoi H., Shaner N.C., Davidson M.W. et al. A Monomeric Photoconvertible Fluorescent Protein for Imaging of Dynamic Protein Localization // *Journal of Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 401 (5). – P. 776-791.
90. Moeyaert B., Nguyen Bich N., De Zitter E. et al. Green-to-Red Photoconvertible Dronpa Mutant for Multimodal Super-resolution Fluorescence Microscopy // *ACS Nano* – 2014. – Vol. 8. – P. 1664-1673.
91. Kim H., Zou T., Modi C. et al. Migration Mechanism Unlocks the Evolution of Green-to-Red Photoconversion in GFP-like Proteins // *Structure*. – 2015. – Vol. 23(1) – P. 34-43.

92. Subach O. M., Patterson G. H., Ting L.-M. et al. A photoswitchable orange-to-far-red fluorescent protein, PSmOrange // *Nature Methods*. – 2011. – Vol. 8(9). – P. 771-777.
93. Subach O.M., Entenberg D., Condeelis J.S. et al. FRET-Facilitated Photoswitching Using an Orange Fluorescent Protein with the Fast Photoconversion Kinetics // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – Vol. 134. – P. 14789-14799.
94. Kremers G.-J., Hazelwood K.L., Murphy C.S. et al. Photoconversion in orange and red fluorescent proteins / *Nature Methods*. – 2009. – Vol. 6(5). – P. 355-360.
95. Wachter R., Remington J. Sensitivity of the yellow variant of green fluorescent protein to halides and nitrate // *Current Biology*. – 1999. – Vol. 9(17). – P. R628-R629.
96. Arosio D., Garau G., Ricci F. et al. Spectroscopic and Structural Study of Proton and Halide Ion Cooperative Binding to GFP // *Biophysical Journal*. – 2007. – Vol. 93. – P. 232-44.
97. Roy A., Carpentier P., Bourgeois D. et al. Diffusion pathways of oxygen species in the phototoxic fluorescent protein KillerRed // *Photochem Photobiol Sci*. – 2010. – Vol. 9(10) – P. 1342-50.
98. Duan C., Adam V., Byrdin M. et al. Structural Evidence for a Two-Regime Photobleaching Mechanism in a Reversibly Switchable Fluorescent Protein // *Journal of the American Chemical Society*, – 2013. – Vol. 135(42). – P. 15841-15850.
99. Duan C., Adam V., Byrdin M. et al. Structural Basis of Photoswitching in Fluorescent Proteins // *Methods in Molecular Biology* Springer New York. – 2014. – P. 177-202.
100. Costantini L.M., Subach O.M., Jauregui-bravo M. et al. Cysteineless non-glycosylated monomeric blue fluorescent protein, secBFP2, for studies in the eukaryotic secretory pathway // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2013. – Vol. 430(3) – P. 1114-1119.

101. Costantini L., Balaban M., Markwardt M. et al. A palette of fluorescent proteins optimized for diverse cellular environments // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 7670.
102. Ren H., Yang B., Ma C. et al. Cysteine Sulfoxidation Increases the Photostability of Red Fluorescent Proteins // *ACS Chemical Biology*. – 2016. – Vol. 11(10). – P. 2679-2684.
103. Bogdanov A.M., Acharya A., Titelmayer A.V. et al. Turning On and Off Photoinduced Electron Transfer in Fluorescent Proteins by π -Stacking, Halide Binding, and Tyr145 Mutations // *Journal of the American Chemical Society*. – 2016. – Vol. 138(14). – P. 4807-4817.
104. Axelrod D., Koppel D.E., Schlessinger J. et al. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics // *Biophysical Journal*. – 1976. – Vol. 16. – P. 1055-1069.
105. Lippincott-Schwartz J., Snapp E., Kenworthy A. Studying Protein Dynamics in Living Cells // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2001. – Vol. 2(6). – P. 444-56.
106. Yokoe H., Meyer T. Spatial dynamics of GFP-tagged proteins investigated by local fluorescence enhancement // *Nature Biotechnology*. – 1996. – Vol. 14. – P. 1252-1256.
107. Fuchs J., Böhme S., Oswald F. et al. A Photoactivatable Marker Protein for Pulse-Chase Imaging With Superresolution // *Nature Methods*. – 2010. – Vol. 7(8). – P. 627.
108. Hell S. W. Fluorescence nanoscopy: Breaking the diffraction barrier by the RESOLFT concept // *NanoBiotechnology*. – 2005. – Vol. 1(3). – P. 296-297.
109. Zhao Z.W., White M.D., Alvarez Y.D. Quantifying transcription factor–DNA binding in single cells in vivo with photoactivatable fluorescence correlation spectroscopy // *Nature Protocols*. – 2017. – Vol. 12(7). – P. 1458-1471.
110. Singh P., Galland R., Finch-Edmondson M. L. et al. 3D Protein Dynamics in the Cell Nucleus // *Biophysical Journal*. – 2017. – Vol. 112(1). – P. 133-142.

111. Aronson D.E., Costantini L.M., Snapp E.L. Superfolder GFP is Fluorescent in Oxidizing Environments when Targeted via the Sec Translocon // *Traffic*. – 2011. – Vol. 12(5). – P. 543-548.
112. Suzuki T., Arai S., Takeuchi M. et al. Development of Cysteine-Free Fluorescent Proteins for the Oxidative Environment // *PLoS ONE*. – 2012. – Vol. 7(5) – P. e37551.
113. Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E. et al. A Monomeric Red Fluorescent Protein // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2002. – Vol. 99(12). – P. 7877-7882.
114. Shaner N., Campbell R., Steinbach P. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nature Biotechnology*. – 2004. – Vol. 22. – P. 1567-1572.
115. Chen J.C., Viollier P.H., Shapiro L. A membrane metalloprotease participates in the sequential degradation of a *Caulobacter* polarity determinant // *Molecular Microbiology*. – 2005. – Vol. 55. – P. 1085-1103.
116. Jain R.K., Joyce P.B., Molinete M. et al. Oligomerization of green fluorescent protein in the secretory pathway of endocrine cells // *Biochemistry Journal*. – 2001. – Vol. 15(360). – P. 645-9.
117. Kaberniuk A.A., Morano N.C., Verkhusha V.V. et al. moxDendra2: an inert photoswitchable protein for oxidizing environments // *Chemical Communications (Cambridge)*. – 2017 – Vol. 53(13) – P. 2106-2109.
118. Kaberniuk A.A., Mohr M.A., Verkhusha V.V. et al. / moxMaple3: a Photoswitchable Fluorescent Protein for PALM and Protein Highlighting in Oxidizing Cellular Environments // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – P. 14738.
119. Seifert M.H., Georgescu J., Ksiazek D. et al. Backbone dynamics of green fluorescent protein and the effect of histidine 148 substitution // *Biochemistry*. 2003. – Vol. 42(9). – P. 2500-2512.

120. Mironov V.A., Khrenova M.G., Grigorenko B.L. et al. Thermal isomerization of the chromoprotein asFP595 and its kindling mutant A143G: QM/MM molecular dynamics simulations // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – Vol. 117(43). – P. 13507-13514.
121. Smyrnova D., Moeyaert B., Michielssens S. et al. Molecular dynamic indicators of the photoswitching properties of green fluorescent proteins // *J. Phys. Chem. B.* – 2015. – Vol. 119(36). – P. 12007-12016.
122. Hayashi I., Mizuno H., Tong K.I. et al. Crystallographic evidence for water-assisted photo-induced peptide cleavage in the stony coral fluorescent protein Kaede // *Journal of Molecular Biology.* – 2007. – Vol. 372. – P. 918-26.
123. Solovyev I.D., Gavshina A.V., Savitsky A.P. Novel phototransformable fluorescent protein SAASoti with unique photochemical properties // *International Journal of Molecular Sciences.* — 2019. — Vol. 20(14). —P. 3399.
124. Higuchi R., Krummel B., Saiki R. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions // *Nucleic Acids Research.* – 1988. – Vol. 16(15). – P. 7351-7367.
125. Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E et al. Short Protocols on Molecular Biology // John Wiley&Sons. 1999. – P. 1-27-28.
126. Kabsch W. XDS // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2010. – Vol. 66(2). – P. 125-132.
127. Evans P.R., Murshudov G.N. How good are my data and what is the resolution? // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2013. – Vol. 69(7). – P. 1204-1214.
128. Vagin A., Teplyakov A. MOLREP: An automated program for molecular replacement // *J. Appl. Crystallogr.* – 1997. – Vol. 30(6). – P. 1022-1025.
129. Collaborative Computational Project, Number 4. The CCP4 suite: programs for protein crystallography // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 1994. – Vol. 50(5). – P. 760-763.
130. Emsley P., Cowtan K. Coot: model-building tools for molecular graphics // *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* – 2004. – Vol. 60(12). – P. 2126-2132.

131. Henderson N., Ai H.W., Campbell R. et al. Structural basis for reversible photobleaching of a green fluorescent protein homologue // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 2007. – Vol. 104(16), – P. 6672-6677.
132. Zhou X., Shi Q., Xing X. et al. Rapid Purification of Enhanced Green Fluorescent Protein from *Escherichia coli* // *Chinese J. Chem. Eng.* – 2006. – Vol. 14(2) – P. 229-234.
133. Samarkina O., Popova A., Gvozdik E. et al. Universal and rapid method for purification of GFP-like proteins by the ethanol extraction // *Protein Expression and Purification*. – 2009. – Vol. 65(1). – P. 108-113.
134. Wiedenmann J., Schenk A., Röcker C. et al. A far-red fluorescent protein with fast maturation and reduced oligomerization tendency from *Entacmaea quadricolor* (Anthozoa, Actinaria) // *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. – 2002. – Vol. 99(18). – P. 11646-11651.
135. Noor S.M., Tey B.T., Tan W.S. et al. Purification of recombinant green fluorescent protein from *Escherichia coli* using hydrophobic interaction chromatography // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2014. – Vol. 37(13). – p. 1873-1884.
136. Smyth D.R., Mrozkiewicz M.K., McGrath W.J. et al. Crystal structures of fusion proteins with large affinity tags // *Protein Sci.* – 2003. – Vol. 12(7). – P. 1313-1322.
137. Holcomb J., Spellmon N., Zhang Y. et al. Protein crystallization: Eluding the bottleneck of X-ray crystallography // *AIMS Biophys.* – 2017. – Vol. 4(4). – P. 557-575.
138. Smits S.H., Mueller A., Grieshaber M.K. et al. Coenzyme- and His-tag-induced crystallization of octopine dehydrogenase // *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* – 2008. – Vol. 64(9). – P. 836-839.
139. Le N.T.P., Phan T.T.P., Truong T.T.T. et al. Investigating the expression of GFP fused with HIS-TAG at N- or Cterminus using plasmid pHT253 and pHT254 in *Bacillus subtilis* // *Tạp chí phát triển Khoa học và Công nghệ*. 2014. – Vol. 17(4). – P. 5-11.

140. Khrenova M.G., Mulashkin F.D., Bulavko E.S. et al. Dipole moment variation clears up electronic excitations in the π -stacked complexes of fluorescent protein chromophores // *J. Chem. Inf. Model.* – 2020. – Vol. 60(12). – P. 6288-6297.
141. Drobizhev M., Hughes T.E., Stepanenko Y. et al. Primary role of the chromophore bond length alternation in reversible photoconversion of red fluorescence proteins // *Sci. Rep.* – 2012. – Vol. 2(1). – P. 688
142. Roy A., Field M.J., Adam V. et al. The nature of transient dark states in a photoactivatable fluorescent protein // *J. Am. Chem. Soc.* – 2011. – Vol. 133(46). – P. 18586-18589.
143. Fron E., Van der Auweraer M., Moeyaert B. et al. Revealing the excited-state dynamics of the fluorescent protein Dendra2 // *J. Phys. Chem. B.* – 2013. – Vol. 117(8). – P. 2300-2313.
144. Andresen M., Stiel A.C., Trowitzsch S. et al. Structural basis for reversible photoswitching in Dronpa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2007. – Vol. 104(32). – P. 13005-13009.
145. Chang J., Romei M.G., Boxer S.G. Structural evidence of photoisomerization pathways in fluorescent proteins // *J. Am. Chem. Soc.* – 2019. – Vol. 141(39). – P. 15504-15508.
146. Zhang X., Chen X., Zeng Z. et al. Development of a reversibly switchable fluorescent protein for super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) // *ACS Nano.* – 2015. – Vol. 9(3). – P. 2659-2667.
147. Zhang X., Zhang M., Li D. et al. Highly photostable, reversibly photoswitchable fluorescent protein with high contrast ratio for live-cell superresolution microscopy // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2016. – Vol. 113(37). – P. 10364-10369.
148. Chang H., Zhang M., Ji W. et al. A unique series of reversibly switchable fluorescent proteins with beneficial properties for various applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2012. – Vol. 109(12). – P. 4455-4460.

- 149.Flors C., Hotta J., Uji-i H. et al. A stroboscopic approach for fast Photoactivation–Localization microscopy with Dronpa mutants // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – Vol. 129(45). – P. 13970-13977.
- 150.Dedecker P., Mo G.C., Dertinger T. et al. Widely accessible method for superresolution fluorescence imaging of living systems // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2012. – Vol. 109(27). – P. 10909-10914.
- 151.Grotjohann T., Testa I., Reuss M. et al. rsEGFP2 enables fast RESOLFT nanoscopy of living cells // *Elife.* – 2012. – Vol. 1. – P. e00248.
- 152.Ando R., Flors C., Mizuno H. et al. Highlighted generation of fluorescence signals using simultaneous two-color irradiation on Dronpa mutants // *Biophys. J.* – 2007. – Vol. 92(12). – P. L97-L99.
- 153.McEvoy A.L., Hoi H., Bates M., et al. MMaple: A photoconvertible fluorescent protein for use in multiple imaging modalities // *PLoS One.* – 2012. Vol. 7(12). – P. e51314.

ПРИЛОЖЕНИЕ

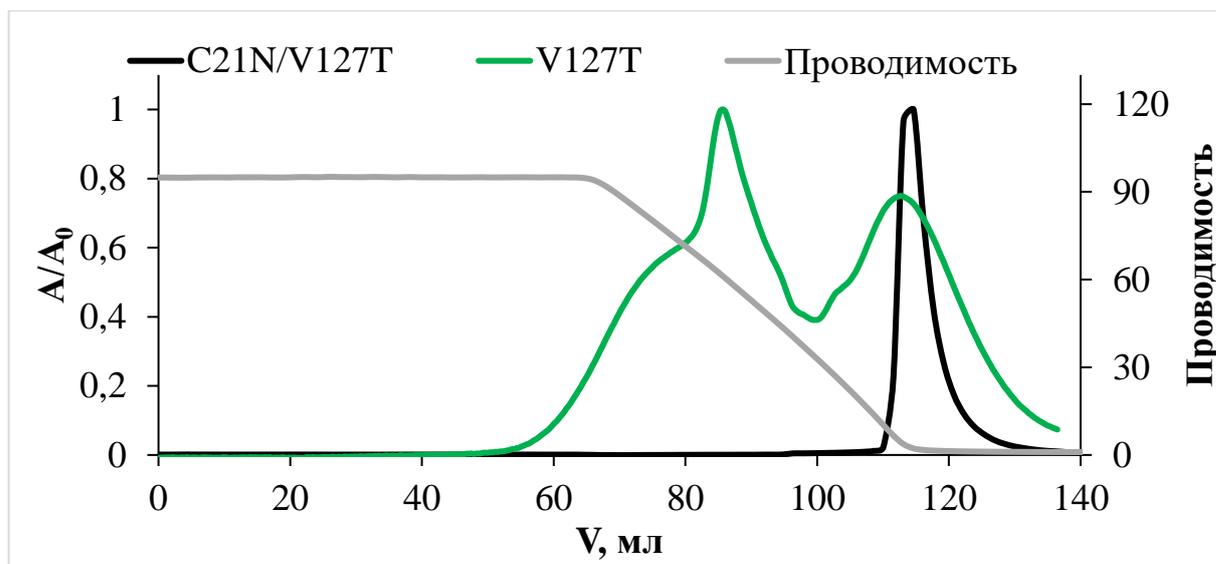


Рисунок П1. Гидрофобная хроматография образцов V127T и C21N/V127T SAASoti. Носитель: HiPrep Butyl FF 16/10, буфер для нанесения: 10 мМ Tris-HCl, 1М (NH₄)₂SO₄, буфер для создания градиента 10 мМ Tris-HCl.

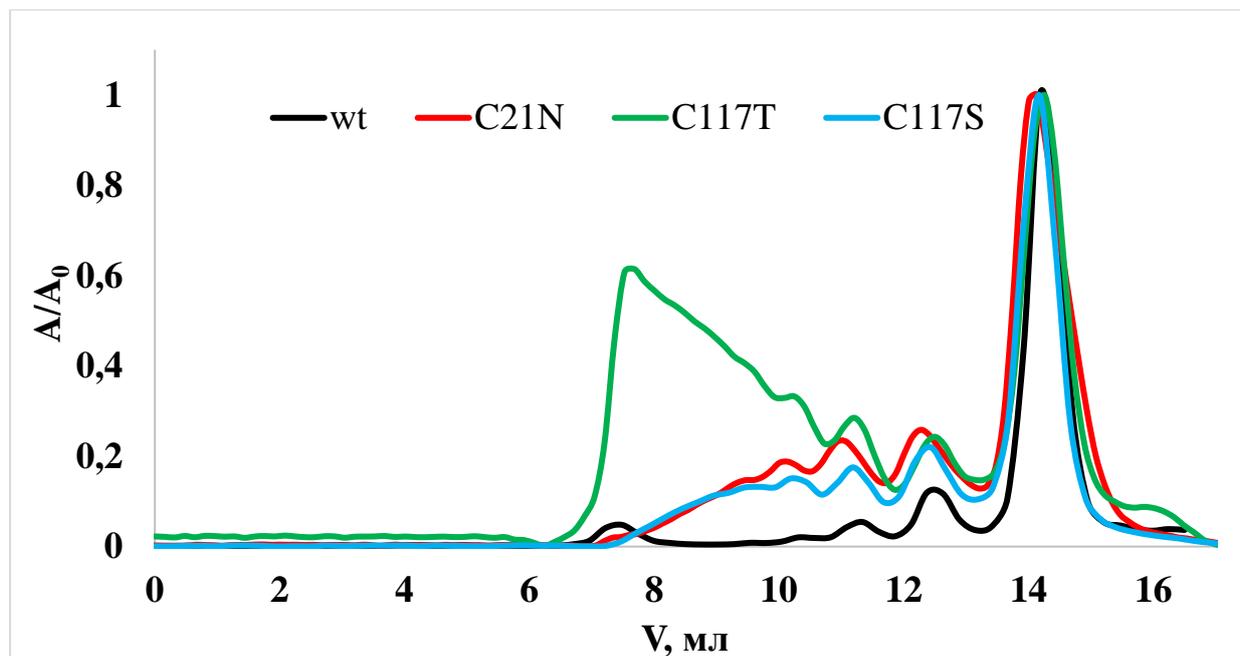


Рисунок П2. Эксклюзионная хроматография образцов C21N, C117T, C117S и wt SAASoti на носителе Superdex G200 100/20 GL в буфере 20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4.

Таблица III. Выравнивание первичных последовательностей SAASoti с бифлуоресцентными флуоресцентными белками IrisFP [60], NijiFP [12], pcDronpa [90] и фотопереключаемым флуоресцентным белком Dreiklang [8]. Голубым (M/F) выделены аминокислотные остатки, замена которых приводит к появлению обратимого фотопереклочения у фотоконвертируемых белков. Выравнивание проводили при использовании сервиса https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi .	
mSAASoti	MALS ---KQYIPDDMELIFHMDGCVNGHYFTIVATGKAKPYEGKQNLKATVTKGAPLPFSTDIILSTVMHYGNRCIV 73
IrisFP	---- [5] --hmsAIKPDmKINLRMEGNVNGHNFVIDGDGTGKPFEGKQSMDLKVEKGGPLPFAFDILLTFAFHUYGNRVFA 75
NijiFP	MN-- [2] G--INLIKEDMRVKVHMEGNVNGHAFVIEGEGKGPYEGTQTANLTVKEGAPLPFSYDILLTAVHYGNRVFT 74
pcDronpa	MRGS [30] GshMSVIKPDmKIKLRMEGAVNGHPFAIEGVGLGKPFEGKQSMDLKVEKGGPLPFAFDILLTFAFHUYGNRVFA 105
Dreiklang	MVSK G--EELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVSGEGDATYGKLTIKF-ICTTGKLPVWPFTLLTTIGYGLMCF 73
mSAASoti	HYPPGI--PDYFKQSFPEGYSWERTFAFEDGGFCVTSADIKLDKNCFIHTSMFHGTNFPADGPPVMQKRTI-QWEKRSIEKM 150
IrisFP	EYPDHI--QDYFKQSFPEGYSWERSLTFEDGGICIARNDITMEGDTFYNKVRFHGVNFPANGPVMQKRTL-KWEPSTEKM 152
NijiFP	KYPEDI--PDYFKQSFPEGYSWERTMTFEDKGICTIRSDISLEGDCFFQVRFKGTNFPANGPVMQKRTL-KWEPSTEKL 151
pcDronpa	KYPENI--VDYFKQSFPEGYSWERSMSYEDGGICIAATNDITLDGDCYIYEIRFDGVNFPANGPVMQKRTV-KWEPSTEKL 182
Dreiklang	RYPDHMKqHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNKYKTRAEVVKFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNHDSHNVYI 153
mSAASoti	TV--SDGIVKGDITMFLLL-EGGGKYRCQFHTSYKAKKV-VEMPOSHYVEHSIERTND-- --DGTQFELNEHAVARLNEI- 222
IrisFP	YV--RDGVLTGDI TMALLL-EGNAHYRCDSRTTYKAKEKGVKLPGYHLVDHCIEILSHDK-DYNKVKLYEHAVA-HSGLP 227
NijiFP	HV--RDGLLVGNINMALLL-EGGGHYLCDSKTTYKAKKV-VQLPDAHFVDHRIEILGNSD-DYNKVKLYEHAVARYSPLP 226
pcDronpa	YV--RDGVLKGDVNMALSL-EGGGHYRCDFKTTYKAKKV-VQLPDYHFVDHRIEIKSHDK-DYSNVNLEHAEAE-HSGLP 256
Dreiklang	MAdkQKNGIKVNFKIRHNIeDGSVOLADHYQQNTPIGDGpVLLP DNHYLSYQSALSCKDPNeKRDMVLLLEFVTAAGITLG 233
mSAASoti	-----
IrisFP	-DNARr 232
NijiFP	-SQVW- 230
pcDronpa	-RQAK- 260
Dreiklang	mDELYk 239

Таблица П2. Выравнивание первичных последовательностей SAASoti с мох-вариантами флуоресцентных белков (moxDendra2 [117], moxEos3.2 [117], moxMaple3 [118], moxNeonGreen [101], moxBFP [101]). Желтым (C) выделены аминокислотные остатки цистеина, экспонированные на поверхности белка SAASoti, зеленым (C) – аминокислотные остатки цистеина, экспонированные «внутри» β-бочонка белка SAASoti. Выравнивание проводили при использовании сервиса https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi .	
mSAASoti ₁	MALSK -QYIPDDMELIFHMDGCVNGHYFTIVATGKAKPYEGKQNLKATVTKGAPLRFSTDILSTVMHYGNRCIVHYR 76
moxDendra2 ₁	MNTPG INLIKEDMRVKVHMEGNVNGHAFVIEGEGKPKPYEGTQTAQLTVKEGAPLRFSDYDILTTAVHYGNRVFTKYP 77
moxEos3.2 ₁	MVS-- --AIKPDMKIKLRMEGNVGNHNFVIDDGTGKPFEGKQSMDELVEKGGPLPFAFDILTTAFHYGNRVFAKYP 73
moxMaple3 ₁	MVSKG[4]MSVIKPDMKIKLRMEGNVNGHAFVIEGEGSKPFEGIQTIDLEVKEGAPLRFAYDILTTAFHYGNRVFTKYP 81
moxNeonGreen ₁	MVSKG[4]MASLPATHE--LHIFGSINGVDFDMVGQGTGNPNNDGYEELNLKSTKGD-LQFSPWILVPHIIGYGFHQYLYR 78
moxBFP ₁	MVSKG EELFTGVVPIILVELDGDVNGHKFSVRGEGEGDATNGKLTLEKF-ISTTGKLPVPWPTLVTTLSHGVQVFARYR 76
mSAASoti ₇₇	PGI--PDYFKQSFPE--GYSWERTFAFEDGGFC
moxDendra2 ₇₈	EDI--PDYFKQSFPE--GYSWERTMTFEDKGIATIRSDISLEGDTFFQNVRFKGTNFPNGPVMQKKTLL--KWEPSTEKL 151
moxEos3.2 ₇₄	DNI--QDYFKQSFPK--GYSWERSLTFEDGGIANARNDITMEGDTFYNKVRFYGTNFPANGPVMQKKTLL--KWEPSTEKM 147
moxMaple3 ₈₂	RKI--PDYFKQSFPE--GYSWERSMTYEDGGIQAATNDITMEEDSFINKIHFKGTNFPNGPVMQKRTV--GWEVSTEKM 155
moxNeonGreen ₇₉	DGM--SPFQAAMVDgSYQVHRTMQFEDGASLTVNRYTYEGSHIKGEAQVKGTGFADGPVMTNSLITaaDWSRS-KKT 154
moxBFP ₇₇	DHMKαHDFEKSAMPE--GYVOERTLFFKDDGTAKTRAEVKKFEGDLYNRIEIKGVDFEKEDGNILGHKLELV-NFNSHNIYI 153
mSAASoti ₁₅₁	TV--SDGIVKGDITMFLLL-EGGGKYRCQFHTSYKAK-KVVE--MPQSHYVEHSIERTND---DGTQFELNEHAVARLN- 220
moxDendra2 ₁₅₂	HV--RDGLLVGNINMALLL-EGGGHYLADEFKTTYKAK-KVVQ--LPDAHFVDHRIEILGQDS-DYNKVKLYEHAVARYS- 223
moxEos3.2 ₁₄₈	YV--RDGVLTDGDIEMALLL-EGNAHYRADFRTTYKAKEKGVK--LPGAHFVDHAIIEILSHDK-DYNKVKLYEHAVAHSGL 221
moxMaple3 ₁₅₆	YV--RDGVLKGDVKMKLLL-KGGSHYRADFRTTYKVQKAVK--LPKAHFVDHRIEILSHDK-DYNKVKLYEHAVARDST 229
moxNeonGreen ₁₅₅	YP--NDKTIISTFKWSYTT-GNGKRYRSTARTTYTFAKPMAAAnLKNQPMYVFRKTELKHSK---TELNFKEWQKAFITDV 228
moxBFP ₁₅₄	MAVκKQNGIKANFKIRHNveDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVL--LPDSHYLSLTSQSKLSKDPNeKRDHMVLLLEFRFTAAGIT 231
mSAASoti ₂₂₁	----EII-- 222
moxDendra2 ₂₂₄	PLPSQVW- 230
moxEos3.2 ₂₂₂	P--DNARR 227
moxMaple3 ₂₃₀	DSMDELYK 237
moxNeonGreen ₂₂₉	MGMDELYK 236
moxBFP ₂₃₂	LGMDELYK 239

Таблица ПЗ. Значения констант скоростей k_1 и k_2 , а также отношение предэкспоненциальных множителей I_1/I_2 в реакции фотопереключения различных форм белка SAASoti, рассчитанные из кинетик обратимого тушения зеленой формы при облучении светом $\lambda_{ex}=470$ нм.

Форма SAASoti	Цикл 1			Цикл 2		
	k_1, c^{-1}	k_2, c^{-1}	I_1/I_2	k_1, c^{-1}	k_2, c^{-1}	I_1/I_2
mSAASoti	0,007	0,02	3,8	0,008	0,024	3,8
C21N	0,005	0,01	3,6	0,005	0,014	1,3
C105V	0,006	0,03	4,6	0,007	0,018	0,5
C71V	0,005	0,01	7,2	0,005	0,017	2,5
C175A	0,001	0,004	0,4	0,003	0,017	8,2