

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук

На правах рукописи

Божанова Нина Георгиевна

**Разработка и изучение флуоресцентных меток методами
моделирования и молекулярной эволюции белков**

специальность 03.01.03 (молекулярная биология)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва — 2017

Работа выполнена в лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук

Научный руководитель:

Лукиянов Константин Анатольевич, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук

Официальные оппоненты:

Хренова Мария Григорьевна, доктор физико-математических наук, ведущий научный сотрудник кафедры физической химии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Субач Фёдор Васильевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории стволовых клеток мозга Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» (ФИЦ КНЦ СО РАН)

Защита состоится «4» октября 2017 года в 10:00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г.Москва, ул.Миклухо-Маклая, д. 16/10.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

Доктор физико-математических наук,

В.А. Олейников



Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

В настоящее время комплексные процессы, происходящие в живых организмах, часто изучают путем детального рассмотрения распределения, локализации, движения и взаимодействия молекул на всех уровнях организации живых систем, от клеточного до организменного.

Большая часть соединений в клетке бесцветна, поэтому наблюдение за биомолекулами почти всегда требует от исследователя введения какой-либо метки. Сегодня для этой цели доступен целый ряд разнообразных инструментов: изотопные маркеры, радиоактивные трассеры, электрохимические сенсоры, колориметрические биосенсоры, флуоресцентные метки и т.д. Применение флуоресцентных меток имеет ряд существенных преимуществ. Среди них – безопасность, низкая токсичность, разнообразие и высокая чувствительность современных флуоресцентных детекторов, позволяющая регистрировать сигнал с большой скоростью, в малых объемах (индивидуальных клетках) и при низкой концентрации.

Идеальная флуоресцентная метка для биоимиджинга должна быть яркой, небольшой, нетоксичной, простой в применении и подходить для решения широкого спектра задач на всех уровнях организации (от *in vitro* до *in vivo*). Она должна флуоресцировать в красной области спектра (облучение таким светом минимизирует проблемы фототоксического эффекта и автофлуоресценции биологических образцов), обладать максимальными эффективностью и специфичностью мечения.

Хотя за последние десятилетия были достигнуты значительные успехи в области флуоресцентного мечения живых систем, позволившие ответить на многие биологические вопросы, задача создания идеальной флуоресцентной метки пока что остается нерешенной и актуальной.

Степень разработанности области исследования

Первой открытой генетически кодируемой флуоресцентной меткой является зелёный флуоресцентный белок (GFP), клонированный более 25 лет назад. В последующие годы было обнаружено несколько других природных флуоресцентных белков, а также то, что на их основе можно получить множество вариантов с различными свойствами.

Замена остатка тирозина хромофор-образующей триады на триптофан привела к получению множества флуоресцентных белков с выдающимися свойствами: цианового белка с 93%-ным квантовым выходом флуоресценции, зелёного белка с самым длинным временем жизни флуоресценции и оранжевого генетически кодируемого фотосенсибилизатора. Кроме того, белки с хромофорами на основе триптофана оказались прекрасными FRET-донорами: в настоящее время наиболее часто используемыми FRET-парами являются пары на основе цианового и жёлтого белков. Однако существует лишь три

триптофан-содержащих белка, характеризующихся флуоресценцией в желтой и/или оранжевой областях спектра.

Перспективным и молодым направлением в создании флуоресцентных меток является поиск флуороген-активирующих белков, позволяющих объединить достоинства генетически-кодируемых меток и синтетических красителей. Флуороген-активирующие белки представляют собой бесцветные белки, способные связывать низкомолекулярные вещества (флуорогены), не обладающие значимой флуоресценцией в свободном виде, но приобретающие такую способность в комплексе.

Первые флуороген-активирующие белки были созданы менее 10 лет назад. Сейчас эта группа насчитывает лишь несколько представителей и их цветовое разнообразие невелико, однако система не имеет явных серьезных ограничений на расширение имеющейся палитры.

Цели и задачи

Целью данной работы являлось изучение потенциала сочетания биологических подходов и различных типов моделирования для разработки и изучения флуоресцентных меток. В частности, в наши задачи входило:

- получение новых триптофан-содержащих флуоресцентных белков с эмиссией флуоресценции в жёлто-оранжевой области спектра
- установление природы различия спектральных свойств полученных жёлтых и оранжевых флуоресцентных белков
- разработка протокола *in silico* поиска потенциальных флуороген-активирующих белков
- нахождение потенциальных флуороген-активирующих белков среди белков с известной структурой и изучение причин, ведущих к ложноположительным результатам
- создание новых флуороген-активирующих белков
- сравнение потенциала экспериментальных и компьютерных методов эволюции белков на примере флуороген-активирующих белков

Научная новизна

В настоящей диссертации, объединив молекулярно-биологические и классические биохимические подходы с анализом модельных химических соединений и компьютерным моделированием, удалось предложить и протестировать новый подход к разработке флуоресцентных меток, создать ряд новых флуоресцентных меток и изучить их свойства.

В ходе выполнения работы были получены два новых мономерных триптофан-содержащих флуоресцентных белка с эмиссией в жёлто-оранжевой области спектра, что является лишь четвёртым примером таких белков. На основе биохимического анализа белков и изучения свойств модельных

соединений была предложена не описанная ранее структура хромофора. Также был разработан новый протокол *in silico* поиска потенциальных флуороген-активирующих белков, основанный на комбинации программ MODELLER, AutoDoc Vina и Rosetta. С его помощью на основе бактериального липокалина B1c и химических аналогов хромофоров флуоресцентных белков был получен ряд новых флуороген-активирующих белков.

Практическая значимость работы

Разработанные в рамках данной работы белки и пары белок-флуороген могут быть использованы для флуоресцентного мечения белков интереса в живых системах и их детекции методами широкопольной и конфокальной флуоресцентной микроскопии, а также микроскопии сверхвысокого разрешения. Улучшение понимания работы флуоресцентных меток в целом, а также описанные в работе методы и протоколы могут облегчить задачу дальнейшего рационального изменения имеющихся и разработки новых инструментов с заданными свойствами.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 138 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, описания полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 213 ссылок. Диссертация содержит 58 рисунков и 13 таблиц.

Апробация работы и публикации

Основные материалы диссертации были доложены на XXVI и XXVII зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2015, 2016 гг.), в рамках углубленного лекционно-практического курса «In vivo imaging: tools, applications, perspectives» (Таллин, Эстония, 2015 г.) и обучающего курса EMBL «Super-Resolution Microscopy» (Гайдельберг, Германия, 2016 г.). По теме диссертации опубликовано три статьи в рецензируемых научных журналах.

Основное содержание работы

Разработка и изучение новых спектральных вариантов флуоресцентных белков, содержащих триптофан в составе хромофора

Получение оранжевых триптофановых флуоресцентных белков

В кодирующую последовательность белка FusionRed была внесена мутация, приводящая к замене 66 тирозина на триптофан. Белок оказался практически не флуоресцентным. Чтобы найти компенсаторные мутации, восстанавливающие флуоресценцию, мы провели случайный мутагенез в результате которого обнаружили две группы белков, обладающие жёлтой и оранжевой флуоресценцией. Самые яркие представители этих двух популяций, названные FR66W-Yellow (M14T/Y66W/N192K) и FR66W-Orange (M14T/K15R/Y66W/C165G), были выделены и охарактеризованы (рисунок 1, таблица 1).

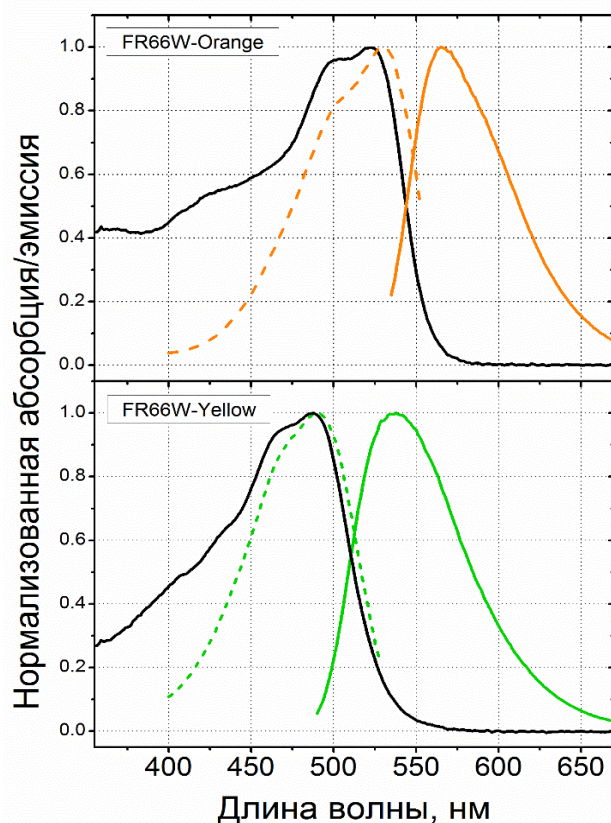


Рисунок 1. Спектральные свойства белков FR66W-Yellow и FR66W-Orange. Чёрная сплошная линия — спектр поглощения, прерывистая цветная линия — спектр возбуждения флуоресценции, сплошная цветная линия — спектр эмиссии флуоресценции.

Таблица 1. Оптические свойства изученных триптофан-содержащих мутантов белка FusionRed с эмиссией в жёлто-оранжевой области спектра.

Название	Возбуждение, нм	Эмиссия, нм	Стоксов сдвиг, нм	FQY, %	ϵ , $M^{-1} \cdot cm^{-1}$
FR66W-Yellow	490	535	45	28	22000
FR66W-Orange	530	565	35	26	19000

FQY (fluorescence quantum yield) — квантовый выход флуоресценции

ϵ — коэффициент экстинкции

Мы решили исследовать феномен обнаружения двух групп белков, попытавшись установить причину различия их спектральных свойств.

Возможные структуры хромофора

Различие спектральных свойств полученных белков может быть вызвано как формированием разных хромофоров, так и нахождением одного и того же хромофора в разных состояниях.

Созревание хромофора в исследуемых белках может идти разными путями (рисунок 2). Замыкание имидазолонового кольца и окисление C α -N связи 65-ой аминокислоты приводит к образованию ацилиминового (DsRed-подобного) хромофора. Последующий гидролиз C α =N связи может вызвать разрыв белковой цепи и формирование кетонного (asFP595-подобного) хромофора (рисунок 2, путь А). Окисление C α -N связи может и не произойти, в результате чего образуется GFP-подобный хромофор (рисунок 2, путь В).

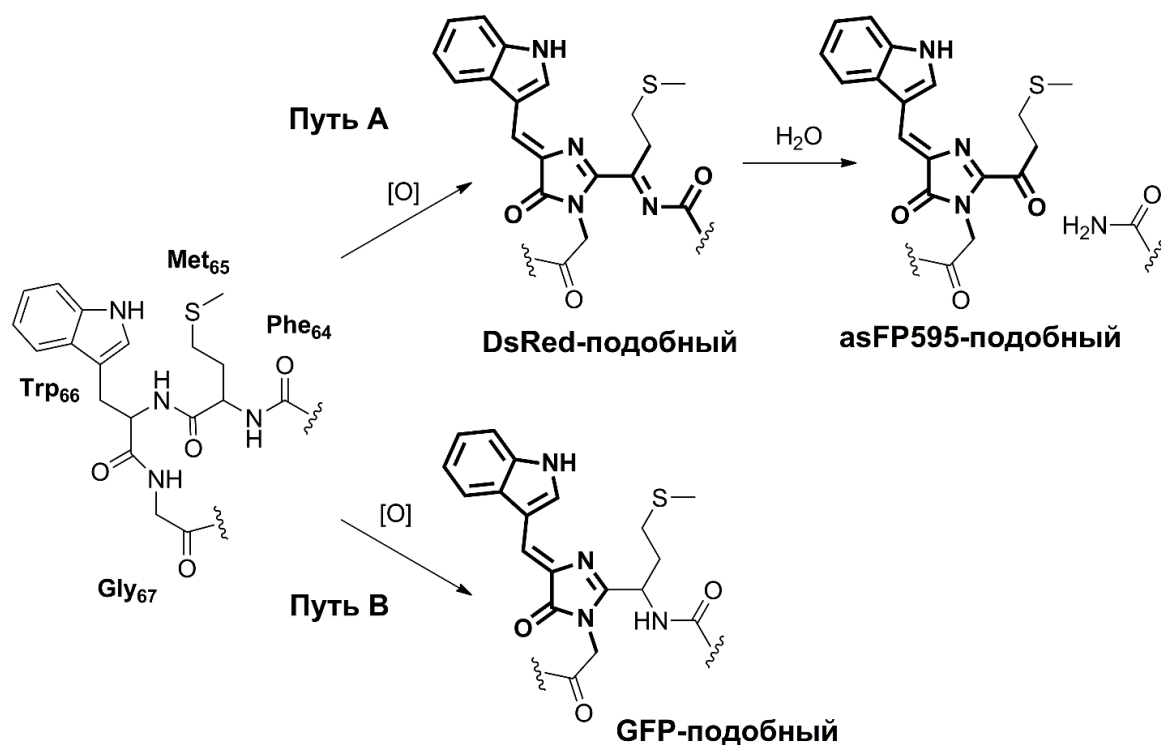


Рисунок 2. Возможные пути созревания хромофора.

Образование GFP-подобного триптофан-содержащего хромофора в исследуемых белках маловероятно, так как он характеризуется циановой флуоресценцией. В одинаковом белковом окружении кетонный хромофор краснее своего ацилиминового предшественника. Таким образом, если полученные жёлтый и оранжевый белки формируют разные хромофоры, то FR66W-Yellow должен содержать ацилиминовый, а FR66W-Orange — кетонный хромофор.

Если оба белка содержат одинаковый хромофор, то различие в свойствах может быть вызвано его ионизацией или изомеризацией. Спектры хромофоров в анионной форме всегда смещены в длинноволновую область относительно

спектров хромофоров в нейтральной форме. Если разница между жёлтыми и оранжевыми белками обеспечивается депротонированием, FR66W-Yellow должен содержать нейтральный, а FR66W-Orange — анионный хромофор. В некоторых случаях спектры различных изомеров одного вещества также не идентичны.

Поведение при денатурации

Мы проанализировали предварительно прогретые и не прогретые образцы белков FR66W-Yellow и FR66W-Orange при помощи денатурирующего электрофореза в полиакриламидном геле (рисунок 3). Во всех образцах можно различить три полосы с кажущимися молекулярными массами 27, 20 и 8 кДа. Полоса 27 кДа соответствует полноразмерному флуоресцентному белку. Две короткие полосы (20 и 8 кДа) похожи на результат разрыва белковой цепи в районе хромофора. Слабая полоса с кажущейся молекулярной массой 22 кДа в непрогретых образцах скорее всего является неденатурированным или частично денатурированным белком.

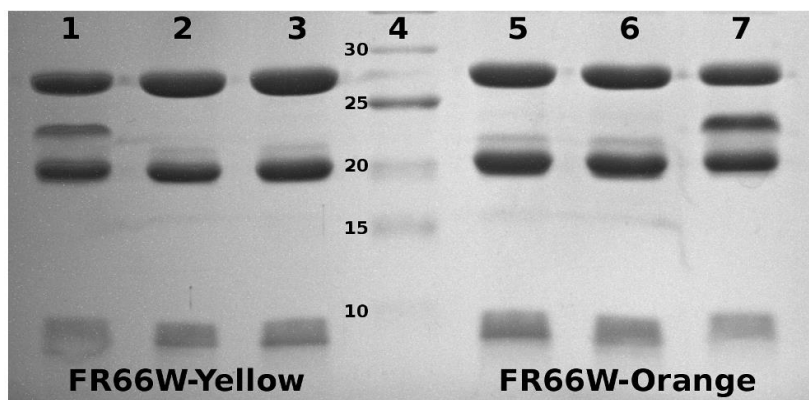


Рисунок 3. Анализ белков FR66W-Yellow и FR66W-Orange при помощи денатурирующего электрофореза в полиакриламидном (15%) геле. 1,2,3 — белок FR66W-Yellow (непрогретый образец, образец, прогретый в течение 0.5 и 10 минут, соответственно). 4 — Маркер. 5,6,7 — белок FR66W-Orange (образец, прогретый в течение 10 и 0.5 минут, соответственно и непрогретый образец).

Так как мы не увидели значительной разницы в интенсивности коротких полос (20 и 8 кДа) между тремя образцами, можно предположить, что разрыв белковой цепи либо существует в нативном белке, либо происходит очень легко.

Мы также исследовали изменения спектральных свойств белков при денатурации. В присутствии 1% SDS оба белка потеряли способность к флуоресценции. При этом спектр поглощения FR66W-Yellow не претерпел видимых изменений, в то время как спектр поглощения FR66W-Orange сместился влево и стал совпадать со спектром FR66W-Yellow.

Так как ацилиминовый хромофор нестабилен в указанных условиях, а спектры FR66W-Yellow не изменились, мы пришли к выводу, что FR66W-Yellow содержит кетонный хромофор. Изменение спектров белка FR66W-

Orange при денатурации нельзя объяснить гидролизом ацилиминового хромофора, так как кетонные хромофоры краснее ацилиминовых. Таким образом, оба белка, видимо, содержат кетонный хромофор, и спектральные различия объясняются либо его ионизацией, либо изомеризацией.

***pH* титрование**

Флуоресцентные белки с ионизированными хромофорами обычно крайне чувствительны к изменению pH среды либо из-за прямого титрования хромофора, либо из-за титрования аминокислотных остатков белка, вовлеченных в стабилизацию иона. Мы провели pH-титрование обоих белков и не обнаружили значительной pH-чувствительности. FR66W-Orange характеризовался стабильной флуоресценцией в широком диапазоне pH (4.9-11.0). Изменение интенсивности флуоресценции FR66W-Yellow в диапазоне pH от 6.5 до 11.0 не превышало 20%. Полученные результаты исключают присутствие ионизованного хромофора в исследуемых белках.

Фотоконверсия

Если свободный хромофор способен к изомеризации, лишь один из изомеров обычно стабилизирован белковым окружением. Однако изомеризация хромофора в нативном белке иногда возможна и может быть индуцирована светом. Мы протестировали свет разной длины волны и обнаружили, что облучение FR66W-Yellow интенсивным синим светом приводит к обратимому сдвигу спектра флуоресценции белка в красную область спектра (рисунок 4)

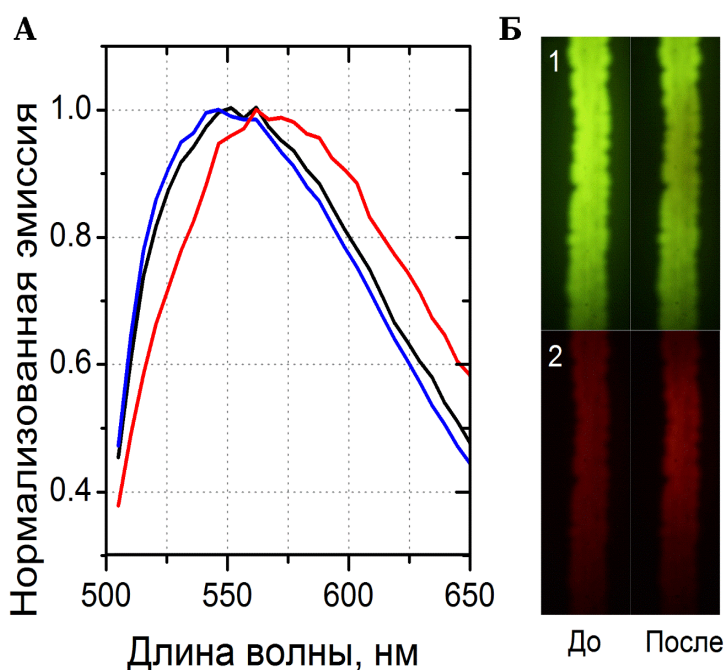


Рисунок 4. Фотоконверсия белка FR66W-Yellow.

А. Спектры эмиссии флуоресценции бактерий, экспрессирующих белок FR66W-Yellow, измеренные при помощи конфокального микроскопа. Синяя линия — до облучения, красная линия — после 7 секунд облучения синим светом (488 нм, 100 мВт), черная линия — через 10 минут после облучения. **Б.** Штрих бактерий, экспрессирующих белок FR66W-Yellow, до (слева) и после (справа) 5 минут облучения синим светом (460-490 нм, 14 мВт/см²) в зелёном (1) и красном (2) каналах флуоресцентного бинокуляра.

Обратимость процесса фотоконверсии ещё раз подтверждает предположение, что оба белка содержат хромофор одного типа (гидролиз ацилиминового хромофора необратим). Она также подтверждает гипотезу о присутствии разных изомеров в двух исследуемых белках.

Модельное соединение

Для дальнейшего изучения структуры хромофоров FR66W-Yellow и FR66W-Orange сотрудники группы синтеза природных соединений ИБХ РАН синтезировали модельное соединение, имитирующее предполагаемый триптофан-содержащий кетонный хромофор белков (рисунок 5). В соответствии с данными ЯМР, в растворе преобладала (93+%) Z-форма вещества. Однако в присутствии сильной кислоты удалось получить смесь, обогащенную (~75%) E-формой.

Положения максимумов поглощения депротонированной формы модельного хромофора оказались заметно сдвинутыми в длинноволновую область спектра относительно FR66W-Orange. Это подтвердило наш вывод, что ни в одном из белков хромофор не находится в ионизированном состоянии. Однако мы также не обнаружили разницы между спектрами поглощения Z- и E-форм соединения: оба были похожи на спектр FR66W-Yellow.

В отличие от тирозин-содержащих хромофоров, триптофан-содержащие могут образовывать не два, а три изомера. Некоторые сигналы на ЯМР спектрах модельного соединения в Z-форме были уширены, что может свидетельствовать о наличии динамического процесса в системе, например, вращения индолильной части вокруг одинарной C-C связи (рисунок 5).

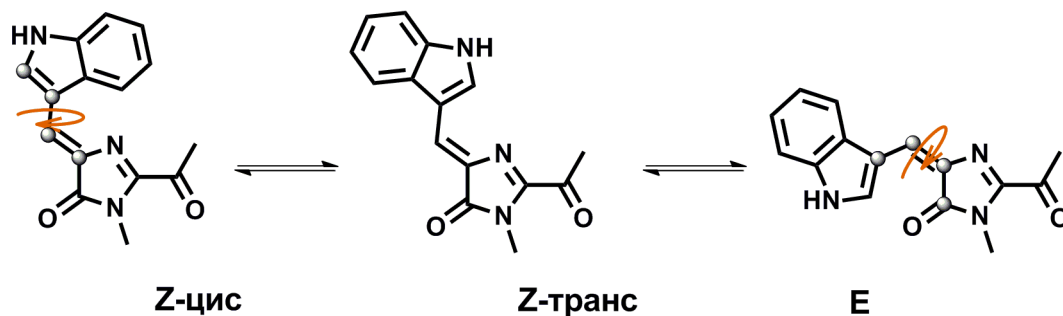


Рисунок 5. Три возможных структурных изомера модельного соединения, имитирующего предполагаемый триптофан-содержащий кетонный хромофор белков.

Для того, чтобы проверить это предположение, наш коллега из университета г. Лунд (Швеция) Роман Гриценко провёл теоретические расчёты термодинамических свойств исследуемой системы. Согласно расчётам в водном растворе присутствуют три изомера: Z-транс (доминантная форма, 76.8%), Z-цис (менее стабильный, 19.6%) и E-транс (3.6%). При этом предсказанная энергия перехода между Z-транс и Z-цис формами довольно низкая, и процесс может спонтанно протекать при комнатной температуре.

Компьютерное моделирование

Так как невозможно получить раствор, содержащий только Z-транс или Z-цис изомер модельного соединения, чтобы проверить гипотезу о наличии разных изомеров хромофора в белках с жёлтой и оранжевой флуоресценцией, мы обратились к компьютерному моделированию.

Роман Гриценко провёл расчёты зависимости максимумов поглощения хромофора от его геометрии. Они показали, что максимум спектра поглощения Z-транс изомера значительно смещён в длинноволновую область по сравнению с Z-цис и E-транс формами (рисунок 6А). При этом теоретически рассчитанный спектр смеси всех изомеров (сумма спектров с учётом представленности изомера в смеси) хорошо согласовывался с экспериментально полученным спектром поглощения модельного соединения (рисунок 6Б).

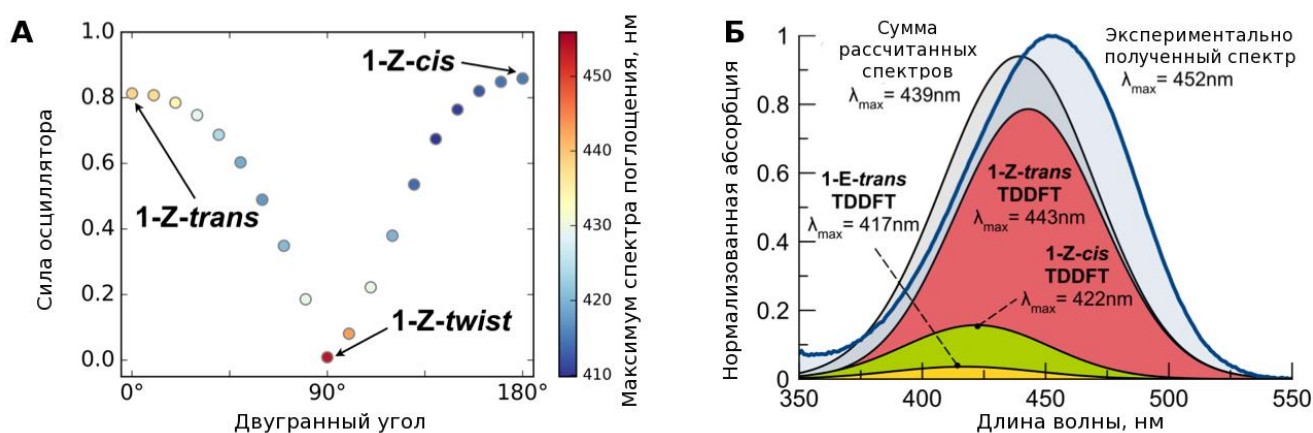


Рисунок 6. Влияние геометрии модельного соединения на его спектральные свойства. **А.** зависимость длины волны максимума спектра поглощения и силы осциллятора от величины двугранного угла между двумя частями сопряженной π -системы. **Б.** Сравнение теоретически рассчитанного спектра смеси всех изомеров с экспериментально полученным спектром поглощения модельного соединения в ацетонитриле.

Таким образом, на основе анализа свойств белков FR66W-Yellow и FR66W-Orange, исследования модельного соединения хромофора и компьютерных расчётов мы установили, что оба белка содержат нейтральный кетонный триптофан-содержащий хромофор. В FR66W-Orange он находится в Z-транс конформации, в то время как FR66W-Yellow может содержать либо Z-цис, либо E-транс форму, что ещё предстоит установить.

Разработка и изучение флуоресцентных меток на основе флуороген-активирующих белков

Системы мечения на основе флуороген-активирующих белков состоят из двух равнозначных компонентов — белка и флуорогена, — совместно определяющих основные параметры системы: спектральные свойства, совместимость с живыми объектами, возможность применения для тех или иных целей и т.д.

Выбор флуорогенов

При выборе флуорогенов были выдвинуты следующие требования: вещества должны быть нетоксичными, легко и быстро проникать через неповрежденную мембрану клетки, обладать небольшим размером, флуоресценцией в видимой или более длинноволновой областях спектра и высокой флуорогенностью. Перечисленные свойства имеют хромофоры флуоресцентных белков.

Сотрудниками группы синтеза природных соединений ИБХ РАН ранее были синтезированы библиотеки производных стабильных в водных растворах хромофоров флуоресцентных белков GFP и Kaede, а также их конформационно фиксированных аналогов, которые и были использованы в данной работе.

Чтобы не тестировать заведомо непригодные для использования в намеченных целях вещества, мы проанализировали различные физико-химические свойства данных соединений. Из рассмотрения исключили флуорогены со слишком малой растворимостью в воде, низким флуорогенным потенциалом и изначально высоким квантовым выходом флуоресценции в водных растворах.

Поиск флуороген-активирующих белков

В первую очередь было решено попробовать найти белки, способные связывать выбранные флуорогены, среди белков с известными структурами.

In silico скрининг

Из доступных в базе данных PDB структур мы выбрали белки *E.coli* длиной менее 500 аминокислотных остатков снятые с разрешением не хуже 3.0 Å. Этим критериям удовлетворяло чуть более 3 000 белков.

Пригодные структуры выбирали на основе результатов докинга, проведенного с помощью программы AutoDoc Vina. Сначала все структуры проверили на способность связывания хромофора GFP. Лучшие 500 белков затем использовали для анализа взаимодействия с различными Kaede-подобными флуорогенами.

После анализа результатов было принято решение клонировать и экспрессировать гены четырёх белков: 3HO2 (β -кетоацил-АЦФ-синтаза II), 1DOS (фруктозобисфосфат-альдолаза), 2QRY (периплазматический тиамин-связывающий белок) и 1PVS (3-метиладенин-ДНК-гликозилаза II).

Характеристика найденных белков

Оценку взаимодействия выбранных белков с флуорогенами проводили следующим образом: небольшое количество металл-аффинной смолы TALON с иммобилизованным на ней выделенным исследуемым белком смешивали с одним из флуорогенов и измеряли флуоресценцию. Флуоресцентный сигнал сравнивали с сигналом контроля. Ни один из белков не показал возрастания флуоресценции при добавлении GFP-подобных флуорогенов. Из семи выбранных для анализа Kaede-подобных флуорогенов добавление четырех (рисунок 7) вызвало заметное увеличение флуоресцентного сигнала. Для каждой такой пары белок-флуороген было проведено титрование (рисунок 8).

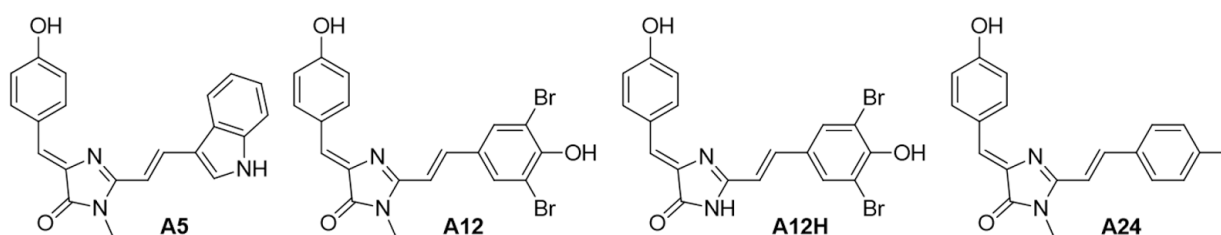


Рисунок 7. Структуры Kaede-подобных флуорогенов, продемонстрировавших возрастание флуоресценции при взаимодействии с белком.

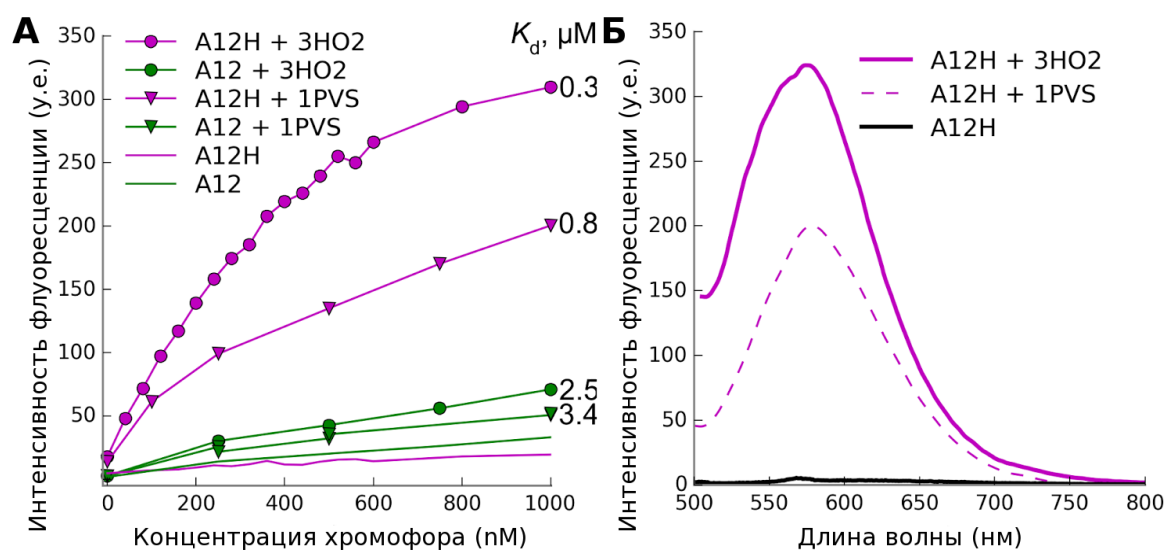


Рисунок 8. Пример *in vitro* анализа взаимодействия белков с флуорогенами. **А.** Кривые титрования белков 3HO2 и 1PVS флуорогенами A12 (зелёные линии) и A12H (малиновые линии). Маркеры, показывающие измеренные значения, соединены для наглядности линиями. Справа от кривой указана рассчитанная константа диссоциации комплекса. **Б.** Спектры эмиссии флуоресценции раствора чистого флуорогена (черная линия) и комплексов флуорогена с белками.

Многие из исследованных пар белок-флуороген имели микромолярные и даже субмикромолярные константы диссоциации. В большинстве случаев возрастание флуоресценции при связывании флуорогена белком было незначительным и не превышало двух раз. Тем не менее, истинно

флуорогенное поведение, приводящее к возрастанию квантового выхода флуоресценции и/или коэффициента экстинкции комплекса, также было обнаружено. Так, взаимодействие флуорогена A12H с белками 3HO2 и 1PVS характеризовалось увеличением яркости флуоресценции более чем на два порядка.

Анализ причин различий в флуорогенности

Чтобы попытаться понять причину различий в флуорогенности комплексов, мы провели анализ взаимодействия некоторых изученных *in vitro* пар белок-флуороген с помощью протокола докинга низкомолекулярных лигандов программы Rosetta. Хотя в целом как общая энергия взаимодействия одного белка со всеми лигандами, так и природа, количество и энергия лиганд-стабилизирующих взаимодействий для всех флуорогенов были схожими, в случае комплексов, проявивших высокую флуорогенность, докинг сходился к единственному положению флуорогена в лиганд-связывающем кармане (рисунок 9Б), в то время как для других наблюдался комплекс альтернативных вариантов (рисунок 9А,В,Г). Наличие различных структур с примерно одинаковой энергией может означать недостаточную фиксацию флуорогена в белковой глобуле, приводящую к возможности безызлучательной диссипации поглощенной энергии за счёт подвижности лиганда.

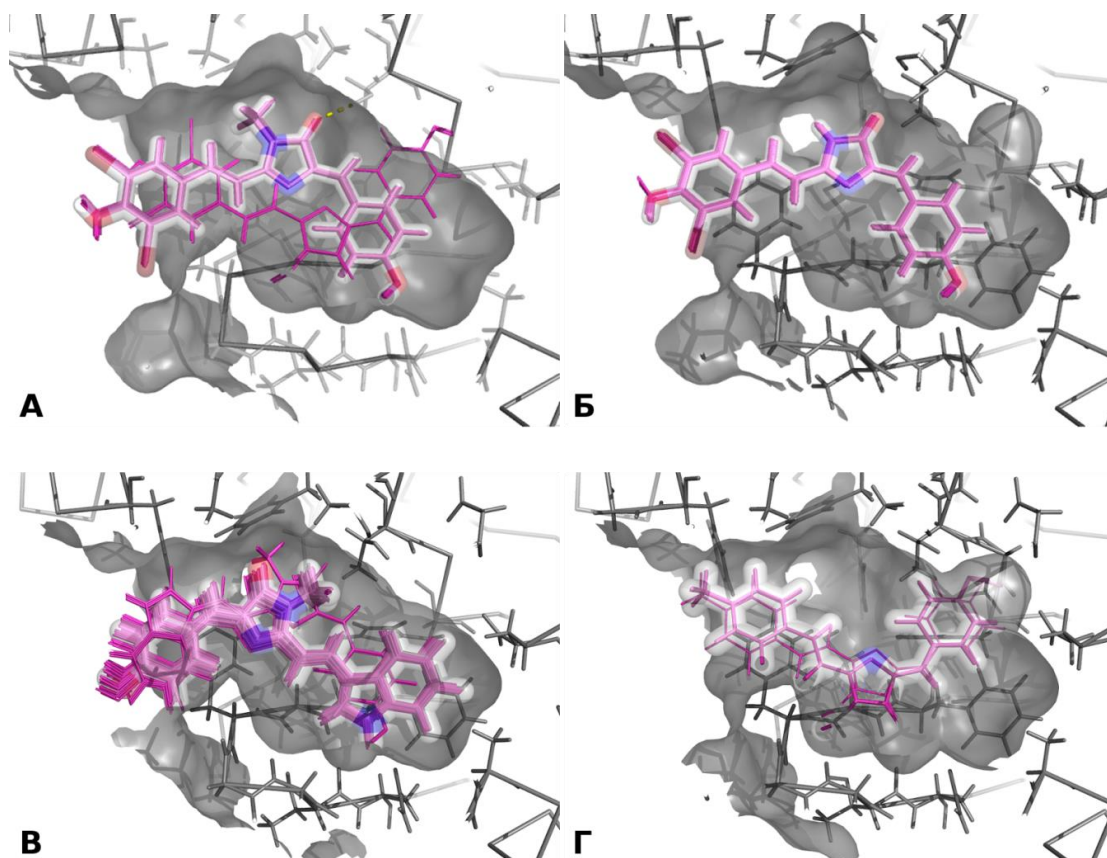


Рисунок 9. Результаты докинга флуорогенов A12 (А), A12H (Б), A5 (В) и A24 (Г) с помощью программы Rosetta в белок 3HO2. Малиновым цветом показано положение хромофора в 50 лучших моделях. Серым цветом обозначен лиганд-связывающий карман белка.

Описанный докинг в программе AutoDoc Vina несомненно выигрывает по скорости и поэтому, в отличие от программы Rosetta, пригоден для скрининга больших библиотек. Последующий анализ лучших результатов при помощи более медленных, но более точных алгоритмов докинга можно использовать в качестве дополнительного критерия отбора.

Несмотря на то, что в некоторых парах белок-флуороген наблюдалось значительное возрастание яркости флуоресценции (более 170 раз для A12H-3HO2), итоговые квантовые выходы флуоресценции комплексов (несколько процентов) в сочетании с не очень высокими коэффициентами экстинкции ($30\,000\text{--}40\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и неустойчивостью флуорогена в клеточной культуре препятствовали успешному применению найденных белков в качестве флуоресцентной метки *in vivo*.

Создание флуороген-активирующих белков

На следующем этапе работы мы решили объединить разработанный протокол поиска с дополнительным этапом *in silico* мутагенеза.

Моделирование

Основой для создания флуороген-активирующего белка стал липокалин B1c из *E. coli*, так как он не содержит дисульфидных связей, а в базе данных PDB для него существуют три кристаллические структуры. Анализ структур позволил выбрать 23 аминокислоты, которые вносят существенный вклад в формирование лиганд-связывающего кармана. С помощью программы MODELLER было произведено моделирование структур всех возможных мутантов белка B1c по выбранным позициям с не более чем двумя заменами относительно исходной последовательности. Для каждой из полученных структур был проведен докинг аналога хромофора GFP, по результатам которого для проверки *in vitro* было отобрано 20 вариантов.

Лишь 5 из 20 мутантов не продемонстрировали значительного увеличения интенсивности флуоресценции ни с одним из исследованных в скрининге флуорогенов. Далее мы исключили из рассмотрения мутанты, обладающие интенсивной окраской до добавления флуорогенов, так как это указывает на связывание ими какого-то природного лиганда. Из флуорогенов были выбраны лишь те, что давали яркий сигнал, но только с небольшим количеством мутантов, так как эффективное взаимодействие с множеством мутантов указывает на низкую специфичность связывания. В результате мы продолжили работу с двумя белками (16912 и 78776) и двумя флуорогенами M739 и M774 (рисунок 10, таблица 2).

Изучение роли замен

Каждый из выбранных белков (16912 и 78776) имеет две аминокислотные замены относительно белка дикого типа. Для того чтобы понять роль внесенных мутаций, мы сделали четыре мутанта, каждый из которых содержал лишь одну замену, и исследовали их взаимодействие с флуорогенами

Таблица 2. Свойства выбранных на основе *in vitro* анализа пар белок-флуороген.

	Белок	16912	78776	свободный флуороген
	Замены	A27C / L132N	V65F / L132Q	n.d.
M739	λ_{ex} , нм	513	546	520
	λ_{em} , нм	542	565	563
	FQY, %	32	15	3.5
	FI @ λ_{max}	86	10.5	n.d.
	K_d , мкМ	0.1	9	n.d.
M774	λ_{ex} , нм	515	552	522
	λ_{em} , нм	545	568	568
	FQY, %	20	12	2.2
	FI @ λ_{max}	65	17	n.d.
	K_d , мкМ	0.5	5.0	n.d.

λ_{ex} — максимум спектра возбуждения флуоресценции

λ_{em} — максимум спектра эмиссии флуоресценции

FQY (fluorescence quantum yield) — квантовый выход флуоресценции

FI @ λ_{max} — максимальное возрастание флуоресцентного сигнала

K_d — константа диссоциации

n.d. — не определяли

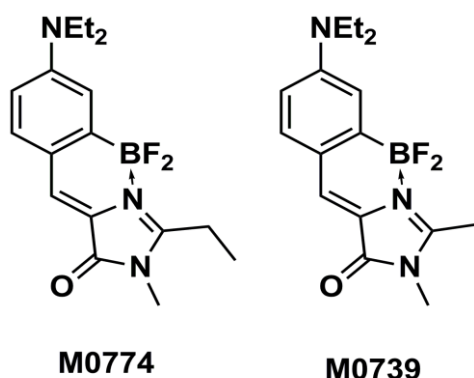


Рисунок 10. Структуры выбранных для дальнейшей работы флуорогенов

Наиболее очевидной оказалась роль замены L132N: белки с этой мутацией имели пониженную константу связывания с флуорогенами. Это может объясняться образованием аспарагином водородной связи, стабилизирующей флуороген в лиганд-связывающем кармане.

Так как ни один из точечных мутантов не проявлял спектральных свойств белка 78776 (сдвинутый в длинноволновую область спектр возбуждения флуоресценции), можно предположить кумулятивный эффект замен V65F и L132Q. Из предыдущих исследований известно, что многие борированные GFP-подобные флуорогены обладают ярко выраженным сольватохромизмом — их спектральные свойства сильно зависят от растворителя: с ростом полярности растворителя спектры смещаются в красную область. Введение двух аминокислот с большими боковыми цепями (V65F и L132Q) могло уменьшить

размер кармана и привести к увеличению экспонированности связанных флуорогенов в воду.

Роль замены A27C вызывает больше всего вопросов, так как цистеин располагается вдали от предсказанного при моделировании положения лиганда в белке. Отличием мутанта A27C от белка дикого типа является его значительно менее выраженная окрашенность. Возможно данная замена неполярной аминокислоты на полярную затрудняет взаимодействие белка с природным гидрофобным лигандом или влияет на фолдинг.

Использование мутантов липокалина в качестве метки для флуоресцентной микроскопии

Чтобы проверить возможность использования пар белок-флуороген *in vivo*, мы создали ряд конструкций, представляющих собой белки слияния гистона H2B или белков цитоскелета с самыми, на наш взгляд, перспективными мутантами (A27C, 16912 и 78776).

Временная трансфекция клеток млекопитающих подтвердила, что созданные белки могут быть успешно использованы в качестве флуоресцентной метки для широкопольной и конфокальной микроскопии (рисунок 11). Наиболее перспективным выглядит использование белков 16912 и A27C, обладающих более высоким квантовым выходом флуоресценции.

Использование мутантов липокалина в качестве метки для микроскопии сверхвысокого разрешения

Так как максимально достижимое разрешение флуоресцентной микроскопии составляет 200-350 нм, а многие клеточные структуры имеют меньший размер, в последнее время активно развиваются подходы, позволяющие повысить разрешающую способность флуоресцентного микроскопа (так называемые методы микроскопии сверхвысокого разрешения). Среди них — микроскопия структурированного освещения (SIM, structured illumination microscopy), микроскопия истощения флуоресценции вынужденным излучением (STED, stimulated emission depletion), локализационная микроскопия одиночных молекул (SMLM, single-molecule localization microscopy) и др.

В методах локализационной микроскопии увеличения разрешения достигают за счет получения серии изображений с очень низкой плотностью флуоресцентных сигналов, вычисления положения каждой флуоресцирующей молекулы и последующего наложения всех обработанных кадров. Необходимой плотности флуоресцентных сигналов в течение длительного времени можно добиться разными способами, например, используя белок, обратимо взаимодействующий с флуорогенным красителем, что впервые было показано на примере малахитового зелёного, связываемого одноцепочечным антителом.

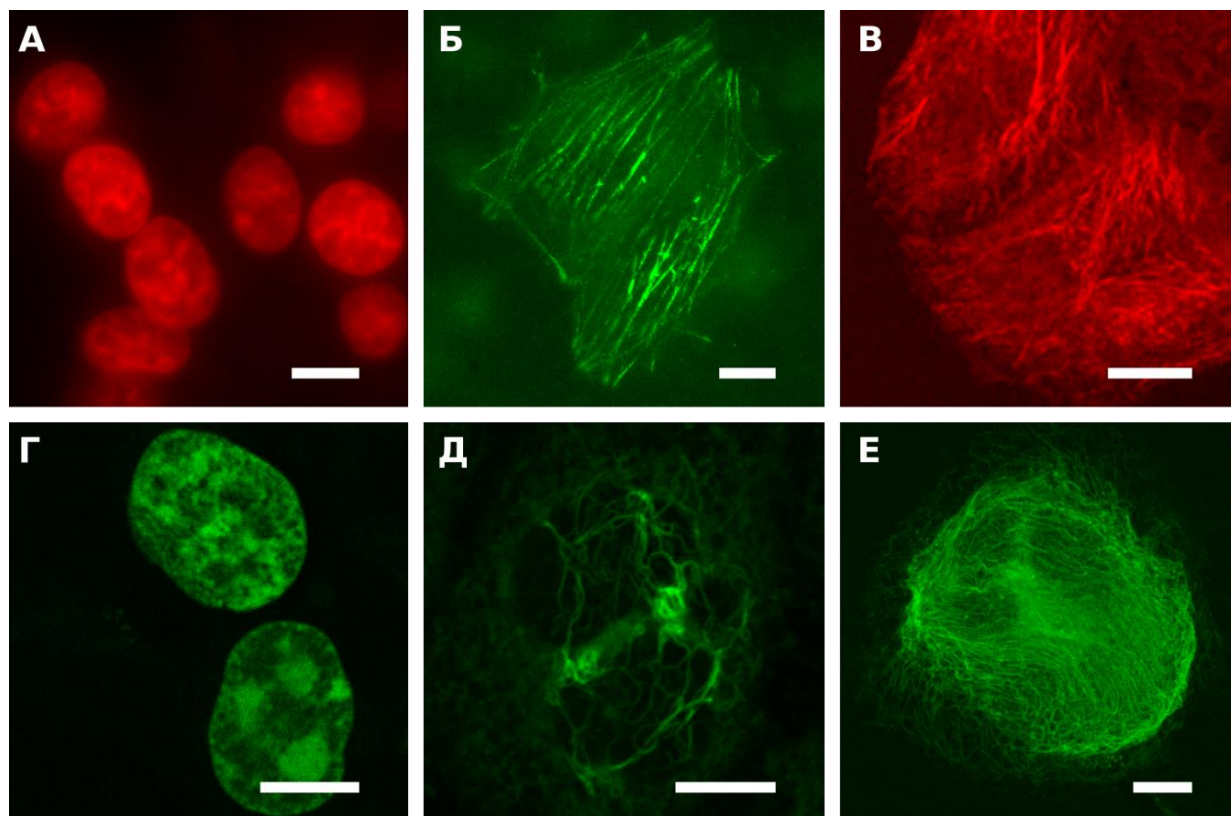


Рисунок 11. Флуоресцентная микроскопия живых клеток, экспрессирующих конструкции с мутантами белка *Vlc*, с флуорогеном *M739*; масштабная линейка 10 мкм. **А.** Клетки линии *HEK293T*, временно трансфицированные вектором *H2B-TagBFP-78776* (широкопольная микроскопия, набор фильтров *TexasRed* (562/40, 624/40)); **Б.** Клетки линии *NIH-3T3*, временно трансфицированные вектором *α-actinin-16912* (широкопольная микроскопия, набор фильтров *GFP* (470/40, 525/50)); **В.** Клетки линии *HeLa Kyoto*, временно трансфицированные вектором *α-actinin-78776* (конфокальная микроскопия, возбуждение: 543 нм, эмиссия: 560-600 нм); **Г.** Клетки линии *HEK293T*, временно трансфицированные вектором *H2B-TagBFP-16912* (конфокальная микроскопия, возбуждение: 488 нм, эмиссия: 520-560 нм); **Д.** Клетки линии *HeLa Kyoto*, временно трансфицированные вектором *vimentin-TagBFP-A27C* (конфокальная микроскопия, возбуждение: 488 нм, эмиссия: 520-560 нм); **Е.** Клетки линии *HeLa Kyoto*, временно трансфицированные вектором *keratin-16912* (конфокальная микроскопия, возбуждение: 488 нм, эмиссия: 520-560 нм).

Наши коллеги из лаборатории флуоресцентного биоимиджинга (НижГМА, Нижний Новгород, Россия) протестировали и подтвердили пригодность разработанной системы флуоресцентного мечения для локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения (рисунок 12). При этом лучшие результаты были получены для белков *A27C* и *78776*, обладающих более низкими константами диссоциации и, соответственно, быстрее обменивающих флуороген.

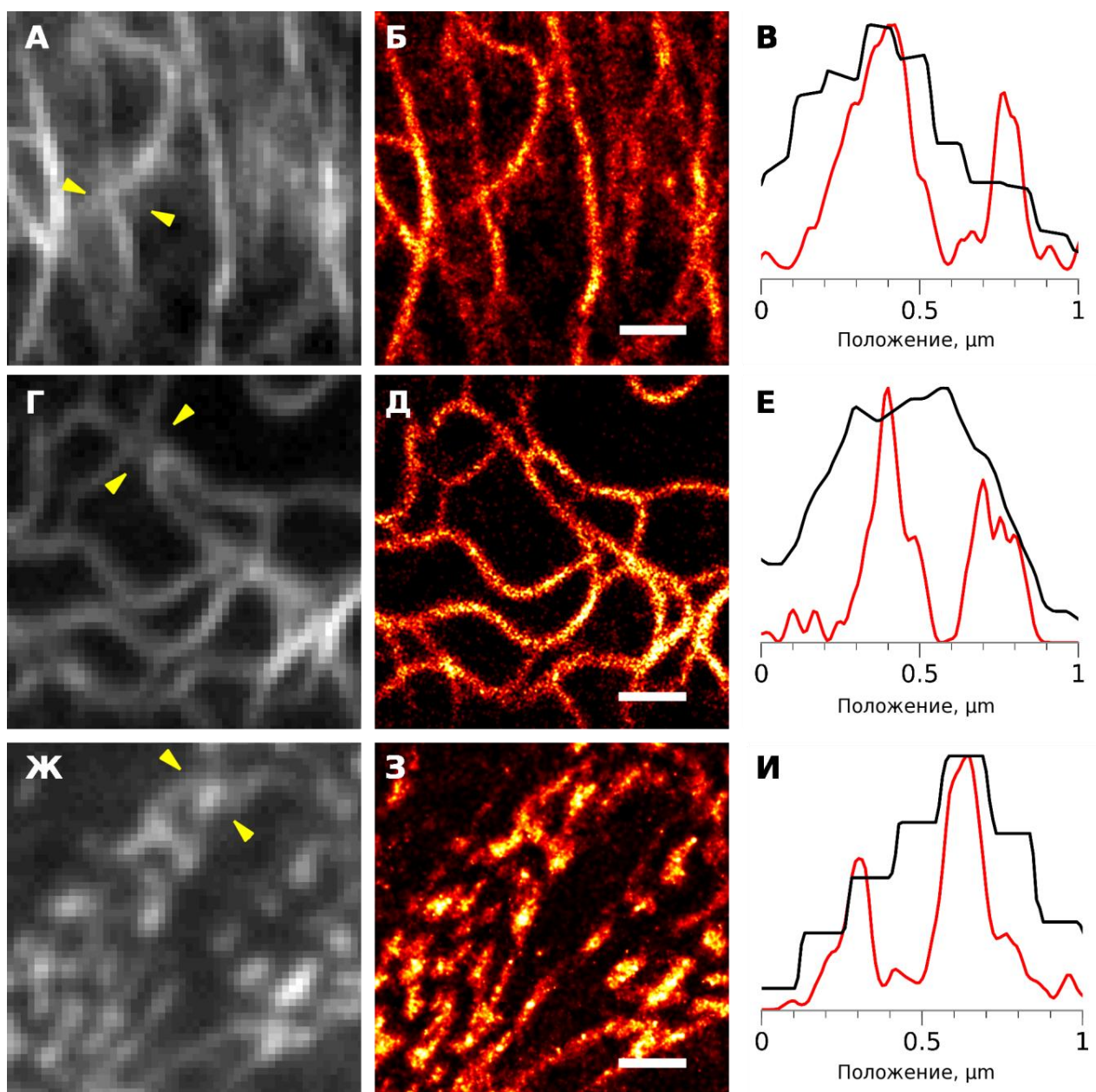


Рисунок 12. Микроскопия сверхвысокого разрешения. Живые клетки линии *HeLa Kyoto*, временно трансфицированные векторами, кодирующими белки слияния с мутантами белка *Bic*; масштабная линейка 1 мкм. **АБВ.** *Keratin-16912*; **ГДЕ.** *Vimentin-TagBFP-A27C*; **ЖЗИ.** *α-actinin-78776*. **АГЖ.** Широкопольная микроскопия; **БДЗ.** Реконструкция по 5000 кадрам изображения сверхвысокого разрешения; **ВЕИ.** Нормализованные профили интенсивности флуоресцентного сигнала участка изображения между стрелками, показанными на кадрах широкопольной микроскопии; черная кривая — широкопольная микроскопия, красная кривая — реконструкции изображений сверхвысокого разрешения.

Улучшение созданных белков

Компьютерное моделирование белков за последнее время достигло значительных успехов, однако до сих пор точность таких вычислений ограничена. Часто удается получить лишь минимально детектируемый эффект, который затем пытаются усилить другими способами, например, путем внесения случайных замен в ген, кодирующий белок, с последующим отбором мутантов с требуемыми свойствами. В нашем случае моделирование сразу привело к получению вариантов белка, пригодных для использования, однако мы решили попытаться их улучшить.

Случайный мутагенез

Библиотека случайных мутантов была получена на основе белка 16912, обладающего высокими аффинностью и квантовым выходом флуоресценции.

Первый раунд случайного мутагенеза выявил два новых белка, значительно превосходящих 16912 по яркости: 16912rnd1 (F44Y, N52T, R74I) и 16912rnd20 (F44L, K96E). Часть найденных замен располагалась далеко от предполагаемого места связывания флуорогена, поэтому не могла быть нами предсказана во время первого моделирования в связи с собственноручно наложенными ограничениями.

Матрицей для второго раунда случайного мутагенеза послужили оба новых варианта. Анализ библиотеки на основе 16912rnd1 выявил ещё один перспективный вариант — 16912rnd1rnd1, имеющий одну обратную замену (N52T) и новую замену (K50R) относительно 16912rnd1. В библиотеке на основе 16912rnd20 более ярких мутантов найдено не было.

Спектры эмиссии и возбуждения флуоресценции комплексов новых белков с флуорогенами совпадали по форме и положению максимумов со спектрами комплексов исходного белка 16912, квантовый выход флуоресценции во всех трех случаях был немного выше, а константы диссоциации снизились до 30-50 нМ.

***In silico* мутагенез**

Мы также попробовали улучшить имеющиеся белки при помощи компьютерного моделирования в программе Rosetta.

Анализ мутаций в 50 лучших дизайнах на основе каждого из комплексов позволил выявить наиболее перспективные замены: F44A, F44Q, N67F, S80Y, E81V и S98A. Более того, один из лучших предсказанных мутантов белка 16912 содержал только пять замен, все из указанного списка. Мы решили создать ряд новых вариантов, содержащих комбинации этих замен, на основе белков 16912 и липокалина дикого типа.

Как и в случае белков, полученных случайным мутагенезом, спектры эмиссии и возбуждения флуоресценции комплексов, образованных новыми мутантами, совпадали со спектрами исходных белков. Большинство смоделированных белков характеризовались увеличенными квантовым

выходом флуоресценции и максимальной разницей между флуоресценцией свободного и связанного флуорогенов, но константы диссоциации были немного выше таковых для исходных.

В целом, умеренное снижение константы связывания с лигандом (особенно для исходно высокоафинного белка 16912), следует рассматривать как положительный результат, так как это увеличивает вероятность обмена флуорогена, что повышает фотостабильность комплекса и, следовательно, улучшает свойства флуоресцентной метки.

Использование улучшенных вариантов в качестве метки для флуоресцентной микроскопии

Мы проверили новые мутанты липокалина B1c *in vivo*, выбрав наиболее на наш взгляд перспективные варианты из каждой из двух групп.

Все проверенные белки имели правильную локализацию и увеличенную яркость в сравнении со спектрально схожими исходными мутантами (рисунок 13). При этом, как и предполагалось, конструкции с белком 16912rnd1rnd1, имеющим низкую константу диссоциации, не обладали высокой фотостабильностью.

Проявивший себя лучшим образом в опытах *in vivo* белок 16912_F44A был сравнён нашими коллегами из Нижнего Новгорода с предыдущими вариантами в экспериментах по локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения. Их данные также подтвердили превосходство улучшенного при помощи *in silico* моделирования мутанта.

Дальнекрасные флуорогены

Поглощение биомолекулами света в видимой и близкой к видимой областях спектра затрудняет применение ряда флуоресцентных меток для исследования крупных интактных организмов. Оно минимально между 700 и 900 нм (так называемое окно прозрачности). Флуоресцентные метки, возбуждающиеся светом и испускающие свет в пределах или близко к окну прозрачности, очень востребованы. Возбуждение и эмиссия флуоресценции используемых нами флуорогенов могут быть смещены в красную область спектра за счет добавления заместителей, увеличивающих систему сопряженных связей соединения. По нашей просьбе сотрудники группы синтеза природных соединений ИБХ РАН синтезировали ряд подобных веществ (рисунок 14).

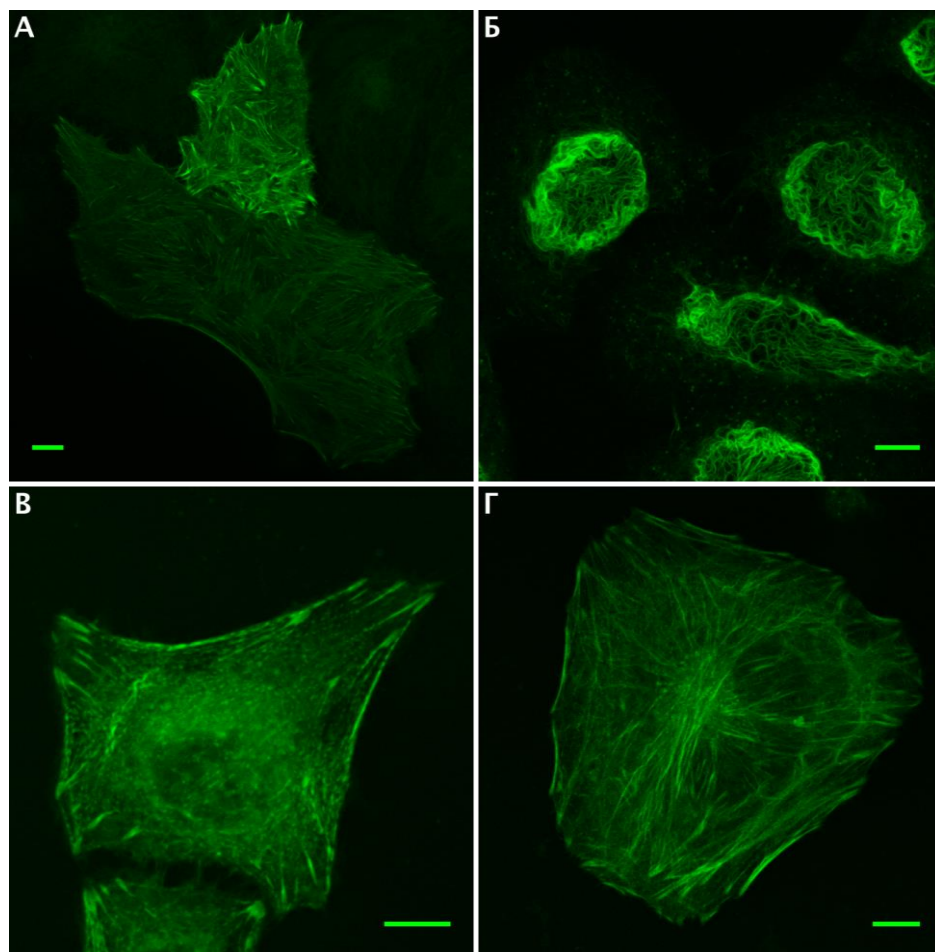


Рисунок 13. Флуоресцентная конфокальная микроскопия конструкций с мутантами белка *Vlc*, полученными результате *in silico* и случайного мутагенеза, и флуорогеном M739 в живых клетках линии HeLa Kyoto; возбуждение 488 нм, эмиссия 520-560 нм; масштабная линейка 10 мкм. **А.** LifeAct-16912_F44A; **Б.** Vimentin-16912_F44A; **В.** Actinin-Qwd_F44A; **Г.** LifeAct-16912rnd1rnd1.

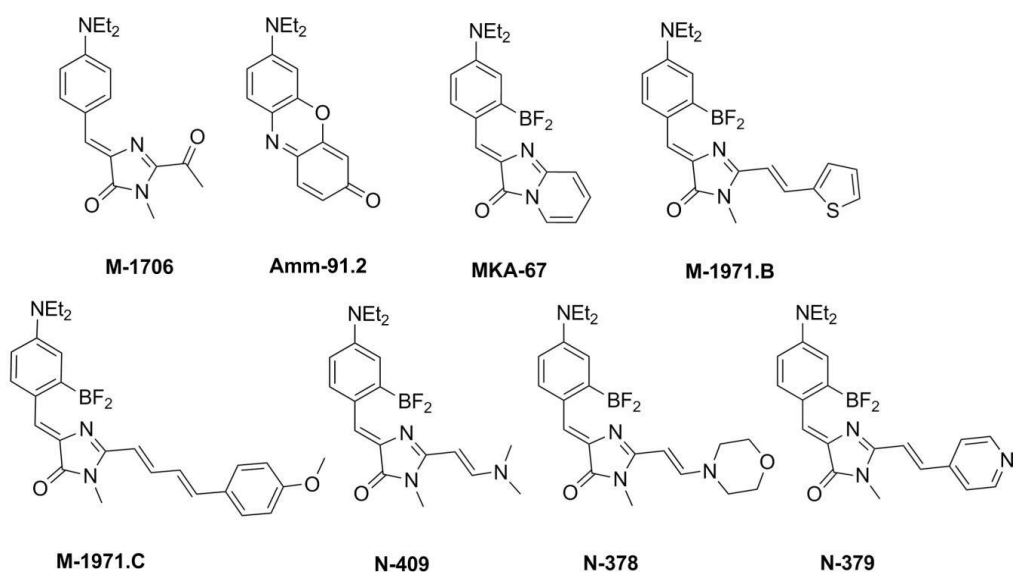


Рисунок 14. Структуры соединений-производных флуорогена M739, содержащих заместители, увеличивающие систему сопряженных связей.

Скрининг новой библиотеки проводили *in vivo* с использованием конструкций H2B-TagBFP-*<мутант белка Blc>*. Возрастание флуоресценции было отмечено для двух флуорогенов: N379 и МКА-67. При этом в первом случае флуоресценция детектировалась лишь в красном канале, тогда как сигнал от добавления МКА-67 можно было видеть как в TexasRed, так и в дальне-красном Cy5 (рисунок 15А,Б), что больше соответствует нашим целям. В отличие от сигнала флуорогенов M739 и M774, флуоресцентный сигнал от МКА-67 нарастал со временем: становился хорошо видимым через 10-20 минут и достигал максимума примерно через час. Такая динамика может быть обусловлена как скоростью прохождения соединения через мембрану клеток, так и особенностью его взаимодействия с белком и требует дальнейшего изучения.

Значимое увеличение флуоресценции флуорогена МКА-67 продемонстрировали белки 16912, A27C, L132Q и 16912_F44A, при этом наибольшей контрастностью обладал 16912. Мы проверили новую пару 16912 + МКА-67 также на модели цитоскелета. Несмотря на не очень высокую контрастность, структура кератина хорошо видна, и данный комплекс может быть успешно использован для микроскопии (рисунок 15В).

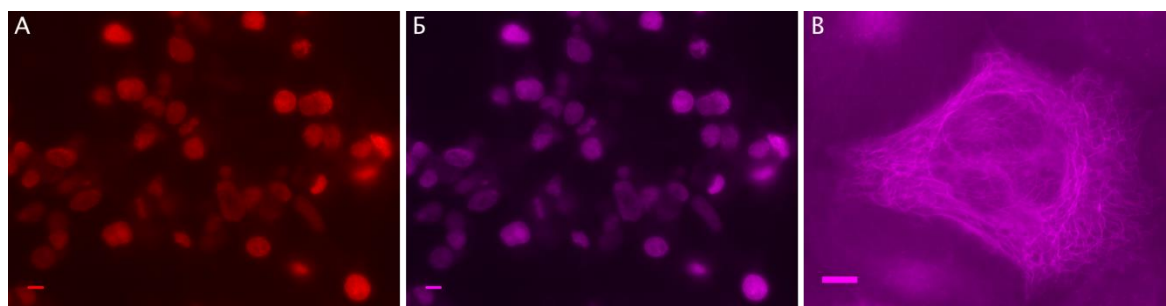


Рисунок 15. Флуоресцентная широкопольная микроскопия конструкций с флуорогеном МКА-67, масштабная линейка 10 мкм. **А.** Живые клетки линии HEK293T, временно трансфицированные плазмидой H2B-TagBFP-16912, набор фильтров TexasRed (562/40, 624/40); **Б.** Живые клетки линии HEK293T, временно трансфицированные плазмидой H2B-TagBFP-16912, набор фильтров Cy5 (628/40, 692/40); **В.** Живые клетки линии HeLa Kyoto, временно трансфицированные плазмидой Keratin-16912, набор фильтров Cy5 (628/40, 692/40).

Заключение

Границы между науками начинают стираться, объединение методологических приемов разных областей позволяет совершать ранее недоступные открытия. В данной работе сила междисциплинарных исследований показана на фундаментальном и прикладном уровнях.

В первой части работы, объединив классические биохимические подходы с анализом модельных химических соединений и компьютерным моделированием, нам удалось предложить структуру хромофора и объяснить различия спектральных свойств двух полученных родственных мономерных флуоресцентных белков FR66W-Yellow и FR66W-Orange, содержащих триптофан в составе хромофора и обладающих жёлтой (535 нм) и оранжевой (565 нм) эмиссией флуоресценции соответственно.

Наши данные могут послужить основой для рационального дизайна и получения улучшенных вариантов малоизученных, но потенциально перспективных триптофан-содержащих флуоресцентных белков с эмиссией в жёлто-оранжевой области спектра.

Во второй части работы, сочетая современные компьютерные подходы с традиционными экспериментальными методами, мы разработали новый протокол поиска потенциальных флуороген-активирующих белков — перспективной и активно разрабатываемой группы флуоресцентных меток, объединяющих в себе достоинства генетически кодируемых белков и химических красителей.

Работа протокола была подтверждена созданием с его помощью новой системы флуоресцентного мечения белков, пригодной как для традиционной широкопольной или конфокальной флуоресцентной микроскопии, так и для микроскопии сверхвысокого разрешения, в том числе локализационной микроскопии сверхвысокого разрешения.

Разработанный протокол *in silico* скрининга и наличие двух имеющих разную природу компонентов должны облегчить как дальнейший процесс оптимизации и изменения параметров описанной системы за счет комбинации независимых модификаций каждой из составных частей, так и создание новых пар на основе других белков и флуорогенов.

Выводы

1. На основе красного мономерного флуоресцентного белка FusionRed методами направленного и последующего случайного мутагенеза получены белки FR66W-Yellow и FR66W-Orange, содержащие триптофан в составе хромофора и обладающие соответственно жёлтой (535 нм) и оранжевой (565 нм) эмиссией.
2. На основе свойств полученных белков и модельного соединения, а также компьютерного моделирования предложены структуры хромофоров белков FR66W-Yellow и FR66W-Orange.
3. Разработаны протоколы *in silico* скрининга библиотек белков с известными структурами, а также библиотек близких мутантов белков с известными структурами для поиска потенциальных флуороген-активирующих белков.
4. При помощи разработанного протокола среди белков *E. coli* с известной структурой найдены и охарактеризованы *in vitro* белки ЗНО2 (β -кетоацил-АЦФ-синтаза II) и 1PVS (3-метиладенин-ДНК-гликозилаза II), способные связывать Kaede-подобный флуороген A12H с субмикромольной аффинностью и вызывать увеличение яркости его флуоресценции более чем на два порядка.
5. При помощи разработанного протокола на основе липокалина B1c из *E. coli* созданы и охарактеризованы три флуороген-активирующих белка (16912, 78776 и A27C), связывающие конформационно фиксированное производное хромофора GFP (M739). Показана возможность их применения для флуоресцентного мечения белков в клетках млекопитающих используя методы широкопольной и конфокальной микроскопии, а также микроскопии сверхвысокого разрешения.
6. Методами случайного мутагенеза и *in silico* мутагенеза при помощи программы Rosetta получена и протестирована *in vivo* панель улучшенных флуороген-активирующих белков, характеризующихся увеличенной аффинностью и/или квантовым выходом флуоресценции.
7. Произведен скрининг созданной на основе флуорогена M739 библиотеки соединений с увеличенной системой сопряженных связей, и обнаружены пары белок-флуороген, характеризующиеся спектрами возбуждения и эмиссии флуоресценции, сдвинутыми в красную область.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. Povarova N.V., **Bozhanova N.G.**, Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Baranov M.S., Yampolsky I.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Docking-guided identification of protein hosts for GFP chromophore-like ligands // J. Mater. Chem. C.– 2016.– Т. 4, № 14.– С. 3036–3040.
2. Н.В. Клементьева, **Н.Г. Божанова**, Е.В. Загайнова, К.А. Лукьянов, А.С. Мишин. Флуорофоры для локализационной микроскопии одиночных молекул. // Биоорганическая химия.– 2017, Т. 43, № 3, С. 227–235
3. **Bozhanova N.G.**, Baranov M.S., Sarkisyan K.S., Gritcenko R., Mineev K.S., Golodukhina S.V., Baleeva N.S., Lukyanov K.A., Mishin A.S. Yellow and Orange Fluorescent Proteins with Tryptophan-based Chromophores // ACS Chem. Biol.– 2017, doi: 10.1021/acscchembio.7b00337.

Тезисы

1. Создание белков, связывающих флуорогены, для флуоресцентного мечения живых систем, **Божанова Н.Г.**, Баранов М.С., Лукьянов К.А., Мишин А.С. Сборник тезисов Материалы XXVII зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 9-12 февраля 2015 года, Москва, стр. 10.
2. Случайный мутагенез *in vitro* и *in silico* на примере белков, связывающих флуорогены, **Божанова Н.Г.**, Лукьянов К.А., Мишин А.С. Сборник тезисов Материалы XXVIII Зимней молодежной научной школы «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», 8-11 февраля 2016, Москва, стр. 39.