

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

На правах рукописи

Мамонтова Анастасия Вячеславовна

Увеличение фотостабильности зеленых  
флуоресцентных белков в живой клетке путем  
блокирования фотоиндуцированного переноса  
электрона

специальность 03.01.03 (молекулярная биология)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Богданов Алексей Михайлович

Москва, 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>1.</b>	<b>ВВЕДЕНИЕ .....</b>	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>6</b>
<b>2.1.</b>	<b>ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ.....</b>	<b>6</b>
<b>2.2.</b>	<b>КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА GFP</b>	<b>11</b>
<b>2.3.</b>	<b>ФОТОСТАБИЛЬНОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ ФОТООБЕСЦВЕЧИВАНИЯ .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4.</b>	<b>СВЯЗЬ ФОТОСТАБИЛЬНОСТИ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ФОТОКОНВЕРСИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА GFP.....</b>	<b>17</b>
<b>2.5.</b>	<b>СПОСОБЫ УВЕЛИЧЕНИЯ ФОТОСТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА GFP .....</b>	<b>19</b>
<b>3.</b>	<b>ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ.....</b>	<b>25</b>
<b>4.</b>	<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....</b>	<b>26</b>
<b>4.1.</b>	<b>МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ .....</b>	<b>26</b>
<b>4.2.</b>	<b>ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ НОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ E. COLI ШТАММА XL1-BLUE .....</b>	<b>33</b>
<b>4.3.</b>	<b>СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ.....</b>	<b>34</b>
<b>4.4.</b>	<b>РАБОТА С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ.....</b>	<b>35</b>
<b>4.5.</b>	<b>МИКРОСКОПИЯ.....</b>	<b>37</b>
<b>4.6.</b>	<b>КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ.....</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ .....</b>	<b>43</b>
<b>5.1.</b>	<b>УВЕЛИЧЕНИЕ ФОТОСТАБИЛЬНОСТИ ЗЕЛЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ПУТЕМ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА КЛЕТОЧНЫХ СРЕД .....</b>	<b>43</b>
<b>5.2.</b>	<b>УВЕЛИЧЕНИЕ ФОТОСТАБИЛЬНОСТИ ЗЕЛЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ПУТЕМ УДАЛЕНИЯ ВНУТРЕННИХ АКЦЕПТОРОВ ЭЛЕКТРОНОВ .....</b>	<b>58</b>
<b>5.3.</b>	<b>ТРОЙНОЙ МУТАНТ EGFP КАК МЕТКА ДЛЯ FLIM- МИКРОСКОПИИ.....</b>	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>85</b>

<b>7.</b>	<b>ПРИЛОЖЕНИЯ .....</b>	<b>87</b>
<b>7.1.</b>	<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>87</b>
<b>7.2.</b>	<b>ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА</b>	<b>88</b>
<b>7.3.</b>	<b>ОТЛИЧИЯ В СОСТАВАХ СРЕД DMEM И HAM'S F12 (ПО «ПАНЭЖО») .....</b>	<b>90</b>
<b>7.4.</b>	<b>КРИВЫЕ ЗАТУХАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ.....</b>	<b>92</b>
<b>8.</b>	<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>93</b>

# 1. ВВЕДЕНИЕ

Современная биологическая наука нуждается в визуализации исследуемых объектов на уровнях клетки, органелл и отдельных молекул. На данный момент известен широкий спектр методов, позволяющих при помощи специальной аппаратуры и даже без нее, простым человеческим глазом, наблюдать локализацию, изменения и взаимодействия интересующих структур. Поскольку разработанные подходы сильно разнятся по физико-химическим принципам действия, то возможно подобрать оптимальный метод к каждому конкретному случаю. В качестве примеров используемых технологий визуализации можно привести такие отличающиеся друг от друга методики:

- Использование красителей. Метод основан на специфическом связывании красителей и определенных химических групп, входящих в состав объектов исследования. Красители бывают как для фиксированных препаратов, так и витальные, позволяющие работать с живыми тканями и клетками.

- Авторадиографический метод. Основан на изучении распределения меченых радиоактивными изотопами объектов при помощи пленки с нанесенной на нее фотоэмульсией [1].

- Рентгеноструктурный анализ. Изучаемые объекты подвергаются облучению, отраженные от них волны попадают на дифракционную пластинку, образуя на ней пятна различной интенсивности. Обратной задачей дифракции является восстановление трехмерной структуры объектов по этим пятнам [2].

- Использование ферментных меток. Основными ферментами, используемыми для меток, являются пероксидаза хрена и щелочная фосфатаза.

- Гибридизация РНК *in situ*. На срезы тканей или к целому организму гибридизуют зондовую РНК с меткой, зачастую в качестве метки используют уже упомянутые пероксидазу хрена и щелочную фосфатазу. Это позволяет изучать экспрессию тех или иных генов [3].

Заметное место в спектре методов визуализации занимают флуоресцентные методы, основанные на возбуждении флуорофоров, которыми помечены объекты исследования, с последующей регистрацией испускаемых ими квантов света. Одними из наиболее часто используемых среди них можно назвать:

- Иммуногистохимический и иммуноцитохимический методы. Основаны на взаимодействии меченых флуорофором антител с антигенами среза ткани или клетки. При этом возможно применение как прямых антител с меткой, так и системы из пары антител:

первые антитела не мечены, а вторые несут метку (например, Alexa). Это позволяет амплифицировать сигнал.

- ELISA и модификация метода, Sandwich. Используется система из пары антител, из которой первичные антитела без метки, а вторичные мечены флуорофором, например, европием. Используется для определения концентрации антигена *in vitro*.

В 1994 г. впервые была продемонстрирована возможность использования зеленого флуоресцентного белка (GFP) из медузы *Aequorea victoria* в качестве генетически кодируемой метки *in vivo* [4]. Результаты этой работы послужили толчком как для интенсивных исследований самих флуоресцентных белков, так и их применения в биологии. Возможность адресного мечения внутри живой клетки, низкая токсичность, относительная простота использования и направленного изменения свойств методами геной инженерии сделали флуоресцентные белки незаменимым молекулярным инструментом визуализации биологических процессов не только *in vitro*, но и *in vivo*.

Сегодня методы, основанные на применении флуоресцентных белков, используют, например, для исследования динамики биополимеров, изучения белок-белковых взаимодействий и активности генов, специфической окраски клеток и тканей, мониторинга сигнальных каскадов и низкомолекулярных соединений с помощью молекулярных сенсоров и многого другого. Изучение свойств флуоресцентных белков является, таким образом, важной основой для разработки и совершенствования методов их применения. Среди таких важных параметров ФБ, как цвет, яркость, pH-чувствительность, тенденция к олигомеризации и т.д. фотостабильность (способность молекулы многократно испускать фотоны под действием возбуждающего света) занимает значительное место. Эксперименты с длительной визуализацией часто лимитированы фотообесцвечиванием метки. Таким образом, увеличение фотостабильности – одна из ключевых задач при разработке новых и усовершенствованию уже существующих флуоресцентных белков.

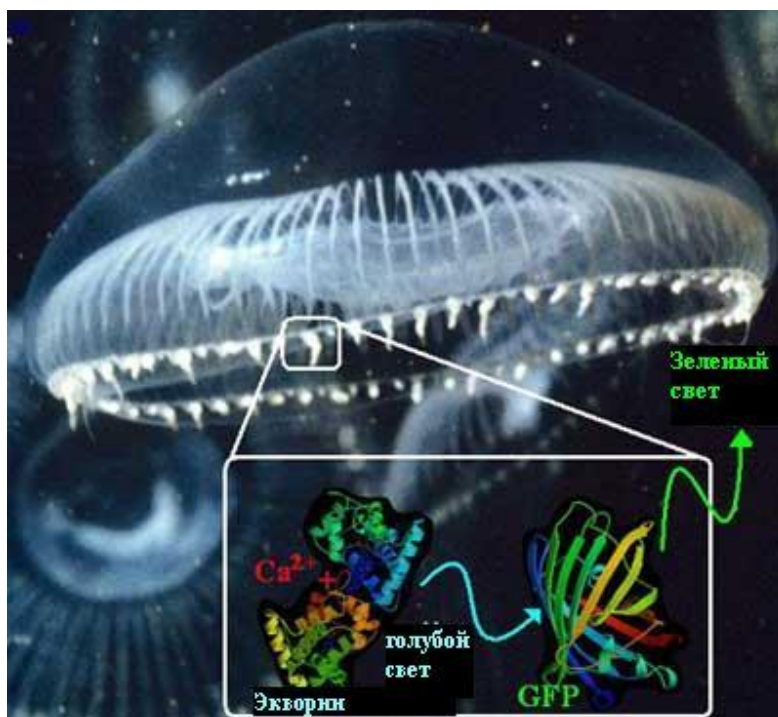
В нашей работе мы рассматриваем такое опосредующее фотообесцвечивание явление как окислительная фотоконверсия [5], в частности, механизмы переноса электрона с возбуждённого хромофора на акцептор, с ней связанные, и разрабатываем способы блокирования путей переноса электрона с целью повышения фотостабильности зеленых флуоресцентных белков.

## 2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 2.1. ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ

Осаму Симомура – человек, впервые изолировавший GFP и определивший, какая часть этого белка ответственна за флуоресценцию. Его скрупулёзные исследования заложили прочный фундамент, на котором была построена «GFP-революция». В 1960 году, почти сразу после приезда в Принстон из Японии, Симомура начал изучать биолюминесценцию медузы *Aequorea victoria*. Эта медуза биолюминесцирует при помощи специальных фотоорганов, расположенных по краю зонтика. При продавливании через марлю 20-30 краев зонтиков на выходе получали слабо светящуюся жидкость. Для того, чтобы собрать достаточное количество жидкости и выделить вещество, отвечающее за ее свечение, Симомура отправился в Вашингтон. Для проведения исследований, по подсчетам Симомуры, потребовалось собрать около миллиона медуз, срезать кольца и выделить из них люминесцирующую жидкость.

Он обнаружил, что для биолюминесценции медуза выделяет ионы кальция, которые связываются с белком, названным Симомурой экворин. При связывании кальция экворин испускает синие кванты, однако сами медузы обладают зелёным свечением. Выяснилось, что причиной этого несоответствия является второй белок, флуоресцирующий в зелёной области спектра и являющийся FRET-акцептором, получающим энергию синего кванта от экворина, и впоследствии названный GFP (Green Fluorescent Protein, зелёный флуоресцентный белок) (рис.1) [6].



**Рис. 1.** Медуза *Aequorea victoria* и схема взаимодействия экворина и GFP в фоточувствительных органах ее зонтика<sup>1</sup>.

Интерес Симомуры к *Aequorea victoria* всегда основывался на ее биолюминесценции. Он хотел понять химическую природу свечения и никогда не задумывался о применении GFP в качестве трейсерной молекулы [6].

Первым ученым, осознавшим возможность использования GFP в качестве маркера, был Дуглас Прашер. В 1987 году у него возникла эта идея, положившая начало GFP-революции. Он предположил, что флуоресценция GFP может служить сигналом появления белка в клетке. Белки невероятно малы, и их невозможно увидеть даже с помощью электронного микроскопа. Однако если каким-либо образом связать интересующий белок с GFP, то можно будет наблюдать флуоресцентный сигнал от GFP, соединенного с белком интереса. Дуглас Прашер предположил, что с помощью молекулярных методов можно «вставить» ген GFP в конец кодирующей последовательности целевого белка непосредственно перед стоп-кодоном. Таким образом, при экспрессии полученного химерного гена будет синтезироваться, собственно, сам белок интереса, соединенный с GFP (рис. 2) [7].

<sup>1</sup> <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/shimomura.html>

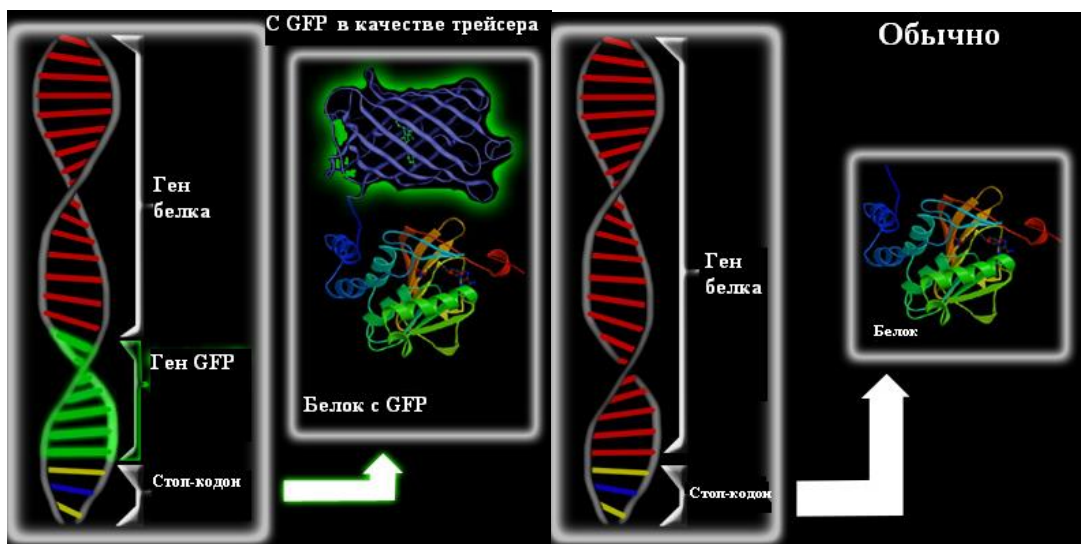


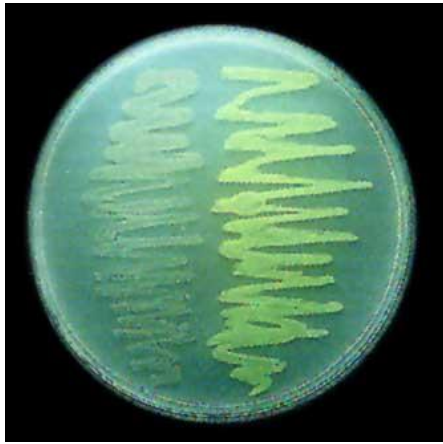
Рис. 2. Схема идеи Дугласа Прашера по вставке гена GFP в ген белка интереса<sup>2</sup>.

У Дугласа Прашера было две причины считать, что GFP является подходящей трейсерной молекулой. Во-первых, связанный с целевым белком GFP легко детектировать, облучая клетку ультрафиолетовым светом. Во-вторых, еще Симомурой было показано, что GFP – небольшой белок, что весьма важно, так как он ввиду малого размера должен вносить минимальный вклад в изменение нативных свойств целевого белка. Прашер клонировал ген GFP из *Aequorea victoria* [7].

В 1988 году, когда Дуглас Прашер уже начал работать над клонированием и секвенированием гена GFP, профессор Мартин Чалфи впервые услышал о GFP, побывав на семинаре, посвященном биолюминесценции. Он был весьма взволнован и сразу приступил к поиску точки приложения GFP к его исследованиям *C. elegans*. Он хотел использовать GFP в качестве маркера активности специфического промотора. Несколько дней спустя Чалфи узнал, что Прашер уже работает над секвенированием и клонированием GFP, и предложил сотрудничество. Прашер отправил клон, содержащий кодирующую последовательность avGFP, Чалфи, и тому удалось осуществить гетерологическую экспрессию в клетках *E. coli*, так что при облучении синим светом бактериальные колонии испускали зеленый свет (рис. 3). Чуть позже GFP был экспрессирован и в клетках *C. elegans*. Результаты опубликованы в феврале 1994 в журнале Science [7].

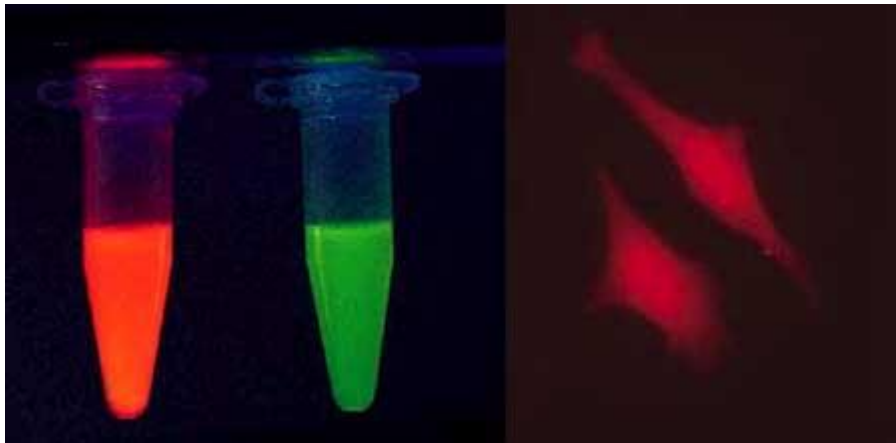
<sup>2</sup> <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/prasher.html>





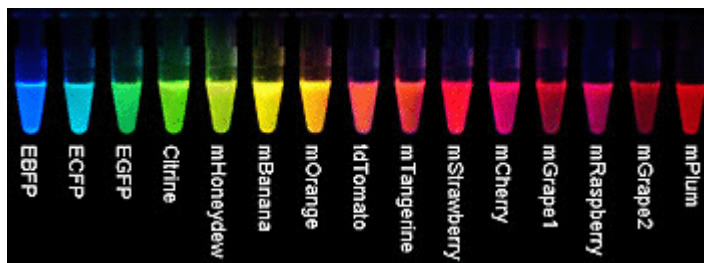
*Рис. 3. Экспрессия GFP в колониях E.coli. Бактерии справа трансформированы плазмидой с геном GFP. Фотография была сделана при облучении клеток ультрафиолетовым светом.*

Настоящий прорыв в применении GFP произошел, когда Сергей Анатольевич Лукьянов, проконсультировавшись с Юлием Александровичем Лабасом, обнаружил GFP-подобные белки в коралловых полипах. Никто до него не пытался искать флуоресцентные белки в кораллах, потому что те не обладают биолюминесценцией. Лукьянов, в частности, обнаружил первый природный красный флуоресцентный белок (названный DsRed) (рис. 4). Его идеи привели к открытию GFP-подобных белков в не излучающих свет морских организмах. Открытие целого ряда новых ФБ в кораллах и других организмах спровоцировало бурный рост интереса к этому семейству белков, а также дало мощный толчок к расширению спектрального разнообразия их мутантных форм, разрабатываемых для многоцветного мечения живых систем и решения других актуальных задач. Так, в 2007 году лаборатория Лукьянова представила яркий, быстро сворачивающийся белок, испускающий свет в дальнекрасной области спектра. Белок был назван Katushka в честь одного из исследователей, участвовавших в его разработке, и стал одним из лучших в то время маркёров для флуоресцентной визуализации на уровне целого организма. Мономерная форма этого белка получила название mKate [8].



*Рис. 4. DsRed и GFP.<sup>3</sup>*

В то время, как Симомура, Чалфи и Прашер работали над выделением GFP из медузы и возможностью применения GFP в качестве трейсерной молекулы, Роджер Тсиен и его коллеги определили структуру этого белка и механизмы функционирования его хромофора, а также создали целую серию «разноцветных» мутантов GFP. Его группа разработала набор мутантных белков, которые начинали флуоресцировать быстрее, чем GFP дикого типа, и были гораздо ярче (рис. 5) [7].



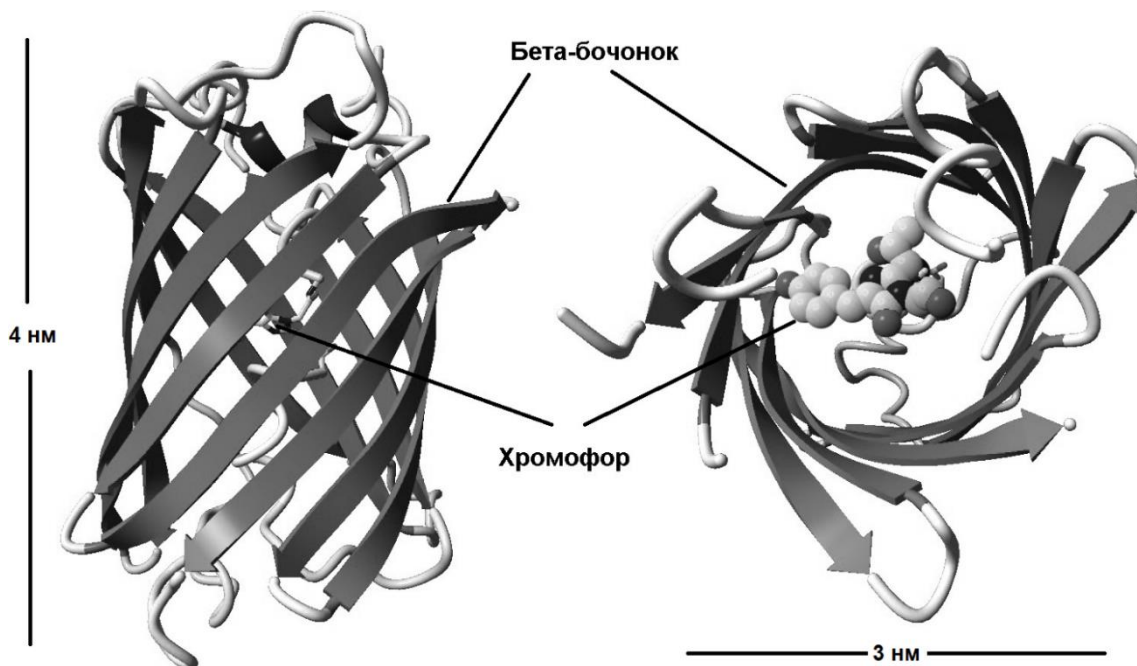
*Рис. 5. Серия мутантных флуоресцентных белков, полученных в лаборатории Р. Тсиена.<sup>4</sup>*

<sup>3</sup> <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/lukyanov.html>

<sup>4</sup> <http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/tsien.html>

## 2.2. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА GFP

GFP – белок с молекулярной массой около 25 кДа, состоящий из ~ 240 а.о. [9]. GFP из медузы *A. victoria* является самым известным представителем семейства флуоресцентных белков (или GFP-подобных белков), найденных на сегодняшний момент в тканях многих представителей морской фауны. Третичная структура белка представляет собой  $\beta$ -бочонок, сформированный из 11 антипараллельных  $\beta$ -тяжей, окружающих искаженную  $\alpha$ -спираль (рис. 6) [10].



**Рис. 6.** Третичная структура GFP из медузы *A. victoria*. Слева – вид сбоку, справа – вид сверху. GFP представляет собой  $\beta$ -бочонок, внутри которого расположен хромофор (показан в виде сфер).

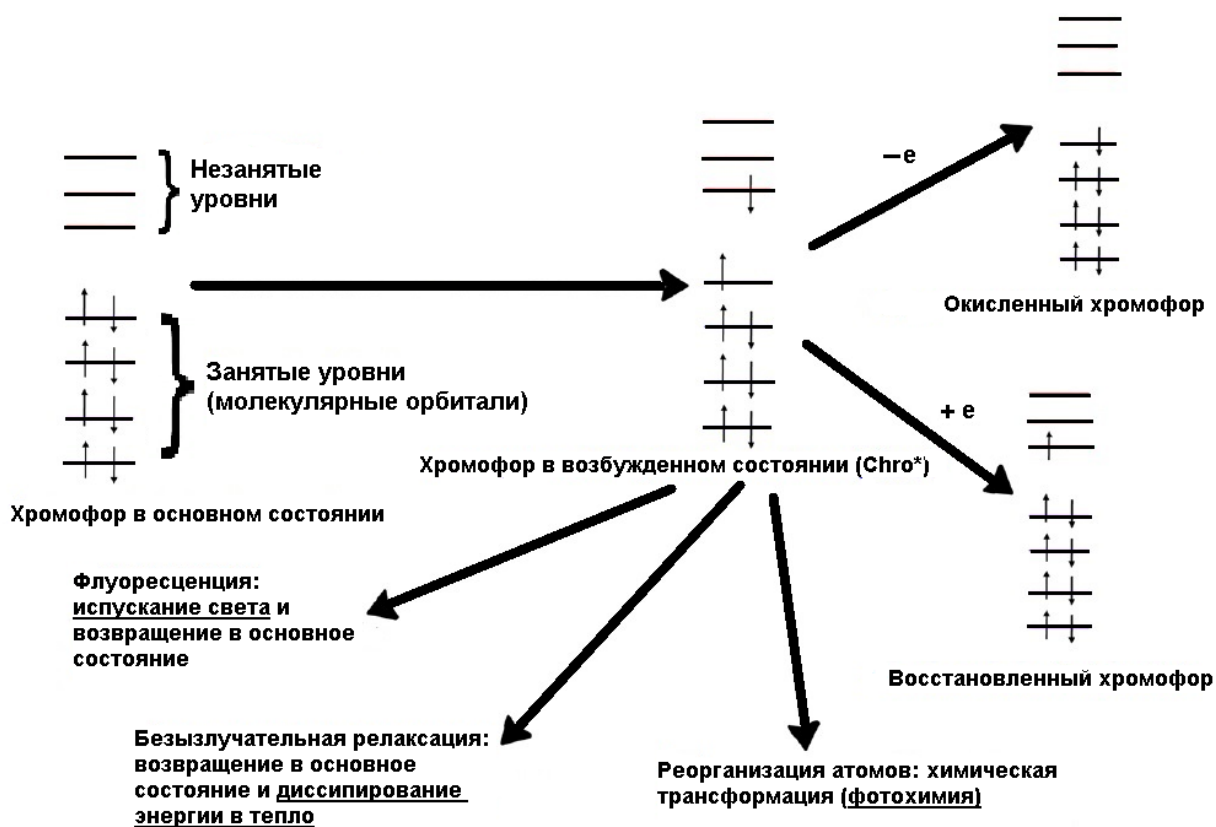
GFP способен флуоресцировать за счет наличия уникального хромофора, состоящего из модифицированных аминокислотных остатков Ser-Tyr-Gly  $\alpha$ -спирали в позициях 65 – 67. Таким образом, хромофор полностью погружен внутрь  $\beta$ -бочонка и защищен от прямого контакта с находящимися во внешней среде молекулами (см. рис. 7) [11].

Известно также, что хромофор GFP дикого типа находится в равновесии между протонированной и депротонированной формой гидроксильной группы Tyr66 [12]. Протонированная форма способна поглощать свет и флуоресцировать в более коротковолновой области, чем анионная форма, имеющая максимумы поглощения и эмиссии при 475 и 503 нм, соответственно. Однако в большинстве случаев после поглощения кванта протонированной формой (максимум спектра поглощения при 395 нм)

происходит немедленная потеря хромофором протона, что переводит его в заряженную форму, которая и испускает свет при 508 нм. В данном механизме, называемым переносом протона в возбужденном состоянии (Excited State Proton Transfer, ESPT), ключевую роль играет остаток Glu222, образующий водородную связь с атомом кислорода фенольного кольца Tyr66 через остаток Ser205 и молекулу воды [13].

Фотофизические и фотохимические свойства флуоресцентных белков в значительной степени сходны со свойствами некоторых синтетических красителей [14], [15]. Однако, белковая «оболочка» обуславливает существенное своеобразие характеристик заключённого в ней хромофора. Жесткое белковое окружение ограничивает подвижность хромофора и его доступность для растворителей и других веществ, присутствующих в растворе (кислород, ионы солей, окислители и восстановители, и т.д.). Действительно, фотофизические свойства модельных хромофоров в растворах разительно отличаются от соответствующих им структур в составе родительских флуоресцентных белков [16], [17]. Сольватированные GFP-подобные хромофоры не флуоресцируют и являются более эффективными фотосенсибилизаторами.

На рис. 2 показаны различные процессы во флуоресцентных белках, находящихся в возбужденном состоянии. Фотохимический цикл инициируется поглощением света, переводящим хромофор в первоначальное электронно-возбужденное состояние. Основным каналом для восстановления основного состояния хромофора является флуоресценция. Энергия излучаемого фотона меньше энергии поглощённого света (так называемый стоксов сдвиг) из-за структурной релаксации хромофора, реорганизации водородных связей или ESPT. Также хромофор может вернуться в основное состояние через безызлучательную релаксацию, в ходе которой энергия расходуется на ядерные колебания. Такая тепловая релаксация доминирует в GFP-подобных хромобелках, которые имеют чрезвычайно низкий квантовый выход флуоресценции ( $10^{-4} - 10^{-5}$ ) [18].



**Рис. 7.** Процессы во флуоресцентных белках, находящиеся в возбужденном состоянии. Основной канал релаксации - флуоресценция. Безызлучательная релаксация, процесс, в котором хромофор релаксирует в основное состояние, диссипируя электронную энергию в тепло, уменьшает квантовый выход флуоресценции. Другие конкурирующие процессы, такие как переход в триплетное состояние через интеркомбинационную конверсию (не показано) и перенос электрона изменяют химическую структуру хромофора, что приводит к временной или постоянной потере флуоресценции (миганию и обесцвечиванию) или изменению ее цвета (фотоконверсия). По [18] с изменениями.

В хромофоре электронное возбуждение может инициировать различные химические превращения, такие как изомеризация, образование или разрушение ковалентных связей, фотоокисление и фотовосстановление, или реакции с близко расположенными остатками или небольшими молекулами (например, кислородом). Изменения в хромофоре при возбуждении также влияют на его способность отдавать протон, которая является движущей силой ESPT. Эти процессы изменяют оптические свойства белка: приводят к обратимому формированию переходных темновых состояний или перманентному обесцвечиванию, а также сдвигам максимумов поглощения и флуоресценции. Таким образом, фотостабильность флуоресцентного белка определяется конкуренцией между основными каналами релаксации (флуоресценция и

безызлучательная релаксация) и различными фотоиндуцированными физико-химическими преобразованиями.

## 2.3. ФОТОСТАБИЛЬНОСТЬ И МЕХАНИЗМЫ ФОТООБЕСЦВЕЧИВАНИЯ

Одной из ключевых характеристик, определяющих практическую ценность конкретного варианта флуоресцентного белка, является фотостабильность, т.е. способность молекулы многократно испускать фотоны под действием возбуждающего света [19]. Низкая фотостабильность существенно затрудняет изучение объекта в динамике в течение долгого времени, реконструкцию трехмерных изображений, микроскопию визуализации времени жизни флуоресценции, наблюдение на уровне одиночных молекул. В целом, в основе фотообесцвечивания лежат фотохимические процессы, приводящие к обратимому нарушению или необратимому разрушению электронного сопряжения исходной  $\pi$ -электронной системы. Механизмы таких процессов сравнительно хорошо изучены для синтетических флуоресцентных красителей [14], [15], но плохо охарактеризованы в случае ФБ. Очевидно, что понимание молекулярных основ фотообесцвечивания важно для разработки способов улучшения фотостабильности. Что же известно о фотостабильности GFP-подобных белков на сегодняшний день?

Во многих ФБ наблюдается быстрое обратимое обесцвечивание, связанное с такими фотопроцессами, как *цис-транс*-изомеризация хромофора и изменение статуса его протонирования [20]–[22]. Относительная изолированность хромофора флуоресцентных белков от растворителя, с одной стороны обуславливает своеобразие его физико-химических свойств, с другой – в известной степени затрудняет структурный анализ происходящих внутри белка светоиндуцированных трансформаций.

В ряде публикаций описывается негативное влияние кислорода на фотостабильность [23]–[26]. Молекулярное моделирование объясняет ускоренное обесцвечивание ФБ семейства mFruits доступностью хромофора для молекулярного кислорода [23]. В случае белка KillerRed быстрое обесцвечивание в присутствии кислорода сопряжено с фототоксичностью – продукцией активных форм кислорода. Фотодеструкция боковых цепей аминокислотных остатков в положениях 65 и 66 в составе хромофора KillerRed после обесцвечивания была продемонстрирована структурными методами [27]–[29].

Было обнаружено влияние и других компонентов внешней для ФБ среды на их фотостабильность. Так, было показано, что циановый белок ECFP в клетках

млекопитающих существенно быстрее обесцвечивается после процедуры фиксации и подготовки микроскопических препаратов (по сравнению с обесцвечиванием при визуализации в живых клетках) [30]. Его близкий гомолог, жёлтый белок EYFP демонстрировал обратное поведение, а именно, увеличенную в 3,5 раза фотостабильность в фиксированных клетках [30]. Механизм этого феномена неясен.

Известен случай двухфакторного влияния на фотообесцвечивание EYFP со стороны кислорода и бета-меркаптоэтанола [31]. Подбирая оптимальные составы буферов для микроскопии сверхвысокого разрешения, исследователи обнаружили, что EYFP показывает 6-кратный прирост фотостабильности одиночных молекул при одновременном удалении кислорода и добавлении меркаптоэтанола. Примечательно, что по отдельности эти модификации среды не приводили к изменениям эффективности фотообесцвечивания. Причины увеличения фотостабильности не исследовались, но, учитывая природу факторов, увеличивших фотостабильность EYFP (добавление восстановителя и удаление окислителя), можно предположить, что эффект связан с окислительно-восстановительным процессом, например, фотовосстановлением хромофора.

Есть основания полагать, что фотовосстановление служит причиной обесцвечивания основной спектральной формы ряда красных флуоресцентных белков (Katushka, mKate, HcRed1), связанного с фотоконверсией этих белков в зелёную форму [32]. Фотоконверсии такого рода [33] наблюдались исключительно в живых клетках (т.е. в присутствии внутриклеточных доноров электронов), но не *in vitro*, а зелёный хромофор с химической точки зрения является продуктом восстановления красного.

Ещё один пример влияния кислорода на фотостабильность обнаружен в обратимо переключаемых флуоресцентных белках (Reversibly Switchable Fluorescent Proteins, RSFP), классе ФБ, которые могут многократно переключаться между нефлуоресцентными и флуоресцентными состояниями под действием света. Фотообесцвечивание здесь ограничивает достижимое число циклов переключения, параметр, известный как фотоусталость. При интенсивностях возбуждающего света, характерных для обычной широкопольной флуоресцентной микроскопии, у таких белков был выявлен кислородозависимый путь фотообесцвечивания [34]. Структурные модификации, индуцированные взаимодействием с синглетным кислородом в области хромофора, проявились в окислении двух серосодержащих остатков Met159 и Cys171, которые, находясь в окисленном состоянии, блокируют хромофор в нефлуоресцентном протонированном состоянии.

При интенсивности лазерного излучения, характерной для микроскопии сверхвысокого разрешения ( $> 0.1 \text{ кВт/см}^2$ ), был обнаружен, однако, совершенно иной, не зависящий от кислорода путь фотообесцвечивания [34]. Консервативный остаток Glu212 претерпевал декарбоксилирование, одновременно происходила обширная перестройка сети водородных связей вокруг хромофора, а также изменение гибридизации  $sp^2$  на  $sp^3$  у атома углерода, формирующего мостик между ароматическими кольцами хромофорной группировки (т.е. восстановление хромофора). Этот двухрежимный механизм фотообесцвечивания, вероятно, является общей чертой RSFP, происходящих из организмов класса Anthozoa и имеющих, как правило, высокую структурную идентичность с белком IrisFP [34].

В недавней работе, посвящённой сравнительному анализу фотоповедения нескольких десятков ФБ, было отмечено, что при повышении интенсивности возбуждающего света при облучении как металл-галогеновой лампой, так и лазером скорость фотообесцвечивания ряда популярных ФБ (mCitrine, mNeonGreen, mEGFP, EGFP, mTurquoise, mKate, mCherry, mApple, mKO2) растёт нелинейно [35]. Механизм данного явления неясен, но предполагается, что дополнительные фотоны, взаимодействующие с хромофором после его первичного возбуждения, могут ускорять фотообесцвечивание. Ранее подобное ускоренное фотообесцвечивание было описано при изучении двухфотонного возбуждения химических красителей. Сначала флуорофор претерпевает двухфотонное поглощение, а затем один или несколько фотонов взаимодействуют с возбужденной молекулой, что увеличивает вероятность фотообесцвечивания [36]. В случае однофотонного возбуждения ключом к пониманию ускоренного фотообесцвечивания могут быть долгоживущие спектральные формы, обнаруженные недавно в фотоцикле некоторых флуоресцентных белков [37], [38].

Фотообесцвечивание также может усиливаться при одновременном облучении двумя источниками света с разными длинами волн, даже если один из них сам по себе не возбуждает ФБ. В частности, фотоконвертируемые белки Dendra2 и mEos2 при облучении светом с длинами волн 488 нм и 730 нм демонстрировали увеличенную эффективность фотоконверсии и обесцвечивания исходной зелёной флуоресцентной формы [39]. В объяснение этому явлению был предложен механизм, названный примированной конверсией (primed conversion): коротковолновый квант (488 нм) переводит ФБ в некое переходное состояние, требующее относительно небольшой энергии для формирования новой флуоресцентной формы. В этом состоянии белок поглощает длинноволновый конвертирующий квант (730 нм), завершающий фотопревращение. Схожим образом, циановый флуоресцентный белок Cerulean обесцвечивается значительно быстрее при

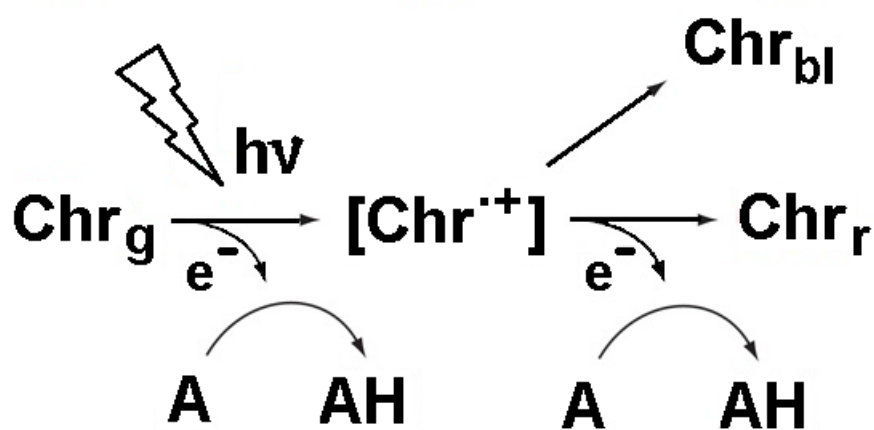


одновременном облучении лазерами 458 и 561 нм, по сравнению с облучением одним лазером 458 нм, хотя в основном состоянии Cerulean не поглощает свет с длиной волны >500 нм. Эти данные говорят о существенном вкладе различных переходных нефлуоресцирующих форм белка (в т.ч. радикальных) в эффективность обесцвечивания.

## **2.4. СВЯЗЬ ФОТОСТАБИЛЬНОСТИ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЙ ФОТОКОНВЕРСИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА GFP**

Было показано, что ряд зеленых флуоресцентных белков может служить в качестве светоиндуцируемых доноров электронов в присутствии электронных акцепторов. Эта фотохимическая реакция сопровождается конверсией из зеленой формы белка в красную (с максимумами возбуждения/эмиссии флуоресценции около 575/610 нм, соответственно). Указанное явление характерно для множества белков, происходящих из организмов разных таксономических групп, и получило название «реддинг» [5]. Важно отметить, что *in vitro* способствовать окислительной фотоконверсии может широкий спектр электронных акцепторов, включая биологически активные окислители, такие как  $\text{NAD}^+$ , FAD, и даже редокс-активные белки. Более того, оказалось, что реддинг происходит не только в специфических условиях *in vitro*, но и в живых клетках без добавления внешних агентов, а также *in vivo*, в тканях кораллового полипа *Zoanthus sp.* Таким образом, возбужденные молекулы зеленых ФБ способны взаимодействовать с некоторыми компонентами внутриклеточной среды и передавать им электроны.

На сегодняшний день нет точного понимания механизмов реддинга, однако ряд экспериментальных наблюдений позволяет предположить, что это двухстадийный процесс. На первой, быстрой, стадии происходит возбуждение хромофора и потеря им одного электрона. Далее возможны два варианта: возбужденный хромофор может потерять второй электрон и претерпеть фотоконверсию в красное состояние или же может произойти необратимый переход возбужденного хромофора в состояние, не обладающее флуоресценцией, т.е. фотообесцвечивание белка (рис. 8).



**Рис. 8.** Схема окислительной фотоконверсии EGFP. Возбужденный зеленый хромофор ( $Chr_g$ ) передает один электрон молекуле окислителя  $A$ . В результате образуется короткоживущий интермедиат ( $Chr^{*+}$ ). Если он вступает в реакцию с акцептором электрона, образуется финальная красная флуоресцентная форма ( $Chr_r$ ); в противном случае интермедиат переходит в перманентно обесцвеченное состояние ( $Chr_{bl}$ ). По [5] с изменениями.

Учитывая существенный вклад реддинга в обесцвечивание большинства зелёных флуоресцентных белков, направленное блокирование этого процесса, вероятно, может служить способом увеличения фотостабильности этих маркёров.

Реддинг зелёных ФБ – не единственный описанный вид окислительной фотоконверсии. Было показано, что фотопереключение оранжевого белка PSmOrange (исходный максимум эмиссии при 565 нм) в дальнекрасную форму (максимум эмиссии 662 нм) происходит существенно эффективней в присутствии окислителей различной природы [40]. Данная реакция представляет собой двухэлектронный двухфотонный процесс, в ходе которого происходит расщепление полипептидной цепи непосредственно перед остатком хромофоробразующего тирозина и замещение гидроксильной группы дигидрооксазольного кольца хромофора карбонильной группой (рис. 9).



**Рис. 9.** Предложенная схема фотопреобразования PSmOrange.  $[Ox]$  и  $[OxH]$  - молекулы окислителя и восстановленного окислителя, соответственно. По [5] с изменениями.

Вероятно, механизмы ряда оранжево-дальнекрасных фотоконверсий, описанных ранее [33], аналогичны приведённому выше. Очевидно, фотостабильность исходной оранжевой формы белков mOrange, PSmOrange и похожих белков связана с эффективностью окислительного фотопереключения.

## 2.5. СПОСОБЫ УВЕЛИЧЕНИЯ ФОТОСТАБИЛЬНОСТИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА GFP

Существуют различные подходы к ограничению светоиндуцированных процессов в молекулах ФБ с целью увеличения фотостабильности последних: изменение состава растворителя, способствующее снижению эффективности фотообесцвечивания, а также замена ключевых аминокислотных остатков, вовлечённых в фотоокисление и *цис-транс*-изомеризацию хромофора, и другие реакции, следствием которых является нарушение способности флуорофора испускать свет.

Для увеличения фотостабильности ФБ при флуоресцентной визуализации живых клеток был разработан модифицированный вариант среды DMEM, часто используемой при культивации клеток млекопитающих. Из состава DMEM были удалены все потенциально редокс-активные компоненты (витамины группы В), что привело к увеличению фотостабильности EGFP, экспрессируемого клетками HEK293T, до 10 раз [41]. Наиболее значимый вклад вызывало удаление рибофлавина и пиридоксаля, являющихся предшественниками коферментов, вероятно, стимулирующих окислительный реддинг EGFP. Однако из-за нехватки витаминов долговременное культивирование клеток млекопитающих в такой среде затруднительно.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что добавление растительного гликозида рутина (обладающего антиоксидантной активностью) к стандартной среде DMEM также вызывает увеличение фотостабильности EGFP *in cellulo*. Хотя точный химический механизм увеличения фотостабильности, стимулированного рутином, не известен, было показано, что его добавление подавляет окислительный реддинг [42].

По-видимому, усиление реддинга в ряде случаев может быть опосредовано внутриклеточными биохимическими процессами. В пользу этого предположения свидетельствуют, в частности, результаты экспериментов с живыми клетками, демонстрирующие существенный сдвиг окислительного статуса культуры и рост внутриклеточной продукции активных форм кислорода в ответ на сниженное содержание сыворотки в питательной среде и/или низкую плотность клеток [43]. Относительно низкая фотостабильность EGFP, экспрессируемого клетками, культивируемыми в описанных

выше условиях, таким образом, объясняется увеличенной концентрацией внутриклеточных окислителей.

Другим интересным наблюдением, указывающим, возможно, на связь фотостабильности флуоресцентных белков с внутриклеточными редокс-процессами, является медленное светонезависимое обесцвечивание EGFP после короткого локального облучения экспрессирующих этот белок клеток фемтосекундным лазером с длиной волны облучения около 900 нм [44]. Эффективность такого обесцвечивания различается при воздействии на разные клеточные компартменты, достигая максимума при облучении эндоплазматического ретикулума, служащего основным депо ионов кальция. С помощью специфических флуоресцентных сенсоров и ингибиторного анализа было показано, что выход  $Ca^{2+}$  при повреждении лазером мембран эндоплазматического ретикулума запускает каскад реакций, приводящий в конечном счете к образованию активных форм кислорода, окисляющих хромофор EGFP [44].

Помимо подходов к снижению фотообесцвечивания ФБ, связанных с изменением внешних для молекулы белка условий (модификацией состава сред для визуализации и других условий культивирования клеток), существенные результаты приносит и изменение самой структуры флуоресцентного белка. Отметим, что часть ключевых аминокислотных замен, влияющих на фотообесцвечивание, была обнаружена относительно случайно, например, в ходе скрининга библиотек мутантов по критерию фотостабильности или искусственной белковой эволюции, направленной на поиск фотостабильных вариантов белков. В то же время, есть и примеры рационального дизайна таких модификаций, основанного на изучении и понимании механизмов фотодеструкции хромофора.

Одним из результатов применения комбинации подходов является, например, многократно увеличенная относительно исходного белка EBFP фотостабильность его двойного мутанта V150I/V224R [45]. Для получения усовершенствованных вариантов синих ФБ авторы применили метод, сочетающий рациональный выбор точек мутагенеза и высокопроизводительный количественный скрининг библиотек полученных мутантов по заданным параметрам (в частности, по фотостабильности). Так, на основании анализа кристаллической структуры EBFP было выбрано 12 аминокислотных положений для внесения мутаций. Выбор данных позиций был продиктован следующими соображениями: (i) они находились в пределах  $7 \text{ \AA}$  от имидазольного кольца хромофора, (ii) они имели боковые цепи, направленные внутрь к хромофору и (iii) они, по-видимому, не участвовали в катализе образования хромофора. Последующие сортировка и скрининг полученных библиотек позволили отобрать вариант белка с повышенным квантовым

выходом (0.55 против 0.34), пониженной чувствительностью к рН и 40-кратным увеличением фотостабильности. Этот улучшенный EBFP, названный Azurite, хорошо экспрессируется в клетках бактерий и млекопитающих и расширяет спектральную палитру флуоресцентных белков [46].

Заслуживает упоминания мутант красного флуоресцентного белка TagRFP S158T (названный TagRFP-T), характеризующийся 9-кратным приростом фотостабильности относительно предшественника за счет внесения единственной замены [47]. В той же работе описан оранжевый белок mOrange2, полученный путём многоступенчатого отбора мутантов mOrange (всего внесено 4 замены: F99Y и Q64H влияли непосредственно на фотостабильность, а E160K и G196D – на фолдинг белка) и обесцвечивающийся в 25 раз медленнее исходного белка.

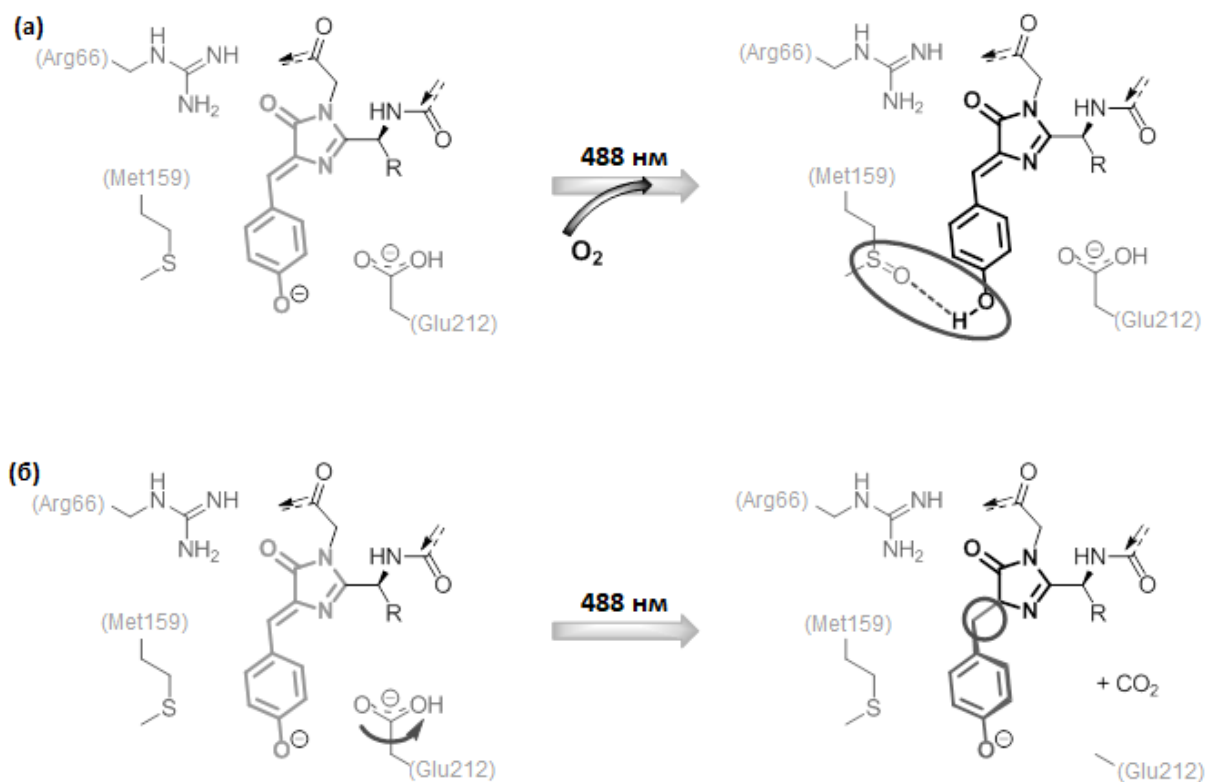
Было показано, что в случае молекулярного сенсора хлорид-анионов mClY, разработанного на базе белка EYFP, введение замены S205V приводит к существенному увеличению фотостабильности белка. Эта замена, кроме того, влияет на протонирование хромофора белка и является ключевой в процессе ESPT [48]. Вероятно, указанная замена приводит к реорганизации водородных связей аминокислотного окружения хромофора, так как остаток Ser205 посредством молекулы воды находится в контакте с хромофоробразующим остатком Tyr66 [49].

Общей чертой трёх перечисленных выше примеров случайного или полурационального обнаружения структурных изменений, влияющих на фотостабильность, является замена аминокислотного остатка из окружения хромофора на более крупный. Вероятно, эффект модификаций такого рода объясняется подавлением *цис-транс*-изомеризации и протонирования/депротонирования хромофорной группы, а также её дополнительной изоляцией от молекул кислорода.

Изыщным примером результата рационального подхода к увеличению фотостабильности можно назвать дальнекрасный белок mStable [50]. Авторы показали, что в белке mKate2 замена примыкающего к хромофору остатка серина на цистеин (S143C) приводит к 12-кратному увеличению времени полуобесцвечивания. Известно, что в исходном белке Ser143, контролирующей *цис-транс*-изомеризацию хромофора, допускает переход хромофорной группы в нефлуоресцентную *транс*-конформацию при облучении молекулы. Замена серина на цистеин радикально меняет кинетику обесцвечивания белка: в первые минуты облучения наблюдается некоторый рост интенсивности флуоресценции (фотоактивация), затем происходит медленное затухание сигнала. Предполагаемый механизм таков: при возбуждении хромофор генерирует синглетный кислород, который окисляет проксимальную тиоловую группу Cys143 до

сульфиновой и сульфоновой кислот. Полученные сульфопроизводные стабилизируют хромофор в флуоресцентной *цис*-конформации, что и повышает фотостабильность. Принцип стабилизации хромофора и увеличения фотостабильности за счет введения окисляемого остатка Cys был подтвержден для дальнекрасного белка mPlum с аналогичной заменой S146C.

В работе [51] описан рациональный дизайн фотостабильных ФБ, основанный на анализе механизмов фотообесцвечивания. Авторы предлагают модельный механизм фотоусталости, характерной для целого ряда фотоактивируемых белков из морских организмов класса Anthozoa. Среди этих ФБ такие популярные маркёры, как IrisFP, EosFP, Dendra и производные белка Dronpa. Данный механизм предполагает, что в процессе фотопереключений внутри белка протекает светоиндуцируемая кислород-зависимая реакция окисления атома серы боковой цепи Met159, приводящая в конечном итоге к необратимой сульфоксидации метионина и блокированию дальнейших переключений (рис. 10). Замена ключевого остатка метионина на аланин приводит к тому, что мутант IrisFP M159A демонстрирует существенно увеличенную фотостабильность [51].



**Рис. 10.** Предложенные механизмы обесцвечивания IrisFP. (а) Обесцвечивание при слабом освещении зависит от кислорода и приводит к сульфоксидации Met159 и блокированию хромофора в протонированной нефлуоресцентной форме. (б). Обесцвечивание в условиях сильного освещения приводит к декарбоксилированию Glu212, конформационному изменению кармана хромофора и перестройке хромофора в  $sp^3$ -гибризованное состояние (R обозначает гистидин). По [52] с изменениями.

Фотостабильность зачастую зависит от режима облучения маркера. Так, например, для GFP (и родаминового красителя Atto532) наблюдалось 5-25-кратное увеличение общего количества фотонов, испускаемых флуорофором до его обесцвечивания, когда сильное непрерывное или импульсное освещение с высокой частотой повторения заменяли импульсами с временными промежутками  $> 1$  мкс [53]. Причем усиление сигнала наблюдалось как для одно-, так и двухфотонного возбуждения. Такое существенное усиление сигнала происходит, вероятно, благодаря тому, что переходные молекулярные темновые состояния со временем жизни  $> 1$  мкс, такие как триплетное состояние, релаксируют между двумя событиями молекулярного поглощения [53], [54].

В рамках данной работы мы рассматриваем светоиндуцируемый перенос электрона в зеленых флуоресцентных белках как первичный процесс для окислительной фотоконверсии и сопряженного с ней фотообесцвечивания, а также применяем различные

подходы, в частности, основанные на моделировании молекулярных механизмов транспорта электрона, для блокирования этой фотохимической реакции. Мы предполагаем, что снижение эффективности переноса электрона в возбуждённом состоянии позволит увеличить фотостабильность GFP. Два основных пути, которые мы используем, – это удаление внешних акцепторов из среды визуализации и замены ключевых аминокислотных остатков, предположительно вовлечённых в перенос электрона.



### 3. ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ

**Целью** данной работы является увеличение фотостабильности зеленых флуоресцентных белков путем направленного блокирования светоиндуцируемого переноса электрона.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

1) Оптимизировать применение рутина как агента, повышающего фотостабильность EGFP, с точки зрения его химической стабильности и рабочей концентрации.

2) Сравнить эффективность применения рутина при флуоресцентной визуализации в популярных клеточных средах (DMEM, Ham's F12, RPMI1640) и проверить его влияние на фотостабильность таких популярных зеленых флуоресцентных белков, как copGreen, copGreen2, TagGFP2, Emerald, mEmerald.

3) Изучить причины высокой вариабельности результатов измерения фотостабильности в похожих экспериментальных условиях, в частности, вклад условий культивирования живых клеток.

4) Предложить модельные механизмы первичного процесса переноса электрона с возбуждённого хромофора EGFP, выявить потенциально важные аминокислотные остатки, связанные с этим процессом, и методом сайт-направленного мутагенеза провести экспериментальную проверку ключевых аминокислотных остатков на предмет их влияния на кинетику фотообесцвечивания EGFP.

5) Провести комплексный анализ внесённых мутаций и их комбинаций на ключевые характеристики полученных белков (фотостабильность, яркость и время жизни флуоресценции).

## 4. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 4.1. МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ

#### 4.1.1. Полимеразная цепная реакция

Для получения необходимого для клонирования количества ДНК использовали полимеразную цепную реакцию. Амплификацию проводили на приборах Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems), PTS-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research). Использовали следующие полимеразы и буферы: Encyclo-полимераза, Encyclo-буфер, Encyclo PCR kit (Evrogen). Температуру отжига праймеров выбирали с учетом расчетной температуры, определяемой следующей формулой:

$$T_a^{\circ}\text{C} = 2(A+T) + 4(G+C)$$

Состав реакционной смеси для амплификации последовательности целевого гена был следующим:

Буфер x10 – 4 мкл;

Полимераза x50 – 0,8 мкл;

Праймер Forward – 0,7 мкл (концентрация 5 мкМ);

Праймер Reverse – 0,7 мкл (концентрация 5 мкМ);

Матрица -1 мкл;

Смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов x50 – 0,8 мкл (конечная концентрация каждого нуклеотида в смеси – 0,2 мМ);

H<sub>2</sub>O MilliQ – до объема 40 мкл;

Программу для проведения амплификации устанавливали следующую:

1) Начальная денатурация – 95<sup>0</sup> С, 3 минуты (для полной денатурации плазмидной ДНК)

2) Денатурация – 95<sup>0</sup>С, 30 секунд

3) Отжиг праймеров – 48-63<sup>0</sup>С, 30 секунд

4) Элонгация – 72<sup>0</sup> С, время элонгации соответствовало длине матрицы с учетом числа оборотов полимеразы (около 1000 п.о./мин)

5) Финальная элонгация – 72<sup>0</sup>С, 7 минут, необходима для достраивания недосинтезированных продуктов

Стадии 2-4 повторяли 15-19 раз.

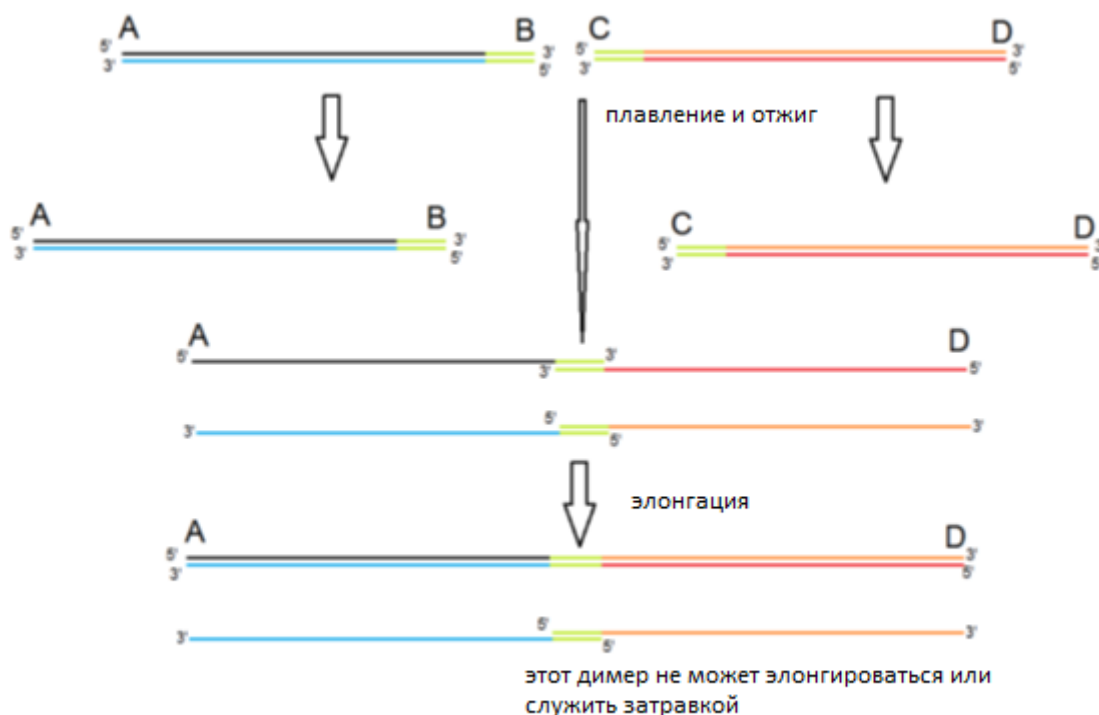
#### 4.1.2. Направленный мутагенез кодирующей последовательности белков

Мы проводили мутагенез с помощью «Overlap-extension PCR».

При проведении мутагенеза с помощью метода «overlap-extension PCR» мы амплифицировали в двух пробирках по отдельности две части гена: от 5'-конца до

предполагаемого места внесения мутации и от места внесения мутации до 3'-конца. Для амплификации использовали праймеры, содержащие желаемую мутацию (см. Приложение 7.2.). Кроме того, праймеры, использованные для амплификации разных частей гена, содержали комплементарные друг другу части.

Аmplифицированные части гена смешивали, гибридизовали при температуре отжига комплементарных частей и «достраивали» до полноразмерного гена с желаемой мутацией с помощью ПЦР без праймеров с течение нескольких циклов. Не визуализируя с помощью электрофореза, полноразмерный продукт дополнительно амплифицировали, добавляя концевые праймеры в реакцию, и клонировали в вектор pQE-30 по сайтам BamHI и HindIII.



**Рис. 11:** Схема проведения мутагенеза методом *overlap-extension PCR*.

#### 4.1.3. Рестрикция

Использовали буферы, BSA и эндонуклеазы рестрикции производства Thermo Fisher Scientific. Общий объем реакции составлял 25 мкл, состав реакционной смеси был следующим:

15 мкл очищенного на колонке продукта ПЦР или очищенной на колонке плазмиды (500-800 нг ДНК).

По 1,5 мкл необходимых рестриктаз (5-10 единиц активности)

0,25 мкл 100x BSA

2,5 мкл рестриктоного буфера

mQ H<sub>2</sub>O до объема 25 мкл

Пробирки инкубировали в термостате (Термит, ДНК–технология) 15 минут при 37<sup>0</sup>С. Для аналитической рестрикции объем реакционной смеси уменьшали до 10 мкл.

#### **4.1.4. Лигирование**

Использовали ДНК-лигазу фага T4, буфер для лигирования (Evrogen). В объеме 25 мкл смешивали:

2-6 мкл вектора (20-60 нг)

15-25 мкл вставки (75-150 нг)

1,5 мкл лигазы

2,5-3,5 мкл лигазного буфера 10x

mQ H<sub>2</sub>O до необходимого объема

Объемы вставки и вектора подбирали таким образом, чтобы их концентрации относились приблизительно 3:1. При необходимости соотношение вектор:вставка изменяли в сторону увеличения/уменьшения количества вставки. Лигазную смесь инкубировали в охладителе проб SC2D (biosom) при 14<sup>0</sup>С в течение ночи.

#### **4.1.5. Химическая трансформация клеток *E.coli* штамма XL1-Blue**

Аликвоту компетентных клеток *E.coli* штамма XL1-Blue (100 мкл) инкубировали в течение 10 минут во льду. Далее вносили плазмидную ДНК (экспериментальные конструкции в N1-векторе (Clontech) (для экспрессии в эукариотических клетках) и экспериментальные конструкции в векторе pQE30 (Qiagen) (для экспрессии в прокариотических клетках)) (от 5 нг до 1 мкг), следя за тем, чтобы соотношение объемов бактериальная суспензия:ДНК составляло не менее, чем 10:1, и перемешивали, слегка встряхивая. Инкубировали во льду 30 минут. Далее проводили «heatshock»: помещали пробирку с *E.coli* на водяную баню при 42<sup>0</sup>С на 45 секунд, после чего быстро переносили в лед на 5 минут. Далее при помощи шпателя размазывали бактериальную суспензию по чашке с LB-агаром, содержащую, в случае конструкций в N1-векторе, канамицин (30 мкг/мл), а в случае конструкций в векторе pQE30, ампициллин (100 мкг/мл). Антибиотики необходимы для селекции клеток, содержащих плазмидную ДНК, так как в плазмидную ДНК встроен ген устойчивости к тому или иному антибиотику. Чашку помещали в термостат (37<sup>0</sup>С) на ночь для роста колоний.

#### **4.1.6. Электрическая трансформация клеток *E.coli* штамма XL1-Blue**

Для повышения эффективности трансформации лигазной смесью и получения большего количества отдельных клонов использовали электрическую трансформацию.

Аликвоту (40 мкл) электрически компетентных клеток *E. coli* штамма XL1-Blue (Invitrogen) размораживали во льду в течение 10 минут, вносили 1 мкл лигазной смеси, инкубировали 5 минут во льду, переносили в кюветы для электропорации.

Осуществляли электропорацию в приборе MicroPulser (Bio-Rad, США), сразу после этого вносили 1 мл среды SOB, вымывая суспензию бактерий из кюветы, и переносили в стеклянную пробирку. Подращивали бактериальную культуру в термостатируемом шейкере (Excella E25 (New Brunswick Scientific)) в течение 1 часа. 100 мкл суспензии высевали на 90 мм чашки Петри с LB-агаром, содержащим ампициллин (100 мкг/мл) или канамицин (30 мкг/мл).

Чашку помещали в термостат (37°C) на ночь для роста колоний.

#### **4.1.7. Электрофорез ДНК в агарозном геле**

Проводили электрофорез в 1% агарозном (agarose LE, Helicon) геле для разделения и последующей очистки фрагментов ДНК. Гель готовили на буфере TAE с добавлением бромистого этидия до концентрации 0,5 мкг/мкл. Агарозу плавил в бытовой СВЧ-печи 1-1,5 минуты до получения прозрачной жидкости без видимых сгустков агарозы. Перед заливкой в заливочные столики с заранее установленными гребенками агарозу охлаждали до приблизительно 50°C. Заливку осуществляли быстрым переворачиванием посуды с расплавленной агарозой в заливочный столик. После застывания геля аккуратно вынимали гребенки, переносили гель в форежную камеру (Bio-Rad) и наносили исследуемые образцы, смешивая их с буфером для нанесения в соотношении 1:1. При скрининге колоний использовали ScreenMix (Evrogen), в котором уже присутствует краситель, поэтому при внесении продуктов ПЦР в гель буфер для нанесения не использовали. Электрофорез проводили в буфере TAE при напряжении 170-180 V для аналитического электрофоретического разделения, 140V - для препаративного электрофоретического разделения. В качестве маркера наносили 1 Kb DNA Ladder (СибЭнзим). Визуализировали результаты электрофореза с помощью анализатора изображений Alpha Imager2000 (Alpha Innotech Corporation), снимки получали с помощью системы фотодокументации Multimage Light Cabinet (Alpha Innotech Corporation); при выделении ДНК из геля использовали УФ-транслюминатор TF20M, снабженный длинноволновой УФ-лампой,  $\lambda=365$  нм.

#### **4.1.8. Очистка ДНК из геля**

Для очистки ДНК из геля использовали наборы для выделения ДНК Cleanup Standard (Evrogen). Скальпелем вырезали фрагмент геля с ДНК (не более 200 мг) и взвешивали его. Добавляли 3 объема Связывающего раствора к 1 объему геля (по протоколу производителя объем геля считали равным массе), инкубировали при 52°C до

полного растворения геля, периодически встряхивая. Затем добавляли изопропанол в объеме, равном массе геля, и перемешивали. Переносили образец в колонку и центрифугировали 30 секунд при 13400 об/мин (центрифуга Eppendorf miniSpin). Добавляли 700 мкл Промывочного раствора, центрифугировали 30 секунд при 13400 об/мин (центрифуга Eppendorf miniSpin). Дополнительно центрифугировали пустую колонку 1 минуту при 13400 об/мин (центрифуга Eppendorf miniSpin). Элюировали ДНК 30-50 мкл H<sub>2</sub>O mQ, центрифугировали 1 минуту при 13400 об/мин (центрифуга Eppendorf miniSpin), после чего элюат заново наносили на колонку, инкубировали 1 минуту при комнатной температуре и центрифугировали 1 минуту при 13400 об/мин (центрифуга Eppendorf miniSpin).

#### **4.1.9. Высев ночной культуры бактерий *E.coli* штамма XL1-Blue для получения плазмидной ДНК.**

Для оптимизации трансфекции осуществляли выделение плазмидной ДНК двумя методами с целью получения наиболее очищенного и концентрированного препарата ***Высев ночной культуры бактерий *E.coli* штамма XL1-Blue для получения плазмидной ДНК (miniPrep и midiPrep)***

При выделении плазмидной ДНК методом miniPrep в 4 пробирки разливали среду LB с канамицином (N1-вектор) или ампициллином (вектор pQE30) по 4 мл в каждую. Скалывали по одной колонии с чашки при помощи деревянной палочки и помещали палочку в пробирку. В случае midiPrep 25 мл среды LB с канамицином, или ампициллином, вносили в колбу (100 мл). Скалывали колонию с чашки (см. п.1) при помощи деревянной палочки и помещали палочку в колбу. Далее пробирки и колбу помещали в шейкер New Brunswick Scientific Incubator Shaker Series Exella E25 на 16 часов (37°C, 200 об/мин).

#### **4.1.10. Выделение плазмидной ДНК из ночной культуры бактерий *E.coli* штамма XL1-Blue**

***Выделение плазмидной ДНК из ночной культуры бактерий *E.coli* штамма XL1-Blue при помощи набора Cleanup Standard (Evrogen)***

Ночную культуру бактерий *E.coli* штамма XL1-Blue (см. п.2.1.) последовательно переносили в 2 полипропиленовые пробирки (2 мл) и центрифугировали 1 минуту при 13400 об/мин (центрифуга Eppendorf miniSpin). Осадки в двух пробирках тщательно ресуспендировали в растворе 1 - 1% PBS, РНКазы А 0,2 мг/мл - (250 мкл Раствора 1 в каждую пробирку). После ресуспендирования лизировали клетки, добавляя 250 мкл

Раствора 2 (0,2 М NaOH, 1% SDS) в каждую пробирку. Аккуратно перемешивали, переворачивая пробирки. Далее добавляли нейтрализующий раствор – Раствор 3 (3 М ацетат калия) – в объеме 350 мкл в каждую пробирку. Аккуратно перемешивали, переворачивая и слегка встряхивая пробирку, до образования отдельных белых хлопьев. Центрифугировали 15 минут при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf miniSpin. Супернатант переносили в новые пробирки (2 мл). К супернатанту добавляли равный объем изопропанола, перемешивали и помещали на -20°C на 60 минут. После инкубации при -20°C центрифугировали в течение 20 минут при 13200 об/мин (+4°C) на центрифуге Eppendorf 5415 R. Удаляли супернатант и дважды промывали осадки 70% этанолом. Удаляли этанол и сушили осадки в течение 20 минут при 37°C. Осадки растворяли в 50 мкл H<sub>2</sub>O MilliQ и переносили в одну пробирку. Добавляли РНКазу А в объеме 2 мкл (10 мг/мл) и инкубировали 30 минут при 37°C. Добавляли 5 объемов «Связывающего раствора» из набора Cleanup Standard (Evrogen) и наносили на колонки. Центрифугировали 30 секунд при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf miniSpin. Удаляли фильтрат из собирательной пробирки. Добавляли 700 мкл «Промывочного раствора» из набора Cleanup Standard. Центрифугировали 30 с при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf miniSpin. Удаляли фильтрат из собирательной пробирки и центрифугировали пустую колонку 60 секунд при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf miniSpin для удаления остатков «Промывочного раствора». Для элюции колонки переносили в новые пробирки (1,5 мл). В центр мембраны колонки наносили 45 мкл H<sub>2</sub>O MilliQ и центрифугировали 30 секунд при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf miniSpin. Повторно наносили элюат на колонку, инкубировали 1 минуту и центрифугировали 30 секунд при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf miniSpin. Элюаты переносили в общую пробирку.

***Выделение плазмидной ДНК из ночной культуры бактерий E.coli штамма XL1-Blue при помощи набора QIAGEN Plasmid MidiKit***

Ночную культуру бактерий E.coli штамма XL1-Blue центрифугировали 20 минут при 4500g на центрифуге Heraeus MULTIFUGE 3 S-R. Супернатант удаляли. Осадок ресуспендировали в 4 мл буфера P1. Добавляли 4 мл буфера P1, тщательно перемешивали переворачиванием 6-8 раз, инкубировали 5 минут при комнатной температуре (цвет раствора – ярко-синий). Добавляли 4 мл буфера P3, перемешивали переворачиванием 6-8 раз (цвет раствора – молочно-белый) до образования хлопьев. Инкубировали на льду 15 минут. Центрифугировали 30 минут при 20000g (4°C) на центрифуге Beckman J2-21 (ротор JA-20), после чего центрифугировали супернатант 15 минут при 20000g (4°C) на

центрифуге Beckman J2-21. Уравновешивали колонку QIAGEN Tip-100 4 мл буфера QBT. Наносили супернатант на колонку. Промывали 2x10 мл буфера QC. Элюировали ДНК 5 мл буфера QF. Вносили 3,5 мл изопропанола к элюированной ДНК, тщательно перемешивали и центрифугировали 30 минут при 15000g на центрифуге Eppendorf 5415 R (4°C). Аккуратно удаляли изопропанол и промывали осадок 2 мл 70% этанола, после чего центрифугировали 10 минут при 15000g на центрифуге Eppendorf 5415 R (4°C). Аккуратно удаляли этанол и высушивали осадок на воздухе. Растворяли осадок в 80 мкл H<sub>2</sub>O MilliQ.

#### **4.1.11. Очистка плазмидной ДНК при помощи QIAGEN Gel Extraction Kit**

К плазмидной ДНК, выделенной при помощи DNA Cleanup Standard (Evrogen), добавляли 3-кратный объем буфера QG. Тщательно перемешивали. Добавляли 1 объем изопропанола (объем, равный объему исходного раствора плазмидной ДНК). Тщательно перемешивали. Наносили на 2 колонки из набора QIAGEN Gel Extraction Kit. Центрифугировали 1 минуту при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf miniSpin. Фильтрат удаляли. Наносили 0,5 мл буфера QG на каждую колонку. Инкубировали 1 минуту, центрифугировали 1 минуту при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf miniSpin. Фильтрат удаляли, наносили по 0,75 мл буфера NE на колонки. Центрифугировали 1 минуту при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf miniSpin. Удаляли фильтрат, центрифугировали еще раз при тех же параметрах пустые колонки для удаления остатков буфера NE. Переносили колонки в новые собирательные пластиковые пробирки, наносили по 30 мкл H<sub>2</sub>O MilliQ для элюции. Инкубировали 5 минут, центрифугировали 2 минуты при 13400 об/мин на центрифуге Eppendorf miniSpin.

#### **4.1.12. Спектрофотометрическое измерение концентрации выделенной плазмидной ДНК**

Измерения проводили на приборе Cary 100 BioUV-Vis в кварцевых кюветах ( $l = 1$  см). Измеряли величину оптического поглощения при 260, 280 и 320 нм. Оптическое поглощение при 260 нм соответствует поглощению азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот, при 280 – поглощению аминокислот (триптофан, тирозин, фенилаланин), при 320 нм – как правило, хромофорным группировкам, однако, при их отсутствии основной вклад в поглощение при 320 нм вносит светорассеяние. Соотношение  $A_{260}/A_{280}$  определяет чистоту выделенного препарата ДНК (1,6-1,7 является оптимальным и свидетельствует о высокой чистоте препарата ДНК). Вычитая поглощение при 320 нм из поглощения при 260, получали оптическую плотность препарата



выделенных плазмид с поправкой на фон. Согласно закону Бугера-Ламберта-Бера оптическое поглощение равно:

$A = \epsilon Cl$ , где  $\epsilon$  – коэффициент молярной экстинкции (для двуцепочечной ДНК равен 0,02 мкг/мл·см),  $C$  – концентрация вещества в М,  $l$  – длина оптического пути кюветы (обычно 1 см).

Таким образом, зная величину оптического поглощения, равного  $A_{260} - A_{320}$ , коэффициент молярной экстинкции и длину оптического пути, определяли концентрацию выделенных плазмид.

Выделенный препарат ДНК перед измерением разводили в 250 раз.

#### **4.1.13. Определение нуклеотидной последовательности ДНК**

Нуклеотидные последовательности ДНК определяли с помощью автоматического секвенатора CEQ 2000 DNA Analysis. Для секвенирования использовали праймеры, соответствующие участкам, фланкирующим полилинкер вектора pQE-30 (pQE-60up и pQE-70low) и N1-вектора (C1-forward и C1-reverse). Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программного обеспечения VectorNTI 8.0.

## **4.2. ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ ИЗ НОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ БАКТЕРИЙ E. COLI ШТАММА XL1-BLUE**

### **4.2.1. Высев ночной культуры бактерий E. coli штамма XL1-Blue для последующего выделения белков**

В колбу объемом 2 л вносили 600 мл среды LB и 60 мг ампициллина. Деревянной палочкой скалывали колонию с чашки и помещали ее в колбу. Далее колбу к переносили в шейкер New Brunswick Scientific Incubator Shaker Series Exella E25 на 16 часов (37°C, 200 об/мин).

### **4.2.2. Выделение белков из ночной культуры бактерий E. Coli штамма XL1-Blue**

Все операции при выделении белка проводили при +4°C. Ночную культуру бактерий переносили в центрифужные стаканы объемом 0,5 л и центрифугировали 20 минут при 4500g на центрифуге Heraeus MULTIFUGE 3 S-R. Супернатант сливали, осадок ресуспендировали в 2 мл 100 мМ Трис-НСl (рН7,56) и подвергали ультразвуковой обработке при помощи соникатора SONICS VUBRA CELL в течение 5 минут (15 секунд – on cycle, 30 секунд – off cycle, амплитуда – 30%). Центрифугировали суспензию после ультразвуковой обработки 20 минут при 4500 g на центрифуге Heraeus MULTIFUGE 3 S-R. Сравнивали интенсивность флуоресценции осадка и супернатанта под бинокуляром.

Если интенсивность флуоресценции осадка была сравнима с интенсивностью флуоресценции супернатанта, то повторяли ультразвуковую обработку и последующее центрифугирование до тех пор, пока интенсивность флуоресценции осадка не снижалась до уровня, мало заметного глазу. Супернатант в этом случае переносили в чистую пробирку и в нем ресуспендировали 2 мл носителя Talon, предварительно отделенного от спирта и дважды промытого 100 мМ Трис-НСl (рН 7,56). Пробирку с раствором белков и носителем помещали на ротатор на 10 минут, после чего центрифугировали 2 минуты при 1500g на центрифуге Heraeus MULTIFUGE 3 S-R. Сравнивали интенсивность флуоресценции осадка и супернатанта под бинокляром: интенсивность флуоресценции осадка должна быть значительно выше, чем супернатанта. В случае, если это не так, добавляли еще 1 мл носителя и помещали на ротатор еще на 10 минут. Удаляли супернатант и добавляли равный объем 100 мМ Трис-НСl (рН 7,56), перемешивали и центрифугировали 2 минуты при 1500g на центрифуге Heraeus MULTIFUGE 3 S-R. Операцию повторяли дважды. Выделенный белок на носителе Talon хранили при +4°C в 100 мМ Трис-НСl (рН 7,56).

### **4.3. СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕРЕНИЯ**

#### **4.3.1. Измерения спектров поглощения**

Спектры поглощения выделенных белков измеряли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo scientific) и Cary 100 BioUV-Vis. В случае NanoDrop элюат белка в количестве 1 мкл наносили на столик спектрофотометра. Для измерения спектров поглощения на приборе Cary 100 BioUV-Vis элюат белка разводили в 500 мкл буфера 100 мМ Трис-НСl (рН7,56), содержащем 100 мМ имидазола. Для получения базовой линии измеряли спектр поглощения 100 мМ Трис-НСl (рН7,56), содержащем 100 мМ имидазола.

#### **4.3.2. Измерения молярного коэффициента экстинкции**

Для измерений спектров поглощения использовали спектрофотометр Cary 100 BioUV/VIS. Измерения всех нативных белков проводили в фосфатно-солевом буфере (PBS, рН 7,4, GIBCO). Для определения молярного коэффициента экстинкции мы измеряли оптическое поглощение зрелого хромофора. EGFP и его мутантов, которые затем были денатурированы щелочью в 1 М NaOH. В этих условиях, как известно, GFP-подобный хромофор поглощает при 447 нм с коэффициентом экстинкции 44000 М<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>. На основе поглощения нативных и щелочно-денатурированных белков были рассчитаны молярные коэффициенты экстинкции для нативных состояний.

#### **4.3.3. Определение квантового выхода флуоресценции**

Для измерений квантового выхода флуоресценции использовали флуоресцентный спектрофотометр Cary Eclipse (Varian). Для определения квантового выхода флуоресценции площади под кривыми спектров эмиссии флуоресценции мутантов сравнивали с таковой для EGFP (абсолютный квантовый выход 0,60) с равным поглощением.

Яркость флуоресценции оценивали как результат произведения молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции.

## **4.4. РАБОТА С КЛЕТОЧНЫМИ КУЛЬТУРАМИ**

Все операции по работе с клетками выполняли в стерильных условиях.

### **4.4.1. Приготовление сред**

К 450 мл среды DMEM (без глутамина, «ПанЭко») добавляли 5 мл смеси антибиотиков (пенициллин и стрептомицин: пенициллин – 5000 Ед/мл, стрептомицин – 5000 мкг/мл («ПанЭко»)) и 292 мг глутамина («ПанЭко»). Тщательно перемешивали. Далее переносили 270 мл среды DMEM в стерильную банку и вносили 30 мл бычьей сыворотки, перемешивали. Оставшуюся среду DMEM без сыворотки также переносили в стерильную банку. Обе банки закрывали простерилизованными пробками. Среды хранили при +4°C.

### **4.4.2. Фильтрация сред**

К наконечнику шприца присоединяли фильтр. Фильтр свободным концом помещали над горлом стерильной банки. В шприц сверху через горло наливали 60 мл среды. Аккуратно вставляли поршень шприца и медленно продавливали среду через фильтр. При засорении фильтра его аккуратно снимали и присоединяли новый. После завершения фильтрации банку с фильтрованной средой закрывали стерильной пробкой.

### **4.4.3. Размораживание и начало культивирования клеток**

Аликвоту клеток НЕК293Т, хранившуюся в сосуде Дьюара с жидким азотом, быстро размораживали на водяной бане при 37°C. После размораживания суспензию клеток переносили во флакон (25 см<sup>2</sup>), в который предварительно вносили 6 мл прогретой до 37°C среды DMEM + 10% FBS. Путем покачивания флакона добивались равномерного распределения суспензии клеток. Далее флакон помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>), слегка отвинтив крышку. Через 24 часа среду во флаконе меняли на свежую.

### **4.4.4. Пассирование клеток**

При достижении во флаконе степени конfluence примерно 70% клетки пассировали, чтобы избежать вырождения культуры. Из флакона при помощи серологической пипетки удаляли среду. Далее промывали клетки 5 мл среды DMEM без сыворотки для удаления остатков сыворотки, так как активность трипсина сильно снижается за счет конкуренции белков сыворотки с белками клеточных контактов за активный центр фермента. После промывания среду удаляли из флакона при помощи серологической пипетки. Вносили 1 мл 0,25%-раствора трипсина и аккуратно распределяли по стенке флакона, к которой прикреплены клетки. Инкубировали при 37°C в течение около 3 минут до полного открепления клеток. Инактивировали трипсин 5 мл среды DMEM + 10% FBS. Тщательно ресуспендировали. После этого суспензию клеток либо переносили в новый флакон или на чашку Fluoro Dish. Во флакон к оставшейся суспензии клеток добавляли среду DMEM + 10% FBS до конечного объема 6 мл. Флакон помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор, слегка отвинтив крышку.

#### **4.4.5. Перенесение клеток на чашки Fluoro Dish**

Клеточную суспензию переносили в центр чашки Fluoro Dish (FD 35-100, World Precision Instruments, Inc.) в объеме 100 мкл. Далее вносили 1,5 мл среды DMEM + 10% FBS. Аккуратно распределяли по дну чашки, слегка покачивая ее. Чашку помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

#### **4.4.6. Трансфекция клеток НЕК293Т**

Трансфецировали клетки НЕК293Т, культивируемые в специальных тонкодонных стеклянных чашках для флуоресцентной микроскопии Fluoro Dish. Готовили трансфекционную смесь так, чтобы конечный объем смеси составлял 100 мкл, при этом количество плазмиды должно составлять 1 мкг, а соотношение плазида (мкг):трансфекционный агент (мкл) должно быть 1:3. В пластиковую пробирку (1,5 мл) вносили 96 мкл среды DMEM без сыворотки. Далее вносили 3 мкл FuGENE (Promega) по каплям. Инкубировали 5 минут. Далее вносили 1 мкл плазмиды (1 мкг/мкл), тщательно, но аккуратно, перемешивали пипетированием. Инкубировали 30 минут при комнатной температуре. По окончании инкубации по каплям вносили 100 мкл трансфекционной смеси в чашку. Далее распределяли смесь по чашке легким её покачиванием. Чашку помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор. Микроскопирование осуществляли на вторые сутки после трансфекции.

#### **4.4.7. Оптимизация трансфекции клеток НЕК293Т**

В ходе выделения и очистки плазмидной ДНК были получены следующие количества плазмидных ДНК:

При помощи DNA Cleanup Standard (Evrogen) получали плазмидную ДНК с концентрацией 0,6 мкг/мкл общим объемом 80 мкл, то есть 48 мкг плазмидной ДНК, после очистки с помощью набора QIAGEN Gel Extraction Kit концентрация и объем не изменились.

При выделении с помощью QIAGEN Plasmid Midi Kit получали плазмидную ДНК с концентрацией 3,5 мкг/мкл объемом 100 мкл, то есть 350 мкг плазмидной ДНК.

Проверка качества трансфекции конструкциями, выделенными обоими методами, позволила сделать вывод, что препарат плазмидной ДНК, выделенный при помощи QIAGEN Plasmid Midi Kit, позволяет добиться 60-70% трансфицированных клеток в отличие от 30-40% трансфицированных клеток в случае использования DNA Cleanup Standard (Evrogen).

В дальнейшем трансфекцию осуществляли плазмидной ДНК, выделенной при помощи QIAGEN Plasmid Midi Kit.

#### **4.4.8. Заморозка клеток НЕК293Т**

Для пополнения банка клеток суспензию клеток НЕК293Т переносили в пробирки для криоконсервации в объеме 1,5-2 мл. Далее вносили в каждую из пробирок DMSO (100%) до конечной концентрации 10%. Быстро закрывали пробирки, помещали в пенопластовую муфту и переносили на -70°C (New Brunswick Scientific Ultra Low Temperature Freezer U 410). Через двое суток пробирки с суспензией клеток НЕК293Т отправляли на хранение в сосуд Дьюара с жидким азотом в специальной коробке.

## **4.5. МИКРОСКОПИЯ**

### **4.5.1. Широкопольная флуоресцентная микроскопия**

Для микроскопии использовалась система Leica AF6000LX, основанная на инвертированном микроскопе DMI 6000 B, оборудованном иммерсионным масляным объективом HCX PL APO lbd. BL 63x 1,4NA, цифровым ПЗС-регистратором Photometrics CoolSNAP HQ и ртутной лампой 120W HXP (Osram) в качестве источника света. Сигнал зелёной флуоресценции и красной флуоресценции детектировались с помощью стандартного набора светофильтров GFP (возбуждение BP470/40, эмиссия BP525/50).

Измерение фотообесцвечивания включало в себя следующие стадии, повторяющиеся циклически: регистрацию зеленой флуоресценции (относительно слабое облучение) и, собственно, обесцвечивание (интенсивное облучение). Количество циклов подбирали таким образом, чтобы интенсивность флуоресценции в конечном итоге снижалась чуть больше, чем на 50%.

### ***Широкопольная флуоресцентная микроскопия клеток HEK293T***

Параметры регистрации зеленой флуоресценции:

Интенсивность облучения – 1, продолжительность регистрации зеленой флуоресценции - от 1 до 100 мс в зависимости от яркости свечения клеток.

Параметры фотоактивации:

Интенсивность облучения – 5, продолжительность облучения – 5 с.

Биннинг составлял 2x2 (увеличивается в 4 раза относительная яркость регистрируемого сигнала за счет суммирования сигналов смежных 4-х пикселей при соответствующем снижении в 4 раза общего разрешения изображения).

Gain (коэффициент усиления фотоумножителя) составлял 2.

Каждое из измерений проводили минимум в трех повторностях так, чтобы в поле зрения находилось не менее 3-4 клеток. Длительность каждой серии определялась временем падения интенсивности флуоресценции на 50%. Соответственно количеству клеток в поле зрения выбирали ROIs (regions of interest), а также участок фона. Наблюдали экспоненциальное падение интенсивности флуоресценции, после чего числовые значения падения интенсивности экспортировали в Microsoft Excel. Проводили вычитание фона, нормирование на максимум и усреднение полученных данных в рамках одного эксперимента.

При этом перед началом измерения осуществляли проверку яркости флуоресценции клеток с тем, чтобы не допустить выхода детектируемого сигнала за границы динамического диапазона камеры.

За 30 минут до начала измерений в чашках с культивируемыми клетками заменяли среду (в зависимости от эксперимента: DMEM, Ham's F12, или безвитаминовая среда DMEM (DMEM<sup>gfp</sup>)) на свежую.

### ***Широкопольная флуоресцентная микроскопия химерных белков in vitro***

Для микроскопии *in vitro* изготавливали «колодцы»: от пластиковой пробирки 0,5 мл отрезали нижнюю конусообразную часть и крышку. Смазывали бортики пробирки вакуумной смазкой и прикрепляли к покровному стеклу. Вносили 1-2 мкл суспензии частиц смолы Talon с иммобилизованными белками и 100 мкл буфера. Частицы смолы

распределялись по дну «колодца» достаточно редко, что создавало оптимальные условия для детекции флуоресценции.

Параметры регистрации зеленой флуоресценции:

Интенсивность облучения – 1, продолжительность регистрации зеленой флуоресценции от

Параметры фотоактивации:

Интенсивность облучения – 5, продолжительность облучения – 1 с.

Съемки осуществляли без биннинга, gain составлял 1.

Каждое из измерений проводили минимум в трех повторностях так, чтобы в поле зрения находилось не менее 2 частиц носителя. Длительность каждой серии определялась временем падения интенсивности флуоресценции на 50%. Соответственно количеству шаров в поле зрения выбирали ROIs (regions of interest), а также участок фона. Наблюдали экспоненциальное падение интенсивности флуоресценции, после чего числовые значения падения интенсивности экспортировали в Microsoft Excel. Проводили вычитание фона, нормирование на максимум и усреднение полученных данных в рамках одного эксперимента.

При этом перед началом измерения осуществляли проверку яркости флуоресценции шаров с тем, чтобы не допустить выхода детектируемого сигнала за границы динамического диапазона камеры.

#### **4.5.2. FLIM-микроскопия**

Эксперименты проводили совместно с лабораториями проф. Надточенко и Савицкого.

##### ***FLIM-микроскопия очищенных белков при двухфотонном возбуждении.***

Фемтосекундные лазерные импульсы (частота 80 МГц, 100 фс, до 25 нДж на импульс) генерировались осциллятором Ti: Sapphire (Tsunami, Spectra-Physics), накачиваемым зеленым NW:YVO4 CW-лазером (532 нм, Millennia Prime 6sJ, Spectra-Physics). Фемтосекундный лазерный луч вводился в инвертированный оптический микроскоп Olympus IX71 через диэлектрический фильтр Thorlabs FESH0750, установленный под углом 45°, и фокусировался объективом (40x0.75NA UPlanFLN, Olympus) на образце, который был помещен на 3-осевой столик. Образцы были приготовлены в виде капель очищенных флуоресцентных белков, растворенных в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7,4, GIBCO), нанесенных на стандартное покровное стекло 24x24 мм (Heinz Herenz, Germany).

Средняя мощность лазера, достигающая образца, была точно настроена с помощью поляризационного аттенюатора, состоящего из полуволновой пластины и

поляризационного куба, установленного перед диэлектрическим фильтром. Двухфотонное возбуждение обычно выполняли при длине волны 900 нм и средней мощности лазера 10-20 мВт. Призматический компрессор SF10 использовался для компенсации дисперсии групповой скорости в объективе и других оптических элементах.

Флуоресценция образца, возбуждаемого двухфотонным поглощением фемтосекундного лазера, проходила через объектив и фильтр лазерной связи, а затем направлялась на вход монохроматора Acton SP300i с двумя отдельными выходами. Для регистрации флуоресцентных спектров использовалась ПЗС-камера PI-MAX 2 (Princeton Instruments) на первом выходе. Фотоумножитель временной коррелированной системы подсчета фотонов SPC-730 (Becker & Hickl GmbH) на втором выходе детектировал кинетику падения флуоресценции в области 510-530 нм. Данные о падении флуоресценции были получены с использованием программного обеспечения SPCImage (Becker & Hickl, Germany), а затем экспортированы в формате ASCII и проанализированы с использованием программного обеспечения Origin Pro 9 (OriginLab, США).

#### ***FLIM-микроскопия живых клеток HeLa Kyoto при однофотонном возбуждении***

FLIM живых клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих флуоресцентные белки интереса в различных клеточных компартментах, проводили с использованием микроскопа Nikon TE-2000U с объективом Nikon 100x S Fluor 0.5-1.3 oil iris, оснащенный сканирующим конфокальным модулем Becker & Hickl DCS-120 и детектором HPM-100-40. Для возбуждения флуоресценции использовали лазер Fianium WhiteLase SC-450-6 с частотой 60 МГц. Средняя мощность входного лазера составляла 1,5 мВт, 488 нм лазерная линия была получена с помощью AOTF. Для точной регулировки интенсивности облучения использовали бесступенчатые фильтры с нейтральной плотностью. Сигнал эмиссии флуоресценции фильтровали с помощью фильтра HQ495LP + HQ525 / 50 (Chroma). Флуоресцентные изображения/данные о времени жизни флуоресценции были получены и проанализированы с использованием программного обеспечения SPCImage (Becker & Hickl, Germany).

## **4.6. КОМПЬЮТЕРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ**

Расчеты проводили сотрудники лаборатории проф. Анны Крыловой (Университет Южной Калифорнии, США). Мы приводим здесь краткие описания основных использованных подходов.



Структуры из базы данных белков 1F09 и 1F0B [55] использовали для представления YFP с галогенидом и без него. Для GFP была использована структура 1EMA [10]. Для того, чтобы определить возможные участки связывания внешнего окислителя, мы выполнили докинг-вычисления, используя программу AutoDock [56]. Эти расчеты сопровождались MD моделированием (10 нс). Мы провели полуэмпирические расчеты вероятности туннелирования между хромофором и различными возможными акцепторами электронов с использованием модели Pathways [57], в которой вероятность туннелирования между указанным донором и акцептором вычисляется как результат вероятностей туннелирования через все возможные пути. Модель рассматривает туннелирование через ковалентные связи, водородные связи и через пространство. Для туннелирования через ковалентные связи назначается наибольшая вероятность, за которой следует туннелирование через водородные связи и через пространство. Таким образом, модель Pathways учитывает расстояния и связность (ковалентные и водородные связи) между донорными и акцепторными остатками. Чтобы оценить осуществимость различных механизмов, мы выполнили подробные расчеты уровней ET между различными участками с использованием выражения для скорости Маркуса:

$$k_{\text{ET}} = \frac{2\pi}{\hbar} |H_{\text{DA}}|^2 \frac{1}{\sqrt{4\pi\lambda k_{\text{B}}T}} \exp\left\{-\frac{(\Delta G + \lambda)^2}{4\lambda k_{\text{B}}T}\right\}$$

где  $\Delta G$ ,  $\lambda$  и  $H_{\text{DA}}$  - изменение свободной энергии, энергия реорганизации и связывание между электронными состояниями, участвующими в ET. Соответствующие свободные энергии и электронные связи были рассчитаны с использованием QM/MM. Термодинамическое усреднение проводилось с использованием аппроксимации линейного отклика Уоршела [58]. В этом подходе  $\Delta G$  и  $\lambda$  для процесса окисления вычисляются как

$$\Delta G_{\text{ок}} = \frac{1}{2}(\langle E_{\text{O}} - E_{\text{R}} \rangle_{\text{R}} + \langle E_{\text{O}} - E_{\text{R}} \rangle_{\text{O}})$$

$$\lambda_{\text{ок}} = \frac{1}{2}(\langle E_{\text{O}} - E_{\text{R}} \rangle_{\text{R}} - \langle E_{\text{O}} - E_{\text{R}} \rangle_{\text{O}})$$

где  $E_{\text{O}}$  и  $E_{\text{R}}$  - электронные энергии окисленного и восстановленного состояния хромофора (или тирозина) и скобки указывают на термодинамическое усреднение (индексы R и O

соответствуют усреднению по восстановленным и окисленным состояниям). Мы использовали следующий протокол для вычисления этих величин. Сначала мы выполнили MD для начального ( $\text{Chro}^-$ ) и окисленного ( $\text{Chro}^+$ ) состояния белка для получения равновесной выборки (для тирозина оба состояния соответствовали  $\text{Tyr}$  и  $\text{Tyr}^-$ ). Затем мы провели QM/MM вычисления для  $E_O$ - $E_R$  в обоих состояниях. Чтобы вычислить энергию для ET между хромофором и выбранными остатками, вместо  $E_O$ - $E_R$  мы вычислили разности энергий между начальным ( $\text{Chro}^- \cdots \text{ResX}$ ) и состоянием после переноса заряда ( $\text{Chro}^+ \cdots \text{ResX}^-$ ). В расчетах энергии ионизации хромофора QM система содержала хромофор. Для вычисления энергии присоединения электрона тирозина (Tyr145 или Tyr203) QM система содержала соответствующие остатки. В расчетах CDFT-CI QM система содержала как хромофор, так и акцепторный тирозин. Следуя протоколам, используемых в наших предыдущих расчетах окислительно-восстановительных потенциалов, в расчетах QM/MM [59] мы использовали функциональный  $\omega$ B97X-D, который включает дальний обмен и коррекцию дисперсии [60]. Чтобы понять тенденции в расчетных коэффициентах ET, мы проанализировали соответствующие структурные параметры вдоль равновесных траекторий для различных систем. MD моделирование проводили с использованием NAMD [61]. Электронная структура и QM/MM расчеты проводили с использованием QCHEM [62]. Для расчетов спаривания использовали CDFT-CI.[63] CHARMM27 параметры для стандартных белковых остатков [64] и параметры, полученные Рейтером и соавт. для анионного хромофора GFP, использовали в расчетах MD [65]. Параметры для окисленных/восстановленных остатков были получены из дополнительных квантовомеханических вычислений.

## 5. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

### 5.1. УВЕЛИЧЕНИЕ ФОТОСТАБИЛЬНОСТИ ЗЕЛЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ПУТЕМ ИЗМЕНЕНИЯ СОСТАВА КЛЕТОЧНЫХ СРЕД

Окислительная фотоконверсия, или реддинг GFP, является нежелательным процессом при визуализации структур в живых клетках, поскольку представляет собой важную (если не основную) причину обесцвечивания зеленых флуоресцентных белков. В этой связи одним из подходов к повышению фотостабильности GFP стала модификация химического состава клеточных сред, а именно, удаление из них возможных акцепторов электронов, которые могут участвовать в реддинге.

Первоначально в качестве среды для визуализации использовали буфер PBS (фосфат натрия двузамещенный - 1150 мг/л, хлорид калия - 200 мг/л, фосфат калия однозамещенный - 200 мг/л, хлорид натрия 8000 мг/л, рН – 7,4), обеспечивавший пятикратное увеличение фотостабильности EGFP по сравнению с таковой при микроскопии в среде DMEM. Однако PBS, не содержащий необходимых для жизнедеятельности клеток питательных веществ, не подходит для длительных экспериментов, поэтому были разработаны модификации среды DMEM, не содержащие рибофлавина или всех витаминов группы В (DMEM<sup>gfp</sup>). Отсутствие рибофлавина в среде обеспечивало увеличение фотостабильности EGFP примерно в 5 раза, а отсутствие всех витаминов – более чем в 9 раз [66]. Важно отметить, что интенсивность красного сигнала, относящегося к реддингу EGFP, была ниже в средах без рибофлавина и всех витаминов, чем в полной среде DMEM, пропорционально увеличению фотостабильности [42].

Так как использование обедненных витаминами сред нарушает физиологические условия эксперимента, предпринимались попытки воздействовать на фотообесцвечивание не удалением существующих, а добавлением новых компонентов. В частности, тестировались соединения с известной антиоксидантной активностью: глутатион, аскорбат и рутин (витамин Р). Среди них только рутин продемонстрировал положительный эффект на фотостабильность EGFP. После добавления рутина к полной среде DMEM и 30 минут инкубации наблюдалось существенное увеличение фотостабильности, сравнимое с уровнем фотостабильности в среде DMEM<sup>gfp</sup>. Более того, добавление рутина к DMEM<sup>gfp</sup> приводило к дальнейшему увеличению фотостабильности EGFP. Рутин существенно ингибирует протекание реддинга при добавлении к полной

среде DMEM и DMEM<sup>gfp</sup>. Интересно, что эффект при добавлении рутина наблюдается только в живых клетках, но не в экспериментах *in vitro* [42].

Добавление рутина является перспективным методом увеличения фотостабильности зеленых флуоресцентных белков, поскольку позволяет избежать клеточного стресса, связанного с длительной инкубацией в бедной среде. Однако рутину присущи некоторые особенности, ограничивающие удобство его использования. Во-первых, он обладает низкой (около 100 мг/л) растворимостью в воде, что исключает возможность приготовления концентрированного раствора. Во-вторых, в водных растворах рутин в течение нескольких дней теряет активность, что делает бессмысленным его длительное хранение в растворенной форме. Наконец, плохо изучена зависимость эффективности рутина от его концентрации в среде.

### **5.1.1. Стабилизация рутина в различных растворителях при различных температурах**

В литературе имеются данные по изучению стабильности рутина и родственных ему флавоноидов в различных растворах. Так, показано, что рутин является фотостабильным веществом, а также не претерпевает декарбоксилирования под действием кислорода воздуха, как близкий ему по строению кверцетин [67]. В щелочных средах (при pH 8,3 и выше) в спиртовых растворах рутин не деградирует, это объясняется наличием остатка углевода, который стабилизирует рутин в этих условиях, однако при закислении среды рутин быстро гидролизует, теряя углеводный остаток и превращаясь в кверцетин, который разрушается в присутствии кислорода воздуха [68]. В рамках данной работы мы поставили задачу подобрать условия, в которых рутин возможно будет хранить в растворенном виде продолжительное время.

Ранее было показано, что положительный эффект рутина на фотостабильность EGFP в клетках проявляется только в свежеприготовленных водных растворах [42]. Чтобы найти подходящие условия хранения, мы проверили активность рутина после хранения в двух разных растворителях, воде и DMSO, и при разных температурах (22°C, 4°C, -20°C и -70°C). Через 3 недели рутин в DMSO поддерживал полную активность при каждой температуре хранения. Напротив, раствор рутина в воде полностью потерял свою активность при 22°C и 4°C; оставались активными только образцы, хранившиеся в замороженном состоянии.

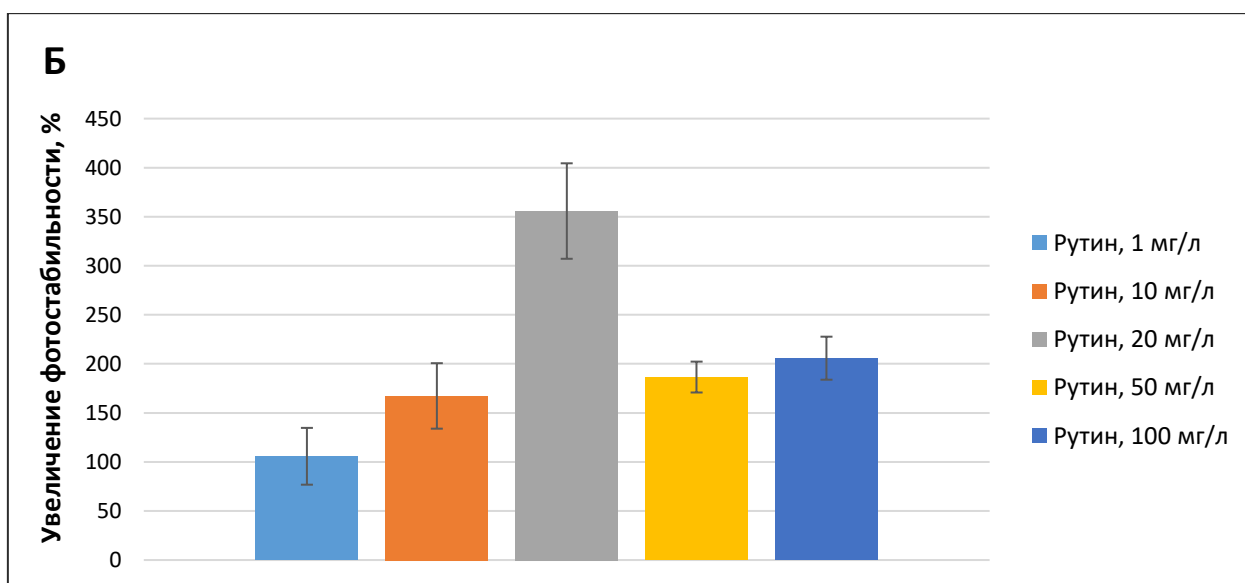
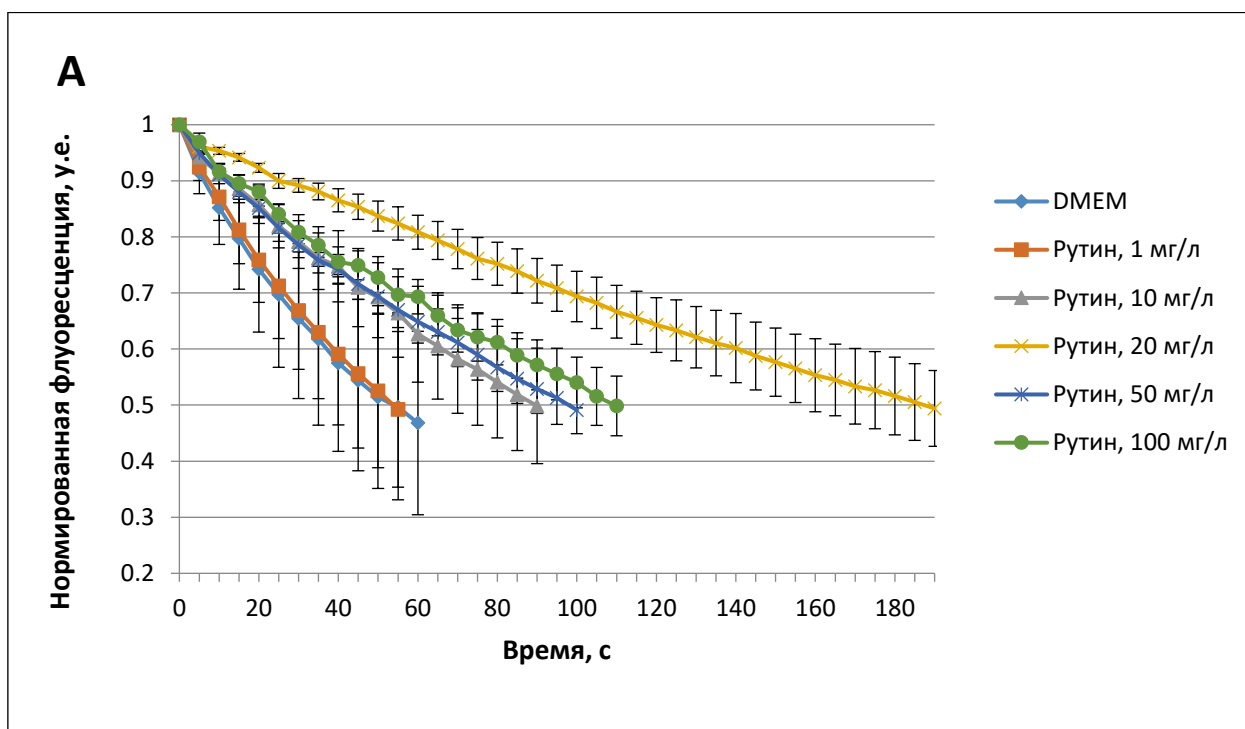
Важно отметить, что рутин обладает существенно лучшей растворимостью в DMSO, чем в воде (приблизительно 3 г/л и 100 мг/л, соответственно). Таким образом, DMSO можно использовать для приготовления концентрированного исходного раствора и

хранить его для удобства. В то же время низкие температуры могут быть рекомендованы для хранения водного раствора рутина в ситуациях, когда DMSO не может использоваться.

### **5.1.2. Концентрационная зависимость эффекта рутина**

В предыдущих работах было показано, что действующая концентрация рутина составляет около 10 мг/л [42]. Мы провели более детальное изучение зависимости увеличения фотостабильности EGFP в живых клетках от концентрации рутина, выбрав 5 концентрационных точек – 1 мг/л, 10 мг/л, 20 мг/л, 50 мг/л и 100 мг/л – в стандартной среде DMEM.

Результаты эксперимента представлены на рис. 12.



**Рис. 12.** Результаты эксперимента по изучению концентрационной зависимости эффекта рутина на фотостабильность EGFP. А) Показаны усреднённые кривые фотообесцвечивания белка ( $n = 24$ ). Использовали свежеприготовленный водный раствор рутина. Интенсивность возбуждающего света составляла  $2,5 \text{ Вт/см}^2$ . Измерения проводили сначала в среде DMEM, затем последовательно повышали концентрацию рутина в среде. Б) Зависимость увеличения фотостабильности от концентрации рутина в среде. Построение диаграммы осуществляли по данным рис.12 А.

Как видно на рис. 12 А, Б, рутин в концентрации 1 мг/л не оказывает эффекта на фотостабильность EGFP (время полуобесцвечивания составляет 55 секунд), при увеличении концентрации до 10 мг/л фотостабильность увеличивалась в 1,6 раза (время

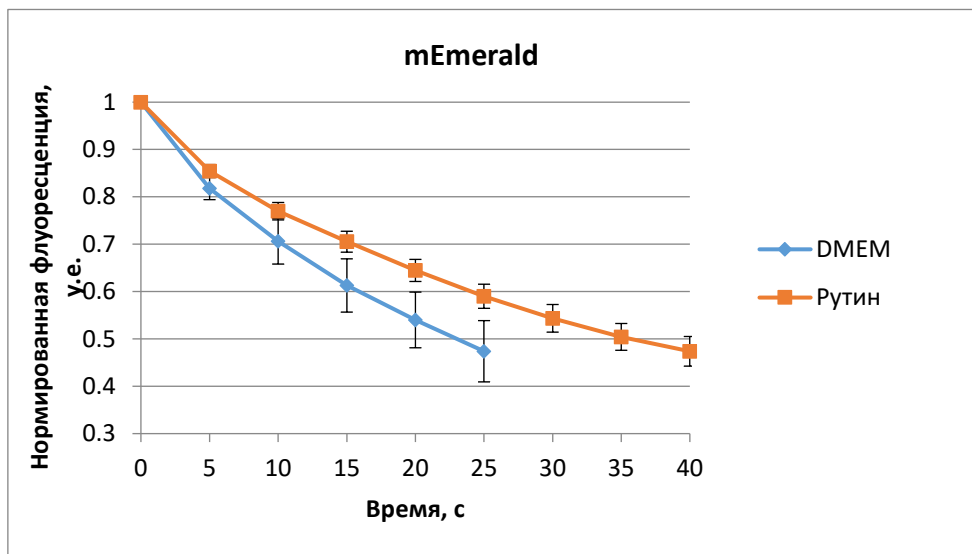
полуобесцвечивания составляет 90 секунд). Такой же эффект наблюдали при концентрациях 50 и 100 мг/л. Наибольшее же увеличение фотостабильности мы зарегистрировали при концентрации рутина в среде 20 мг/л: фотостабильность EGFP увеличивалась примерно в 3,4 раза (время полуобесцвечивания – 185 секунд). Эффект увеличения влияния рутина на фотостабильность с повышением концентрации до 20 мг/л можно объяснить его антиоксидантными свойствами [69], [70] и способностью блокировать переход в триплетное состояние, непосредственно связанное с окислительной фотоконверсией [71]. Снижение же эффекта рутина при дальнейшем увеличении концентрации, вероятно, происходит ввиду опосредованности действия флавоноида собственным метаболизмом клетки.

### **5.1.3. Проверка эффекта рутина на других популярных зеленых флуоресцентных белках**

Помимо EGFP в качестве белков-маркеров при флуоресцентной микроскопии широко используются такие ФБ, как CopGreen [72], copGreen2 [73], TagGFP2 [74], Emerald [10] и mEmerald, характеризующиеся высокой яркостью флуоресценции и быстрым созреванием хромофора. Фотообесцвечивание этих белков в живых клетках также может быть связано с протеканием окислительной фотоконверсии. В этой связи важно установить, является ли использование клеточных сред модифицированного состава (конкретно, с добавкой рутина) эффективным способом увеличения фотостабильности данных флуорофоров.

В нашей работе мы показали, что рутин практически во всех случаях не оказывает влияния на фотостабильность. Незначительный эффект наблюдается только в случае mEmerald. Его фотостабильность под влиянием рутина увеличивается примерно в 1,5 раза: время полуобесцвечивания mEmerald в среде DMEM составляет около 22 секунд, тогда

как в присутствии рутина – 35 секунд (рис. 15).



*Рис. 15.* Влияния рутина на фотостабильность mEmerald в клетках HEK 293T. Показаны усреднённые кривые фотообесцвечивания белка ( $n = 11$ ). Использовали свежеприготовленный водный раствор рутина. Концентрация рутина в экспериментальной среде составляла 10 мг/л. Интенсивность возбуждающего света составляла 2 Вт/см<sup>2</sup>. Измерения осуществляли на второй день после трансфекции HEK293T.

Такой результат может быть обусловлен особенностями белкового микроокружения хромофоров, отличными от такового для EGFP, а также доступностью флуорофоров для взаимодействия с молекулами антиоксиданта.

Полученные выше результаты позволяют сделать вывод, что рутин не является универсальным средством для повышения фотостабильности зеленых флуоресцентных белков. Косвенно это свидетельствует о разнообразии механизмов фотообесцвечивания и необходимости более детального их изучения для поиска более универсальных подходов к увеличению фотостабильности.

#### **5.1.4. Проверка эффекта рутина в различных общепотребимых культуральных средах**

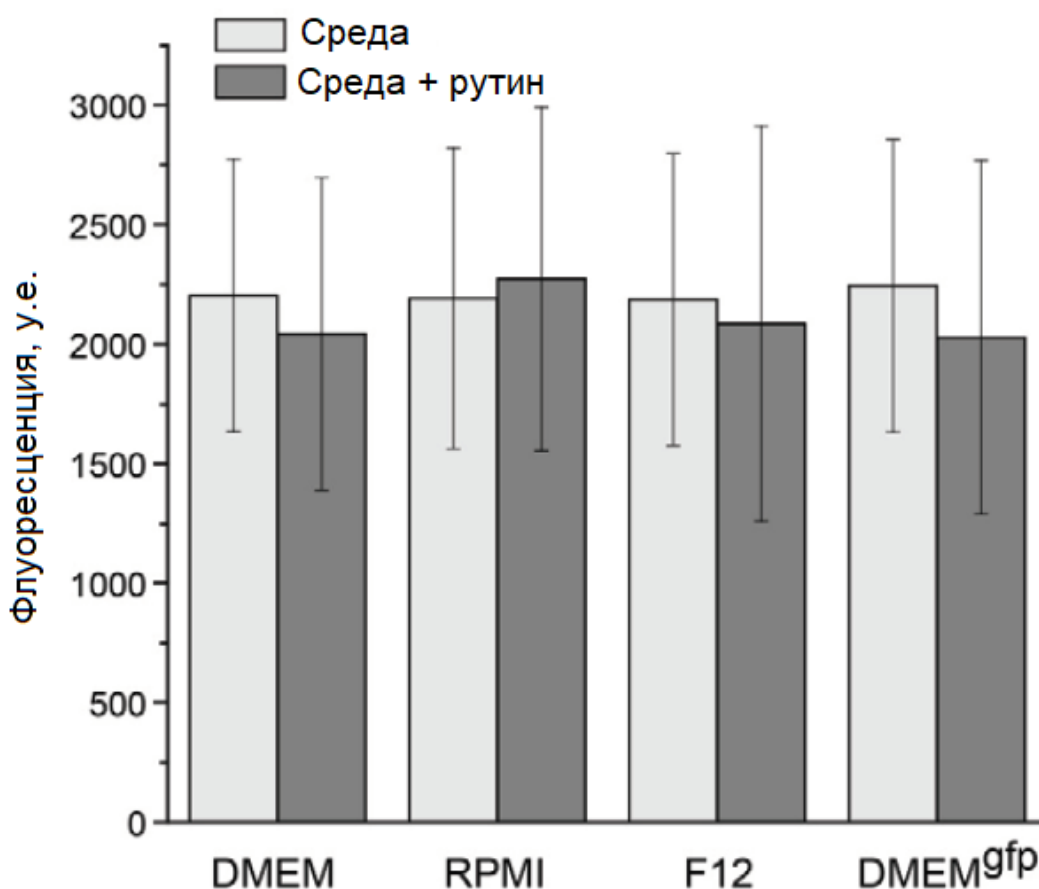
Одной из первых сред для культивирования клеток была среда EMEM (Eagle's minimal essential medium), разработанная Гарри Иглом. Несколько позже Ренато Дульбекко усовершенствовал среду Игла путем увеличения количества витаминов и аминокислот в 4 раза и глюкозы в 2 раза. Данная среда получила название DMEM (Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium) и является одной из наиболее популярных сред для культивирования [75]. Наряду с DMEM, среды Ham's F12 и RPMI1640 также широко используются в клеточной биологии. Ham's F12 была



разработана для культивирования гепатоцитов крыс, эпителиальных клеток крыс и клеток яичника китайского хомячка (CHO). Среда RPMI 1640 обычно используется для выращивания лимфоидных клеток человека, но также подходит для культивирования разнообразных других клеточных линий.

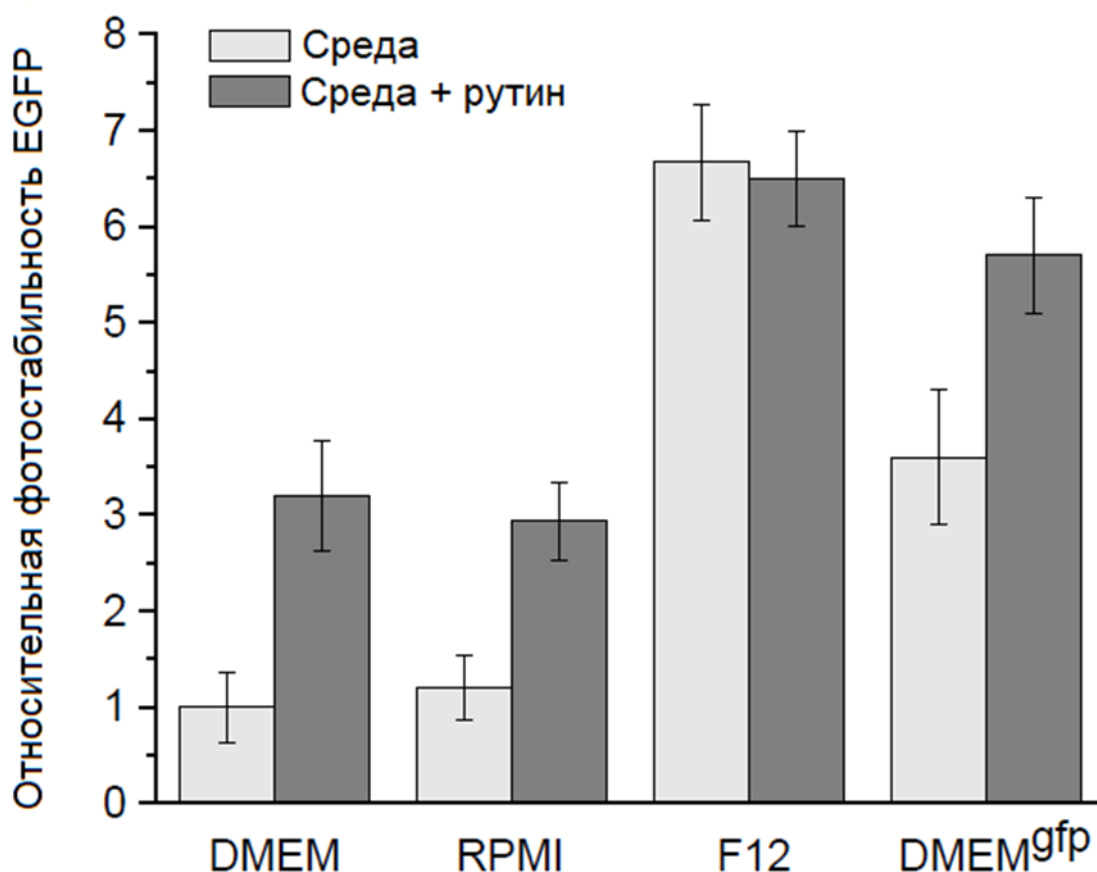
Поскольку мы рассматривали рутин в качестве универсальной добавки в среду для увеличения фотостабильности, необходимо было проверить его активность в других наиболее часто используемых средах: RPMI 1640 и F12, а также сравнить эффект, оказываемый рутином, с увеличением фотостабильности в DMEM<sup>gfp</sup> [42], чтобы впоследствии подобрать оптимальные с точки зрения клеточной физиологии условия для визуализации с наибольшей фотостабильностью EGFP.

Все тестируемые среды (как с рутином, так и без него) не влияли на среднюю начальную яркость EGFP в клетках (рис. 16).



*Рис. 16. Сравнение яркости флуоресценции EGFP в живых клетках HEK293T в разных средах. Клетки, временно экспрессирующие EGFP, снимали при одних и тех же настройках микроскопа. Показаны средние значения сигнала флуоресценции и стандартных отклонений (30-50 клеток для каждой среды).*

Фотостабильности EGFP в DMEM и RPMI1640 оказались близкими (время полубесцвечивания составляет 15 и 17 секунд, соответственно). Добавление рутина в эти среды вызывало похожее по относительному эффекту (в 3-4 раза) увеличение фотостабильности EGFP (рис. 17). Напротив, Ham's F12 обеспечивала очень высокую начальную фотостабильность EGFP (время полубесцвечивания 95 секунд), которая практически не подвергалась воздействию рутина (рис. 17) и почти в 2 раза опередила коммерческую DMEM<sup>gfp</sup>.



*Рис. 17. Влияние различных сред и добавления рутина на фотостабильность EGFP в клетках HEK 293T. Значение для DMEM было установлено равным 1. n=30.*

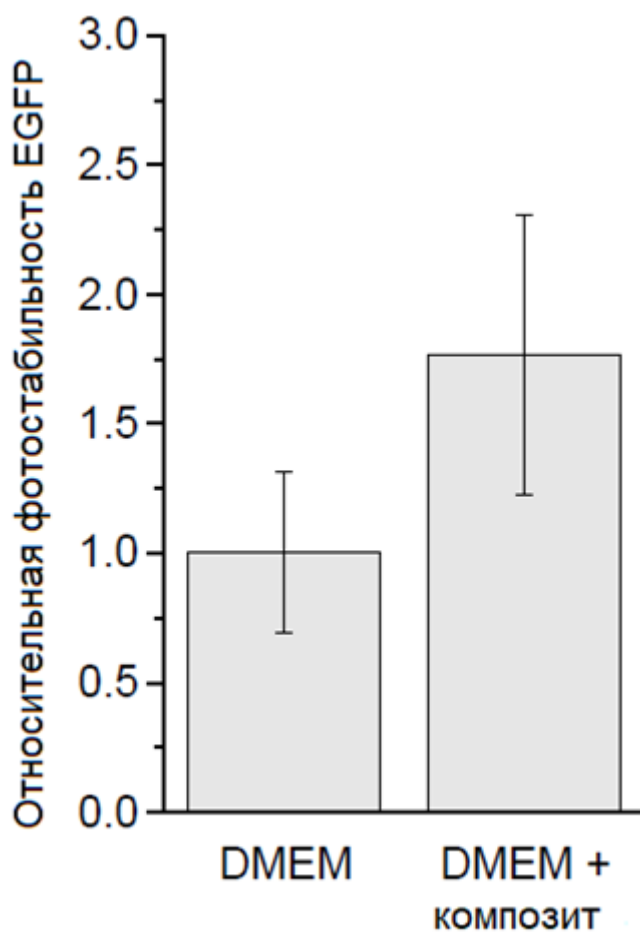
#### **5.1.5. Исследования влияния различных компонентов среды Ham's F12 на фотостабильность EGFP**

Неожиданно низкая скорость фотообесцвечивания EGFP при использовании среды Ham's F12 подтолкнула нас к анализу её состава с целью определения конкретных компонентов, влияющих на фотостабильность. F12 заметно отличается от DMEM по составу (см. Приложение 7.3.). В частности, F12 содержит значительно меньшие концентрации рибофлавина и пиридоксаля (соответственно, в 11 и 67 раз по сравнению с DMEM). Эти различия, по-видимому, наиболее важны, поскольку ранее было показано, что данные витамины существенно уменьшают фотостабильность EGFP [41], [42].

Однако очевидно, что сниженные концентрации рибофлавина и пиридоксаля не полностью объясняют антифадинговые свойства F12, поскольку та оказывает большее влияние на фотостабильность EGFP, чем DMEM<sup>gfp</sup> (DMEM без витаминов) (рис. 17). Кроме того, примечательно, что рутин увеличивает фотостабильность EGFP при добавлении в DMEM<sup>gfp</sup>, но неэффективен в составе F12 – феномен, требующий дополнительного изучения. В этой связи мы проверили влияние на фотостабильность

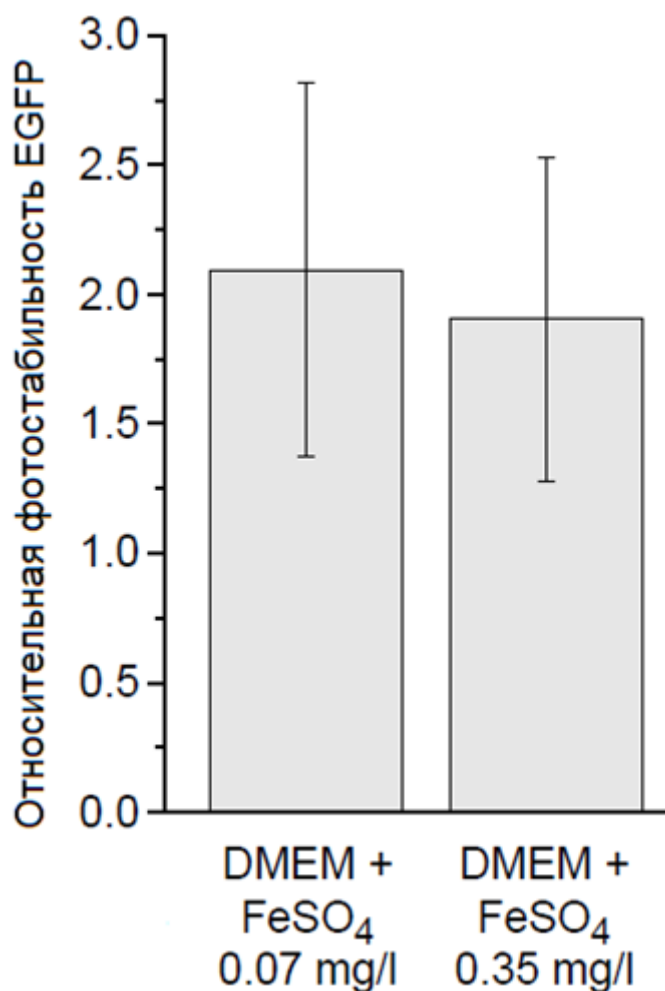
EGFP других веществ, которые отвечают за различие составов DMEM и F12: аминокислот (L-Ala, L-Arg, L-Asn, L-Asp, L-Cys, L-Glu), витаминов (биотин, B12, липоевая кислота), нуклеотидов и азотистых оснований (тимидин, гипоксантин), биогенных аминов (путресцин) и солей различных металлов ( $MgCl_2$ ,  $Na_2HPO_4$ ,  $CuSO_4$ ,  $FeSO_4$ ,  $ZnSO_4$ ). С этой целью фотостабильность EGFP в живых клетках оценивали в DMEM, дополненной отдельными соединениями или их комбинациями, присутствующими в среде Хэма, по сравнению со стандартной DMEM. Мы обнаружили, что аланин, аспарагин, аспарат, глутамат, биотин и путресцин (как самостоятельно, так и в составе композитов) не влияют на фотостабильность EGFP (данные не показаны).

Мы обнаружили, что комбинация четырёх соединений с потенциальной антиоксидантной активностью, цианокобаламина (витамина B12), липоевой кислоты, гипоксантина и тимидина, обеспечивает приблизительно двухкратное повышение фотостабильности (рис. 18). Примечательно, что по отдельности эти вещества не оказывали влияния на фотообесцвечивание EGFP при добавлении к DMEM.



**Рис. 18.** Влияние компонентов F12 на фотостабильность EGFP в клетках HEK 293T. Фотостабильность EGFP измеряли в DMEM, DMEM, дополненной смесью цианокобаламина (1,4 мг/л), липоевой кислоты (0,21 мг/л), гипоксантина (4,1 мг/л) и тимидина (0,7 мг/л) - «DMEM + композит», или DMEM, дополненной FeSO<sub>4</sub> (0,07 мг/л). Значение фотостабильности для DMEM было установлено равным 1.

Ионы металлов, такие как Fe<sup>2+/3+</sup> и Cu<sup>+2+</sup>, состав которых также различен в исследуемых средах, очень реакционноспособны, что предполагает возможные взаимодействия с внутриклеточными акцепторами электронов, ответственными за окислительную фотоконверсию EGFP, в частности, восстановление Fe<sup>3+</sup> до Fe<sup>2+</sup> в клетках происходит с участием рибофлавина [76]. CuSO<sub>4</sub> и ZnSO<sub>4</sub>, входящие в состав F12, не оказывали существенного влияния на фотостабильность в DMEM (данные не показаны). Напротив, FeSO<sub>4</sub>, добавленный к DMEM, привел к двукратному увеличению фотостабильности EGFP в живых клетках (рис. 19). Интересно, что пятикратный избыток этого соединения (по сравнению с базовой концентрацией, присутствующей в F12) не приводил к дальнейшему увеличению фотостабильности (рис. 19).



**Рис. 19.** Влияние компонентов F12 на фотостабильность EGFP в клетках HEK 293T. Фотостабильность EGFP измеряли в DMEM и DMEM, дополненной FeSO<sub>4</sub>. Значение для DMEM было установлено равным 1.

Также мы не обнаружили влияния FeSO<sub>4</sub> на фотостабильность выделенного препарата EGFP, иммобилизованного на металло-аффинной смоле (данные не показаны). Таким образом, эффект FeSO<sub>4</sub>, вероятно, опосредован неким биохимическим процессом в живых клетках, а не прямым взаимодействием с EGFP. Аналогичное поведение было ранее показано и для рутина [42]. Любопытно, что опосредованное внутриклеточными процессами обесцвечивание EGFP (т.н. «отложенное фотообесцвечивание») было описано в литературе [77]. Этот эффект отличается от обычного фотообесцвечивания как кинетикой (происходит спустя минуты после облучения), так и тем, что он характерен только для живых клеток, а не для выделенного белка *in vitro*. Авторы доказали, что индуцированное светом повреждение эндоплазматического ретикулума и последующий выход Ca<sup>2+</sup> в цитоплазму вызывали последующее разрушение флуорофора.

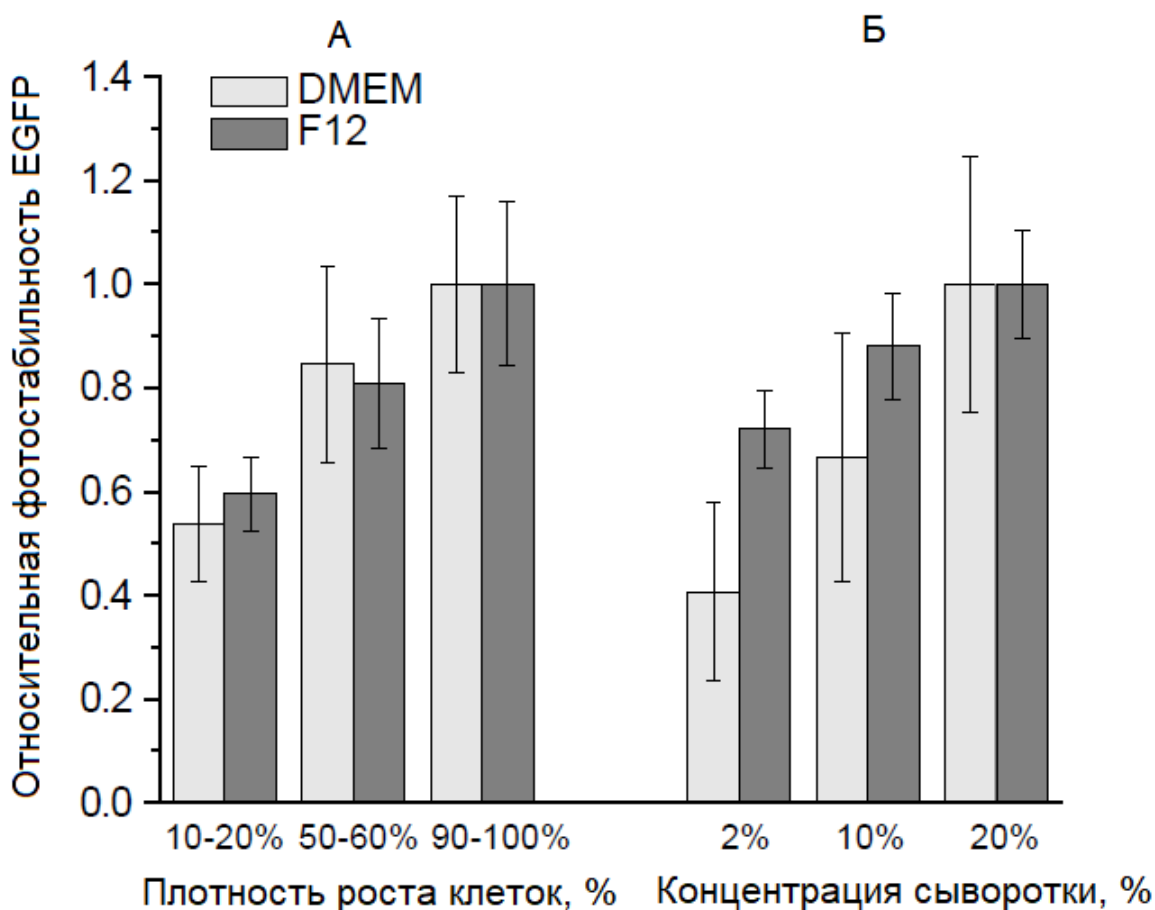
### 5.1.6. Влияние условий роста клеток (рН, концентрация сыворотки, плотность роста) на фотостабильность

Проводя множество независимых экспериментов по измерению фотостабильности EGFP в живых клетках НЕК293Т, мы отметили, что в некоторых случаях даже в одинаковых условиях (настройки микроскопа, состав среды визуализации и интенсивность света) наблюдается высокая вариабельность получаемых результатов с разбросом по времени полуобесцвечивания до 3-4 раз. Чтобы выяснить причины такой неоднородности, а также более строго стандартизовать дальнейшие наблюдения, мы проверили влияние ряда параметров, которые могут различаться при подготовке отдельных экспериментов в силу особенностей работы с клеточными культурами: среднего рН, плотности роста клеток и средней концентрации фетальной сыворотки.

Сначала мы протестировали среду DMEM с разными рН (от 7,0 до 8,5) и не детектировали существенных различий фотостабильности EGFP в этом диапазоне рН (данные не показаны).

Затем мы изучали фотостабильность EGFP при разной плотности роста клеток. Клетки НЕК293Т были трансфицированы экспрессионным вектором и культивировались до достижения 10-20%, 50-60% и 90%-100% плотности (конфлюентности) к дню эксперимента. В DMEM наблюдалось явное увеличение фотостабильности EGFP по мере увеличения плотности клеток (рис. 20 А). Аналогичная зависимость наблюдалась для клеток в среде F12.

Наконец, мы проверили влияние концентрации сыворотки, служащей источником питательных веществ для клеток. Клетки выращивали в среде, дополненной 2%, 10% или 20% FBS. Мы обнаружили существенные различия в фотостабильности EGFP как для DMEM, так и для F12. Самая низкая фотостабильность была обнаружена при 2% FBS и самая высокая - при 20%. Внутри выборки с каждым набором изменяемых параметров также присутствовала вариабельность, но в среднем наблюдаемый эффект был хорошо различим, хотя не всегда статистически достоверен. Различия между наивысшим и наименьшим временами полуобесцвечивания составляли 2,5-3 раза для DMEM и 1,3-1,5 раза для F12 (рис. 20 Б).



**Рис. 20.** Сравнение фотостабильности EGFP в живых клетках HEK293T в разных условиях. Нормированное время полубесцветивания использовали в качестве меры фотостабильности EGFP (за 100% принимали максимальное значение фотостабильности для каждой из сред). (А) Влияние плотности роста клеток. (Б) Влияние концентрации сыворотки.

Ранее было показано, что кратковременная (0,5 ч) инкубация клеток с или без сыворотки в среде для визуализации не влияет на фотостабильность EGFP [41]. Таким образом, долгосрочные эффекты сыворотки на физиологию клеток были важны в настоящих экспериментах.

Тот факт, что физиологическое состояние живых клеток может оказывать сильное влияние на фотостабильность флуоресцентных белков и представляет собой важный источник изменчивости (экспериментальной погрешности) для значений, полученных в разное время или в разных лабораториях, заставляет с большей осторожностью относиться к сравнению публикуемых значений фотостабильности. Сравнение фотостабильности флуоресцентных белков должно выполняться в максимально стандартизованных условиях, а сравнение данных из разных источников может быть очень неточным.



### 5.1.7. Обсуждение результатов главы 5.1.

По результатам проведённых экспериментов с рутином можно сделать вывод, что при существенном влиянии на фотостабильность EGFP в средах DMEM, RPMI1640 и DMEM<sup>sp</sup> это вещество не может рассматриваться как универсальный антифадинговый агент. Так, его эффективность в отношении ряда популярных флуоресцентных белков либо незначительна, либо отсутствует, а применение при визуализации среды F12 (по крайней мере, в случае совместимых с ней клеточных линий) вполне способно заменить добавление этого флавоноида. Поскольку действие рутина связано с клеточным метаболизмом, то достоверно объяснить причину его избирательности затруднительно.

Наличие в среде большого количества веществ, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях (витаминов, нуклеотидов, азотистых оснований и ионов металлов), вносит значительный вклад в блокирование фотообесцвечивания, причем, во всей видимости, влияние данных веществ зачастую опосредовано собственным метаболизмом клетки.

Наша работа также показывает, что важными детерминантами скорости фотообесцвечивания EGFP являются не только состав среды визуализации, но и условия роста клеток. Более ранние работы показывают, что клетки в условиях низкой концентрации сыворотки или низкой плотности роста клеток испытывают значительный окислительный сдвиг и увеличение количества эндогенных активных форм кислорода [43]. Можно предположить, что окислительная среда является причиной снижения фотостабильности EGFP, наблюдаемой в наших экспериментах в этих условиях (см. рис. 17).

Возбужденный хромофор EGFP восприимчив к наличию электронных акцепторов в своем окружении, способен обесцвечиваться в результате фотоокисления. Как результат, число квантов, в среднем испускаемых одной молекулой флуорофора, существенно снижается, а значит длительность облучения и/или его дозовая нагрузка на образец в эксперименте заметно ограничены. Изучение молекулярных механизмов фотоиндуцированного окисления является не только важной практической, но и фундаментальной задачей, решение которой, мы полагаем, может пролить свет на природу процессов, в которые вовлечены хромофор и его окружение. В рамках данной работы мы предлагаем два принципиально разных подхода к фотостабилизации хромофора: блокирование светозависимого транспорта электронов путем изменения состава внешней для белка среды (см. выше), и воздействие на фотообесцвечивание с помощью модификации структуры самого белка. Второй подход, предполагающий

идентификацию и замену ключевых аминокислотных остатков, которые могли бы выступать в роли промежуточных акцепторов при фотоокислении хромофора EGFP, описан в следующей главе.

## **5.2. УВЕЛИЧЕНИЕ ФОТОСТАБИЛЬНОСТИ ЗЕЛЕННЫХ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ПУТЕМ УДАЛЕНИЯ ВНУТРЕННИХ АКЦЕПТОРОВ ЭЛЕКТРОНОВ**

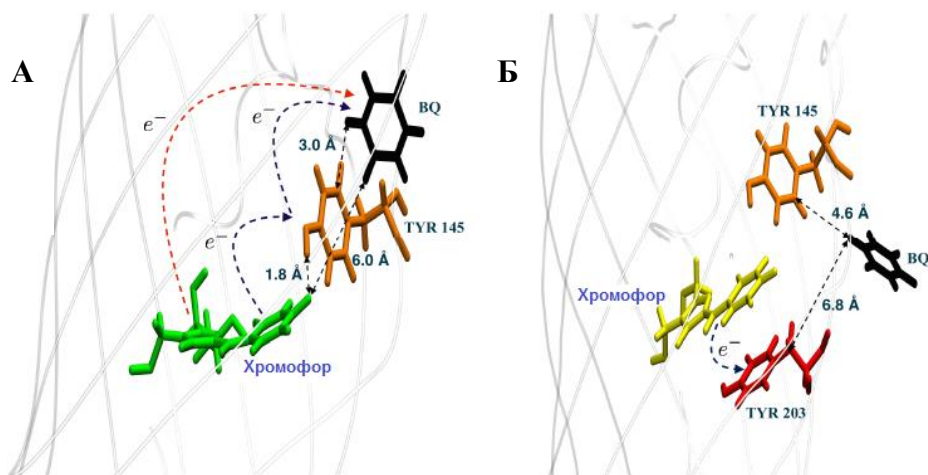
### **5.2.1. Результаты молекулярного моделирования переноса электрона в EGFP**

На сегодняшний момент известно, что в основе окислительного реддинга и связанного с ним фотообесцвечивания GFP лежат процессы, сопряженные с переносом электронов от возбужденного хромофора к внешним акцепторам. Однако механизм этого переноса остается не до конца понятным. Сотрудники лаборатории профессора Анны Крыловой (Университет Южной Калифорнии, Лос-Анджелес) провели молекулярное моделирование переноса электрона в EGFP. Были предложены две основных модели механизма переноса электрона от хромофора: туннелирование и «скачкообразный» механизм («hopping» mechanism). Согласно первой модели перенос электрона осуществляется в одну стадию непосредственно на внешний акцептор. Подобный процесс требует пространственной близости донора и акцептора электрона. Согласно второй модели перенос электрона осуществляется в несколько этапов с образованием окисленных и восстановленных интермедиатов.

Участки контакта окислителей с поверхностью флуоресцентных белков ранее не изучались. Проведённое в рамках расчётной части работы докинг-моделирование взаимодействия парабензохинона (BQ) с EGFP показало, что характер взаимодействия этих молекул может благоприятствовать обеим базовым моделям переноса (см. рис. 21). Перенос электронов в белках может протекать через расстояния до 20 Å; с наблюдаемыми скоростями  $10^2$ - $10^8$  с<sup>-1</sup> [78]. Исходя из литературных величин сродства к электрону, триптофан и тирозин были определены в качестве наиболее вероятных акцепторов. Мы проанализировали кристаллическую структуру EGFP<sup>5</sup>, определив эти остатки в окрестности хромофора. В дополнение к структурному анализу наши коллеги также выполнили полуэмпирические расчеты используя модель Pathways [57], которая позволяет сравнить вероятности туннелирования ( $T_{DA}$ ) между различными сайтами и идентифицировать остатки, которые опосредуют ET (electron transfer – перенос электрона).

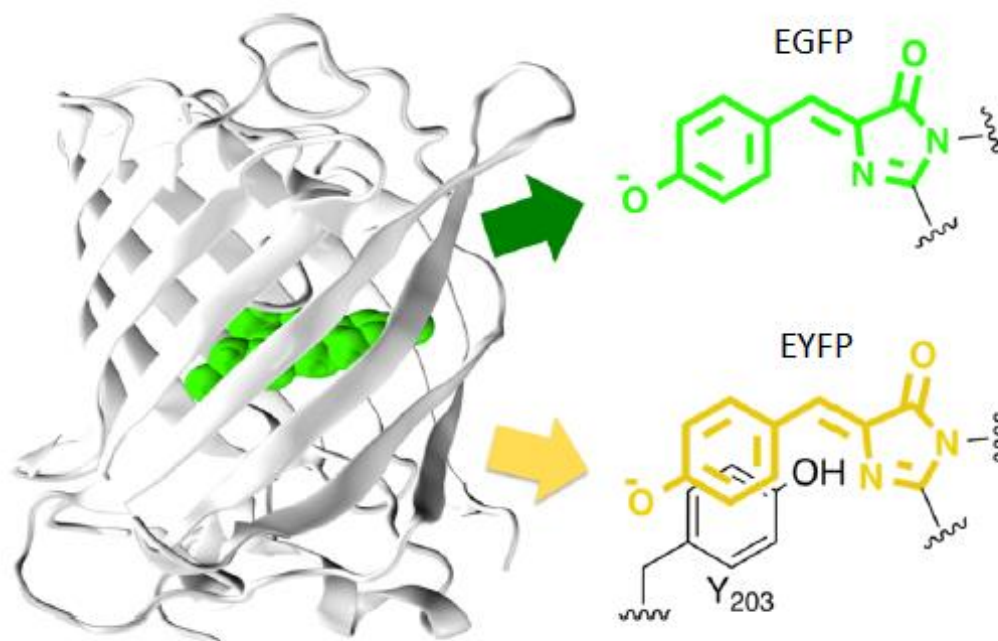
---

<sup>5</sup> <https://www.rcsb.org/structure/2y0g>



**Рис. 21.** Моделирование фотоиндуцированного переноса электрона во флуоресцентных белках. Молекула окислителя (BQ) в контакте с поверхностью EGFP (А) и EYFP (Б). Механизмы прямого туннелирования и двухстадийного переноса электрона (через остаток Y145) показаны прерывистыми стрелками [77].

Эти расчеты позволили определить Tyr145 как наиболее вероятный акцептор электронов в EGFP ( $T_{DA} = 1,9 \times 10^{-2}$ ). Согласно модели прямого туннелирования взаимодействие окислителя и хромофора происходит в окрестностях Tyr145 и опосредованно этим остатком. Согласно же второй модели сначала электрон передается на остаток Tyr145, формируя отрицательно заряженный радикал тирозина, а затем переносится на молекулу окислителя. В случае же моделирования взаимодействия жёлтого флуоресцентного белка EYFP, близкого гомолога EGFP, и BQ расчеты показали, что может иметь место конкурирующий процесс, в ходе которого первичным акцептором электрона является остаток Tyr203 ( $T_{DA} = 2.3 \times 10^{-2}$ ), участвующий в стэкинг-взаимодействии с хромофором (структуры хромофоров представлены на рисунке 22). Tyr203 в свою очередь находится дальше от поверхности белка, чем Tyr145, поэтому последующая передача электрона на внешний акцептор не происходит. Таким образом, электрон оказывается «запертым» внутри белка, что ведет к тушению или же перманентному обесцвечиванию, посредством возможных химических реакций с участием образующегося радикала. В случае EGFP роль Tyr203 могут играть остатки Phe165 или Tyr92, вероятности туннелирования для которых примерно на порядок ниже, чем для Tyr145 и Tyr203. Однако Phe165 и Tyr92, вероятно, могут служить вторичными каналами переноса электрона.



**Рис. 22.** Структура EGFP/EYFP. Слева:  $\beta$ -бочка, окружающая хромофор. Справа: EGFP и EYFP имеют одинаковые анионные хромофоры, образованные циклизацией и окислением белка в положениях 65-67 (вверху). В EYFP хромофор формирует  $\pi$ -стэкинг-взаимодействие с Tyr203 (внизу) [79].

Таким образом, молекулярное моделирование показывает, что основная роль в фотозависимом переносе электрона принадлежит остатку Tyr145, поэтому мы предположили, что в мутантах с заменой этого остатка на остаток химически инертной аминокислоты основной канал фотоокисления может оказаться заблокированным, что положительно скажется на фотостабильности флуоресцентного белка.

### 5.2.2. Мутант EGFP-Y145L

В качестве замен мы выбрали две аминокислоты: лейцин и фенилаланин. Лейцин не способен к переносу электрона и является неароматической аминокислотой, достаточно близкой по размеру к тирозину, а фенилаланин – ароматическая аминокислота с более низкой (относительно тирозина) способностью к переносу электрона. Методом сайт-направленного мутагенеза были получены мутанты EGFP с заменами ключевого остатка Tyr145 на Leu и Phe. Фотостабильность изучали *in vitro*, на иммобилизованном на металло-аффинном носителе Talon белке, в отсутствие и присутствии окислителя (в качестве которого выступал феррицианид калия (500 мкМ), являющийся сильным акцептором электрона при фотоиндуцированном ET). Также фотостабильность изучали *in*

*cellulo*, в клетках HEK293T. Клетки трансфецировали и проводили съемку на второй день после трансфекции, предварительно (за полчаса) заменив среду на свежую.

Мутант Y145L показал существенно (до 80 раз) повышенную фотостабильность по сравнению с исходным белком в присутствии окислителя (феррицианид калия 500 мкМ) *in vitro*, т.е. в условиях, способствующих интенсивному переносу электрона от возбужденного хромофора к молекуле внешнего акцептора (рис. 23), что хорошо согласуется с нашей гипотезой о блокировании основного пути внутримолекулярного переноса электрона. В то же время Y145F продемонстрировал менее выраженный прирост фотостабильности, вероятно, за счет, пусть и сниженной по сравнению с тирозином, способности фенилаланина служить акцептором электрона. Поскольку эффект увеличения фотостабильности для этого мутанта значительно уступает таковому для Y145L, в дальнейшем проводили исследования только мутанта Y145L.

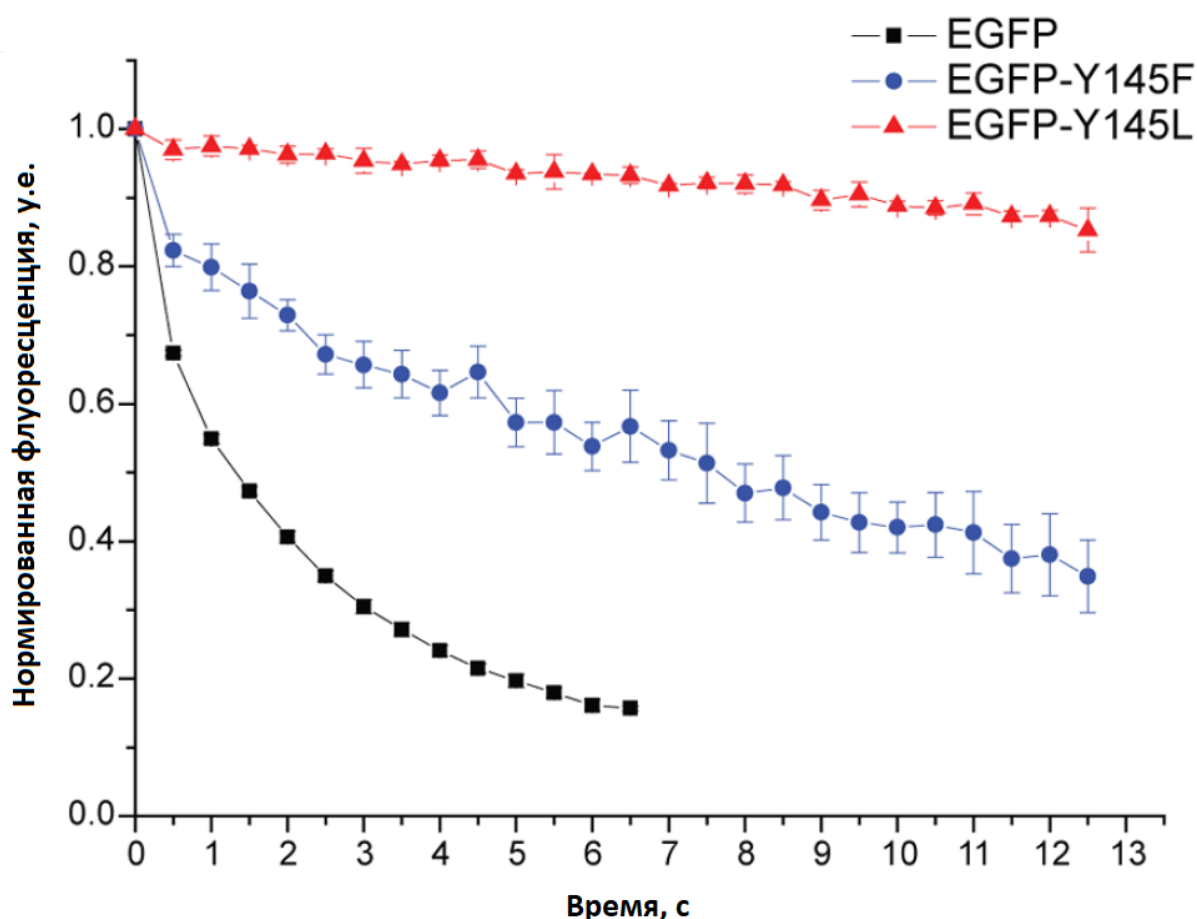
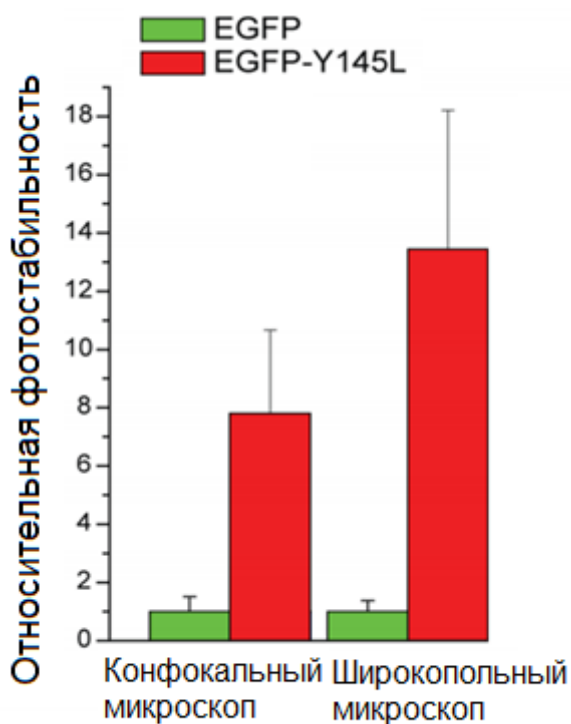


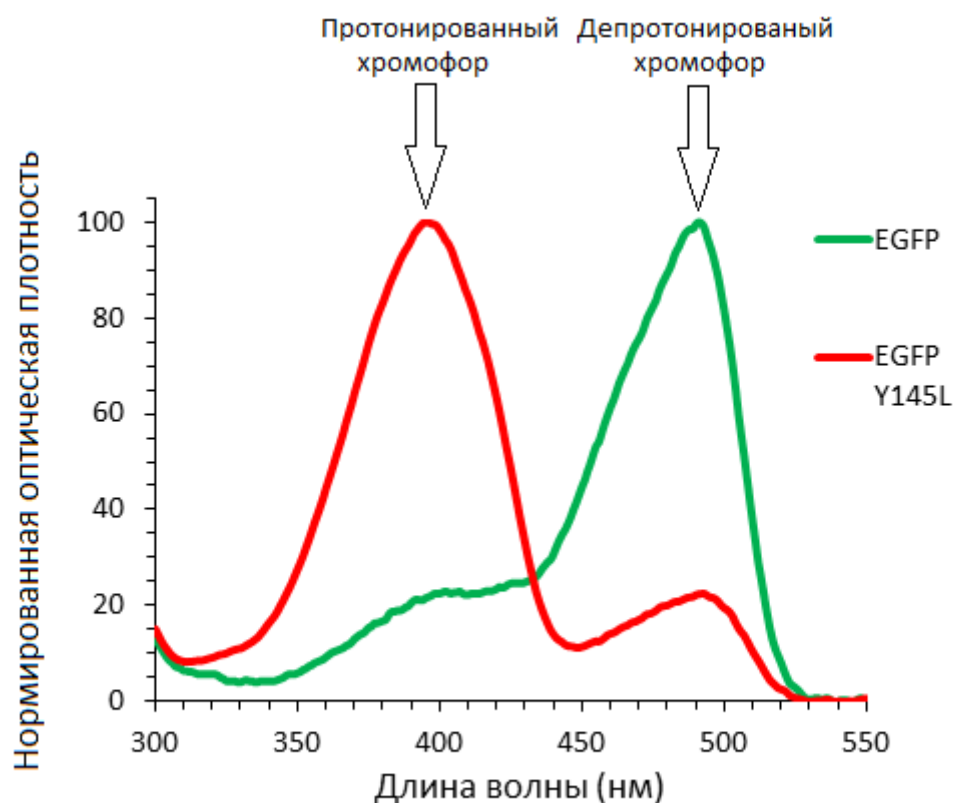
Рис. 23. Кинетики фотообесцвечивания мутантов EGFP-Y145L и Y145F по сравнению с EGFP в условиях *in vitro* в присутствии феррицианида калия.

Для того, чтобы проверить, сохраняет ли мутант Y145L повышенную фотостабильность в условиях, близких к обычным для флуоресцентной визуализации, мы также провели эксперименты в условиях *in cellulo*, без добавления внешних окислителей (рис. 24). EGFP-Y145L неизменно показывал увеличенную фотостабильность (8-13 раз) в сравнении с «родительским» белком как в условиях широкопольной, так и конфокальной флуоресцентной микроскопии. Таким образом, нам, вероятно, удалось заблокировать один из важных «каналов» фотообесцвечивания GFP.



**Рис. 24.** Увеличение фотостабильности (времени полубесцвечивания) мутантов EGFP-Y145L и Y145F по сравнению с EGFP при конфокальной и широкопольной микроскопии живых клеток HEK293T. Фотостабильность EGFP принята за 1. Показаны значения стандартного отклонения для 50-60 клеток в трех независимых экспериментах.

Однако замена Y145L привела к существенному смещению рН-равновесия в окружении хромофорной группы, доминированию нефлуоресцирующей нейтральной формы хромофора (максимум поглощения – около 400 нм) и, как следствие, – снижению яркости мутанта по сравнению с исходным EGFP (рис. 25). Более того, EGFP-Y145L способен к фотоактивации (по-видимому, за счёт светозависимого депротонирования хромофора). Эти факторы снижают его ценность как фотостабильного маркера.



*Рис. 25. Спектры поглощения белков EGFP и EGFP-Y145L. Стрелками показаны максимумы поглощения протонированной и депротонированной формы хромофора.*

Одним из подходов к повышению яркости мутанта Y145L является снижение эффективности протонирования хромофора, которое, предположительно, может быть достигнуто введением дополнительных аминокислотных замен, описанных ранее как влияющих на кислотность хромофора GFP. Согласно данным литературы, в GFP существует несколько таких аминокислотных остатков.

### 5.2.3. Борьба с протонированием хромофора мутанта EGFP Y145L

Из литературных данных ([80]–[82]) следует, что замена E222G блокирует протонирование GFP-хромофора. Способность глутамата-222 быть донором/акцептором протона является ключевым фактором в светоиндуцируемом переносе протона (ESPT) в GFP дикого типа (wtGFP) [83]. Также вовлечённость E222 в сеть водородных связей «зрелого» хромофора с аминокислотным окружением была теоретически предсказана для wtGFP и ряда его мутантов [84]. Примечательно, что спектры поглощения при высоком значении pH EGFP и EGFP/E222Q демонстрируют отсутствие нейтральной формы хромофора в мутанте E222Q [85]. В нашей работе мы выбрали замену E222G, поскольку

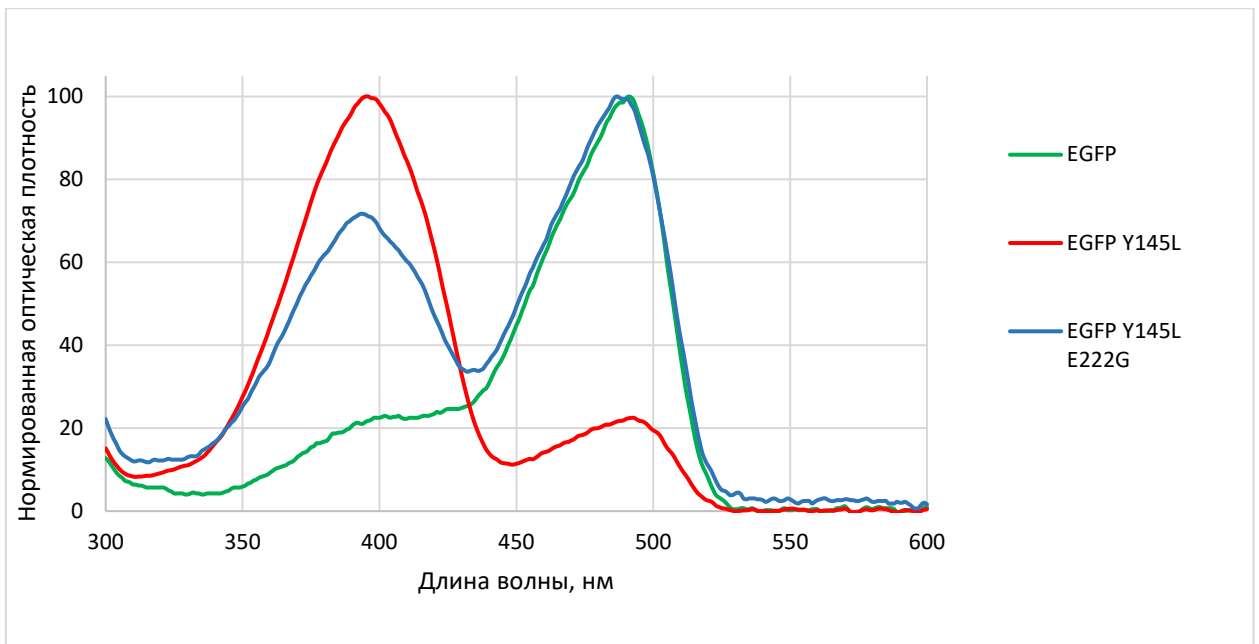
глицин не может быть донором протона и формировать водородную связь, что препятствует протонированию хромофора.

Другим интересным с точки зрения кислотности хромофора аминокислотным положением является серин-205. Для него также была показана ключевая роль в ESPT и влияние на протонирование хромофора [12]. Более того, в случае хлоридного сенсора mClY, разработанного на базе желтого флуоресцентного белка YFP (несущего хромофор типа GFP), введение замены Ser205Val приводит к существенному увеличению фотостабильности белка [12]. Вероятно, так как остаток Ser205 посредством структурной молекулы воды находится в контакте с тирозином хромофора, такая замена приводит к переорганизации водородных связей аминокислотного окружения с хромофором [21].

Мы предположили, что создание мутантов по этим остаткам (E222G и S205V) в комбинации с заменой Y145L, введённой ранее в EGFP, может привести к получению белков с существенно увеличенной фотостабильностью и одновременно высокой яркостью флуоресценции. Для проверки данного предположения были получены и протестированы следующие мутанты: EGFP-Y145L/E222G, EGFP-Y145L/S205V и EGFP-Y145L/S205V/E222G.

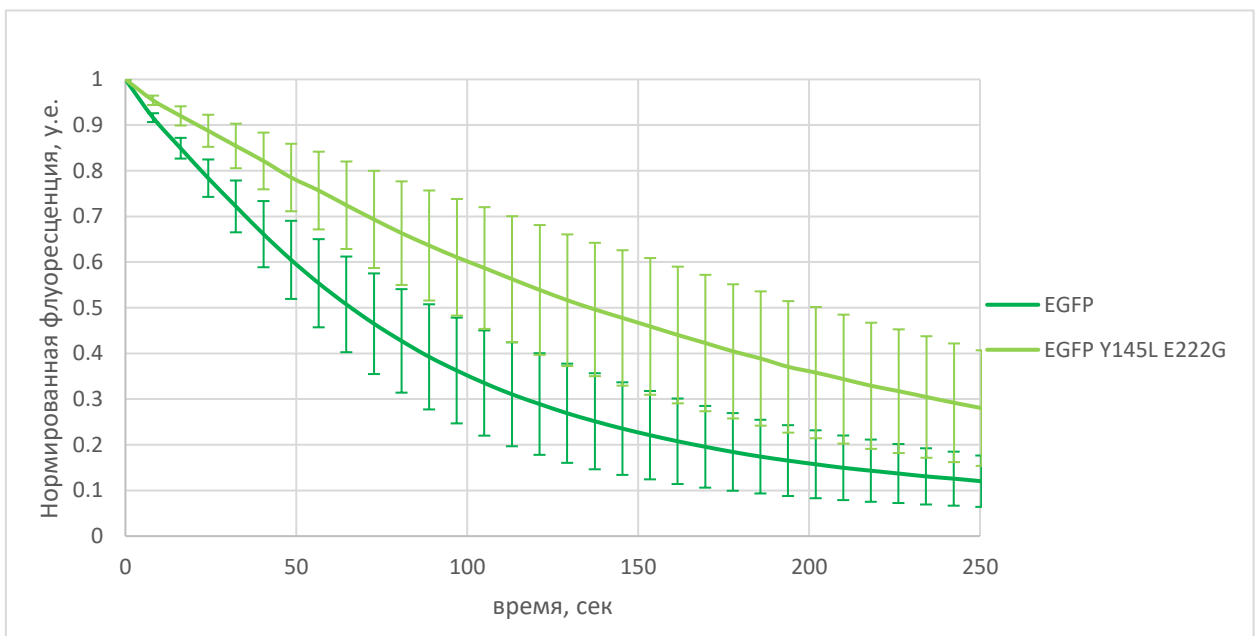
Форма спектра поглощения EGFP-Y145L/E222G свидетельствует о смещении рН-равновесия в сторону анионной формы хромофора по сравнению с EGFP-Y145L (рис. 26). Его яркость оказалась сравнимой (около 70% яркости EGFP, см. таблицу 1) с таковой для EGFP, а фотостабильность *in vitro* (в присутствии 500 мкМ феррицианида калия) – заметно выше EGFP (время полубесцвечивания EGFP и EGFP-Y145L/E222G – 64 и 137 секунд, соответственно).





**Рис. 26.** Спектры поглощения белков EGFP, EGFP-Y145L и EGFP-Y145L/E222G. Максимумы поглощения для протонированной формы хромофора составляли 395 нм, максимумы поглощения для депротонированной (анионной) формы хромофора составляли 488 нм.

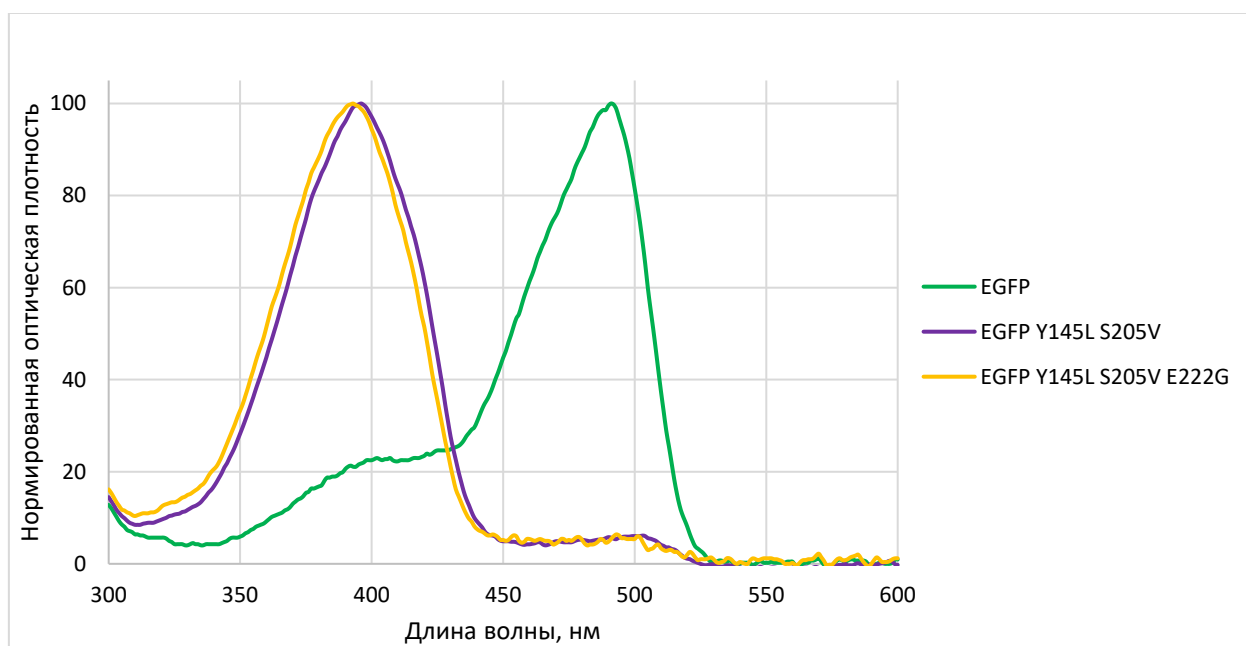
Далее мы сравнили фотостабильности EGFP и EGFP-Y145L/E222G в условиях эпифлуоресцентной микроскопии *in cellulo*, более подходящие для оценки практического потенциала нового мутанта (рис. 27).



**Рис. 27.** Фотообесцвечивание EGFP и его мутанта Y145L/E222G в клетках HEK 293T в условиях широкопольной микроскопии.  $N = 30$ .

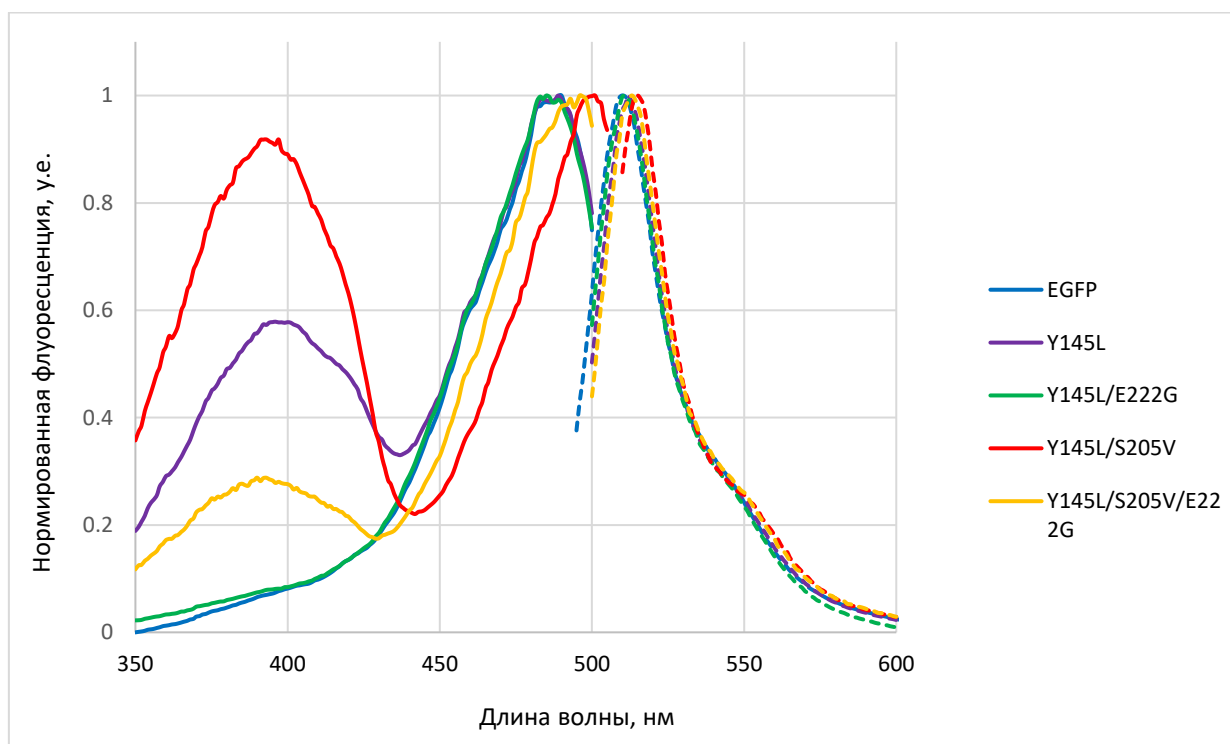
При заметно (в 4 раза, см. таблицу 1) возросшей по сравнению с Y145L яркости EGFP-Y145L/E222G оказался приблизительно в 2 раза фотостабильнее EGFP. Таким образом, введение замены E222G в значительной степени устранило недостатки, характерные для EGFP-Y145L, и двойной мутант является перспективной фотостабильной меткой для флуоресцентной микроскопии в живых клетках. В то же время прирост фотостабильности данного мутанта относительно EGFP, возможно, не отражает весь потенциал исключения тирозина-145 из цепи светозависимого переноса электрона.

При введении же мутации S205V в белки EGFP-Y145L и Y145L/E222G мы наблюдали в спектрах поглощения доминирование пика при 400 нм: у мутантов, содержащих замену S205V, практически отсутствует пик поглощения при 488 нм (рис. 28). Мы ожидали, что вследствие внесённой замены рН-равновесие хромофорной группы будет смещено в сторону депротонирования, но получили прямо противоположный результат. Доказательно объяснить данный феномен затруднительно, это потребовало бы дополнительных сложных экспериментов, не запланированных в рамках данного проекта. Можно, однако, предположить, что пара мутаций Y145L/S205V привела к существенной пространственной реорганизации хромофорного окружения и, соответственно, кардинальному изменению конфигурации сети водородных связей около хромофора.



**Рис. 28.** Спектры поглощения белков EGFP, EGFP-Y145L/S205V и EGFP-Y145L/S205V/E222G. Максимумы поглощения для протонированной формы хромофора составляли 395 нм, максимумы поглощения для депротонированной формы хромофора составляли 488 нм.

Стоит отметить, что спектры эмиссии флуоресценции мутантов EGFP (см. рис. 29) отличаются от таковых для исходного белка лишь незначительным сдвигом основного максимума (около 510 нм). В то же время спектры возбуждения (рис. 29) мутантов имеют существенные отличия от таковых для EGFP. У двойного (EGFP-Y145L/S205V) и тройного (EGFP-Y145L/S205V/E222G) мутантов помимо главного максимума возбуждения при ~490 нм есть еще один максимум при 400 нм. Похожая форма спектра возбуждения характерна и для EGFP Y145L. Появление дополнительно пика возбуждения флуоресценции можно объяснить тем, что возбужденный протонированный хромофор может по механизму ESPT переходить в анионную форму, обладающую пиком эмиссии зеленой флуоресценции при 510 нм. Также присутствие дополнительного пика возбуждения флуоресценции косвенно может указывать на то, что полученные варианты EGFP с заменой S205V являются фотоактивируемыми белками, поскольку и у описанных фотоактивируемых производных EGFP присутствует подобный дополнительный пик поглощения.



**Рис. 29.** Спектры возбуждения (слева) и эмиссии (справа) флуоресценции полученных препаратов зеленых флуоресцентных белков ( $\lambda_{em}=510$  нм,  $\lambda_{ex}=488$  нм). По оси ординат отложен нормированный на максимум сигнал флуоресценции препаратов белков.

Нами были определены коэффициенты молярной экстинкции мутантов EGFP при 488 нм, а также относительные квантовые выходы их флуоресценции при 510 нм (см.

Материалы и методы, разделы 4.3.2. и 4.3.3.). Полученные значения приведены в таблице 1. Измерение коэффициентов экстинкции и квантовых выходов позволило рассчитать относительную яркость (RB) белков (см. табл. 1). Видно, что при введении замены S205V в EGFP за счет снижения квантового выхода и коэффициента экстинкции рассчитанная RB мутантных вариантов снижается на два порядка величины (в 50 – 100 раз).

**Таблица 1.** Некоторые свойства полученных мутантов EGFP.  $\epsilon_{an}$  – коэффициент экстинкции анионной формы хромофора белка. QY – квантовый выход флуоресценции. RB – относительная яркость белка\*.

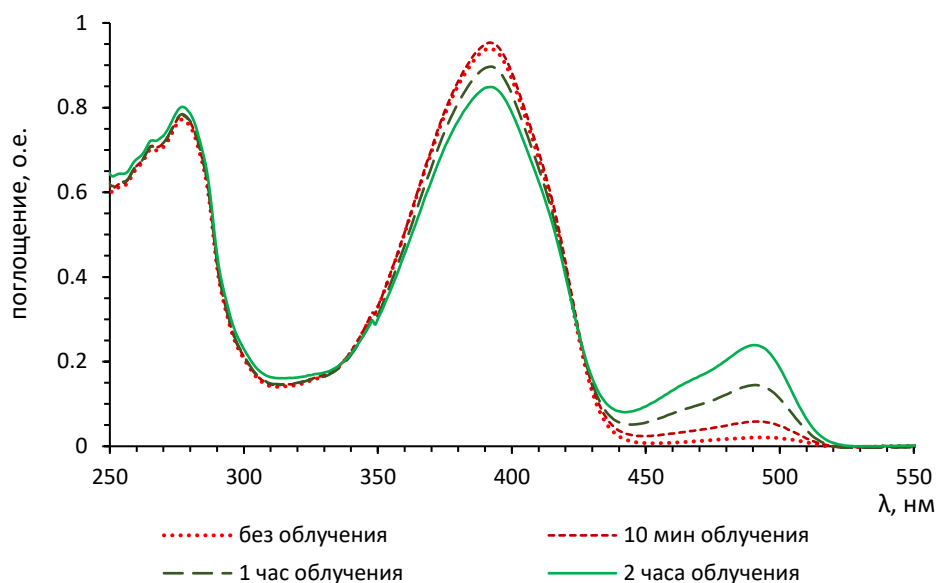
белок	$\lambda_{возб}$ , нм	$\lambda_{эмиссии}$ , нм	$\epsilon_{an}$ , $M^{-1}cm^{-1}$	QY	RB
EGFP	488	509	55000	0,60	1
EGFP-Y145L	397/489	509	10400	0,52	0,16
EGFP-Y145L/E222G	483	509	65000	0,36	0,69
EGFP-Y145L/S205V	400/501	516	2400	0,20	0,01
EGFP-Y145L/S205V/E222G	394/496	515	2100	0,30	0,02

\* Для EGFP показан абсолютный квантовый выход, для мутантов показаны квантовые выходы, измеренные относительно EGFP с тем же поглощением (см. *Материалы и методы*). Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP.

Как было отмечено ранее, для всех мутантных вариантов с заменой S205V характерно практически полное отсутствие пика поглощения, характерного для анионной формы хромофора, а также наличие выраженного пика при 400 нм, то есть хромофор у таких мутантных вариантов находится практически полностью в протонированном состоянии. Похожая форма спектра поглощения характерна для некоторых фотоактивируемых флуоресцентных белков (например, PA-GFP, близкого гомолога EGFP), до фотоактивации во флуоресцентное состояние.

Исходя из этого мы предположили, что мутантные варианты, содержащие замену S205V, способны к фотоактивации при облучении фиолетовым (около 400 нм) светом. Для проверки данного предположения мы проводили фотоактивацию тройного мутанта, облучая раствор белка в кювете интенсивным светом длиной волны 405 нм в течение двух часов с использованием водяного экрана (чтобы избежать тепловой денатурации белка). В

промежутках между раундами облучения измеряли спектр поглощения препарата. Полученные спектры представлены на рисунке 30.



**Рис. 30.** Спектры поглощения тройного мутанта EGFP-Y145L/S205V/E222G, полученные при фотоактивации препарата белка. Фотоактивацию проводили, облучая препарат белка коротковолновым (405 нм) интенсивным ( $5,6 \text{ Вт/см}^2$ ) светом.

Результаты эксперимента свидетельствуют о том, что облучение фиолетовым (405 нм) светом действительно приводит к изменению соотношения пиков поглощения при 400 и 488 нм, то есть к последовательному переходу хромофора из протонированного нефлуоресцентного в депротонированное флуоресцентное состояние. Подобные спектральные изменения характерны для белка PA-GFP. Фотоактивация этого белка объясняется изменением состояния протонирования хромофора, в результате комбинированных эффектов замещения T203N (гистидин формирует стэкинг-взаимодействие с хромофором) и фотохимической деградации Glu222 [86].

Вероятно, способность к фотоактивации характерна и для остальных мутантных вариантов, содержащих замену S205V. Однако каков её механизм (и аналогичен ли он таковому для PA-GFP) неясно, и для установления деталей этого процесса требуются дополнительные исследования, не входящие в план данного проекта.

Таким образом, попытка устранить протонирование хромофора была успешной лишь частично. По соотношению яркости и фотостабильности мутант Y145L остаётся наиболее интересным из полученных. Однако недостатки этого маркера побуждают к более тщательному подбору оптимальных заместителей для ключевого 145 положения. В этой связи мы решили применить метод насыщающего мутагенеза по 145 положению с

целью поиска новых вариантов белка, перспективных с точки зрения яркости флуоресценции и фотостабильности, а также провести ряд замен по положениям 65 и 165, чье влияние на хромофор EGFP и участие в окислительно-восстановительных процессах также известно из экспериментальных и литературных данных.

#### **5.2.4. Мутанты EGFP по 145 положению**

При помощи сайт-направленного мутагенеза мы провели замены тирозина-145 в EGFP на все генетически кодируемые аминокислоты (т.н. насыщающий мутагенез). Первичный отбор мутаций мы осуществляли по яркости бактериальных колоний на следующий день после трансформации плазмидной ДНК. В результате из 18 мутантов (ранее полученные Y145L и Y145F здесь не учтены) мы отобрали 10. Остальные 8 замен приводили к существенному снижению яркости и скорости “созревания” хромофора, поэтому были исключены из дальнейшего исследования.

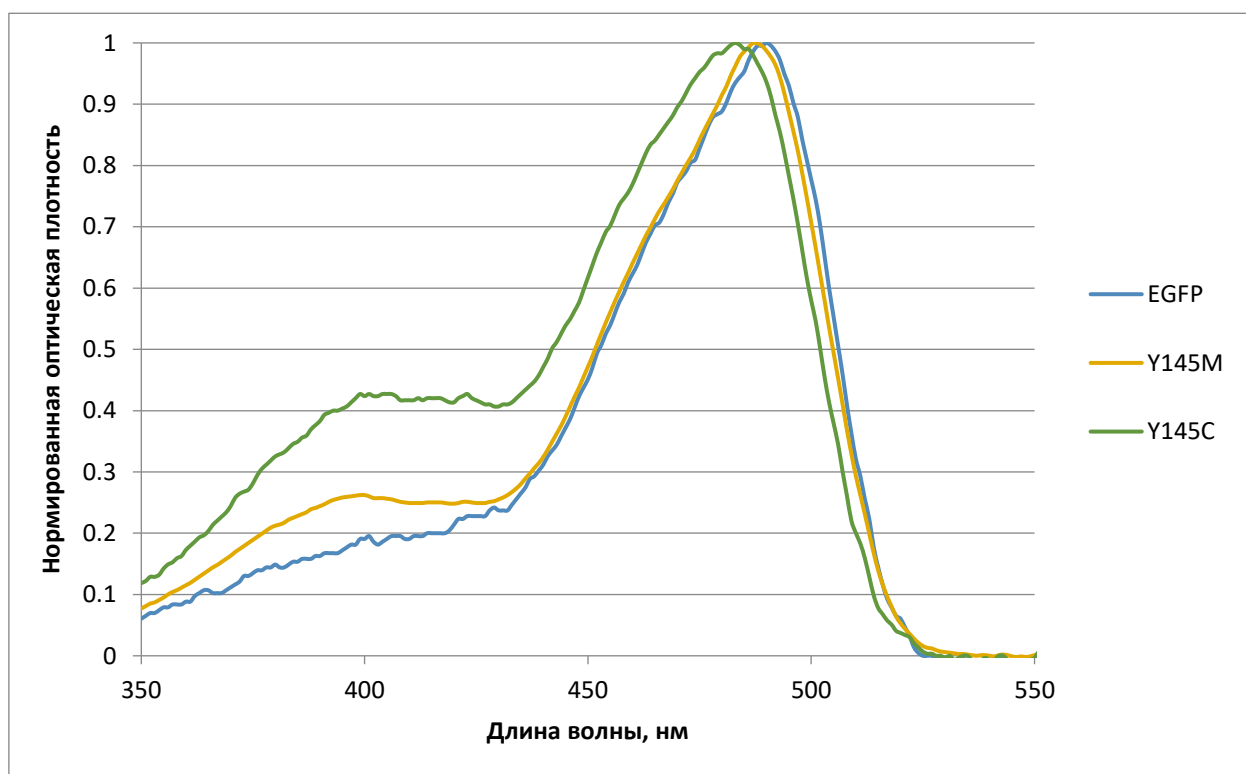
Мы измерили коэффициенты экстинкции и квантовые выходы флуоресценции полученных мутантов, а также рассчитали их относительную яркость. После чего были проведены эксперименты по изучению фотостабильности *in vitro* на иммобилизованных белках без окислителя и с одноэлектронным окислителем (феррицианом калия), а также в клеточной среде DMEM, где преобладают двухэлектронные окислители. Результаты представлены в таблице 2.

**Таблица 2.** Параметры полученных мутантов EGFP. EC - коэффициент экстинкции, QY - квантовый выход, RB - относительная яркость, RP - относительная фотостабильность\*.

Белок	EC, М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	QY	RB	RP в PBS, <i>in vitro</i>	RP в PBS с окислителем (500 мкМ К <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]), <i>in vitro</i>	RP в DMEM, <i>in vitro</i>
EGFP	55000	0,6	1	1	1	1
Y145Q	53100	0.60	0.97	0.54	1.01	1.08
Y145H	45600	0.73	1.01	0.42	4.42	0.67
Y145M	46100	0.65	0.91	0.64	2.63	1.67
Y145S	55100	0.59	0.99	0.24	0.42	0.92
Y145C	35500	0.62	0.67	0.4	3.68	2.25
Y145A	52900	0.61	0.98	0.27	0.42	0.75
Y145T	52700	0.54	0.86	0.38	0.94	1.27
Y145G	45300	0.36	0.50	0.24	1	0.62
Y145K	36500	0.54	0.6	0.3	0.63	0.65
Y145N	48400	0.68	0.99	0.2	0.33	0.82

\* Для EGFP показан абсолютный квантовый выход, для мутантов показаны квантовые выходы, измеренные относительно EGFP с тем же поглощением (см. Материалы и методы). Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP. Относительная фотостабильность - это время полубесцвечивания интересующего ФБ по сравнению с EGFP, облученном при тех же условиях.

Полученные мутанты характеризовались широким разбросом по фотостабильности и относительной яркости. Часть замен не приводила к каким-либо существенным отличиям от EGFP (Y145Q, Y145T). Некоторые замены приводили к существенному снижению относительной яркости и фотостабильности (Y145G и Y145K). Замены Y145N и Y145A сохраняли яркость, близкую к EGFP, однако обладали существенно сниженной фотостабильностью во всех средах, а замена Y145S характеризовалась снижением фотостабильности в PBS и в присутствии феррицианида. Замена Y145H не приводила к снижению яркости по сравнению с EGFP, однако этот мутант был фотостабилен только в присутствии феррицианида, а в других тестовых условиях значительно уступал EGFP по фотостабильности. Руководствуясь критерием сочетания высокой относительной яркости и фотостабильности в различных условиях, мы отобрали два интересных мутанта EGFP: Y145M, Y145C. На рисунке 31 представлены спектры поглощения полученных мутантов.



**Рис. 31.** Спектры поглощения белков EGFP, EGFP-Y145M и EGFP-Y145C. Максимум анионной формы хромофора – 488 нм, максимум нейтральной формы – 400 нм.

У обоих мутантов большая часть хромофора находится во флуоресцирующей депротонированной форме.



### 5.2.5. Мутанты EGFP по 65 и 165 положению

Теоретические расчеты путей переноса электрона внутри белковой глобулы EGFP, проведённые в лаборатории проф. А. Крыловой (США), показали, что остаток Phe165 может играть роль второстепенного акцептора при светоиндуцированном переносе электрона. Кроме того, ранее полученные в нашей лаборатории результаты экспериментов указывают на существенное влияние хромофоробразующего остатка Thr65 на фотостабильность EGFP.

При помощи сайт-направленного мутагенеза мы провели замены треонина-65 на глицин и фенилаланина-165 на лизин, гистидин, изолейцин и тирозин. При подборе заместителей по 165 положению мы руководствовались двумя критериями: молекулярным объёмом остатка и его способностью к переносу электрона. Выбираемые остатки должны быть либо близки к исходному фенилаланину, либо существенно отличаться от него по каждому из двух критериев (Lys – отличается по размеру, не переносит электрон; His – отличается по размеру, переносит электрон, Ile – близок по размеру, не переносит электрон, Tyr – близок по размеру, переносит электрон). Первичный отбор мутантов мы осуществляли по яркости бактериальных колоний на следующий день после трансформации плазмидной ДНК. Мутант с заменой F165K был чрезвычайно тусклым и с существенно сниженной скоростью «созревания» хромофора и был исключен из дальнейшего исследования.

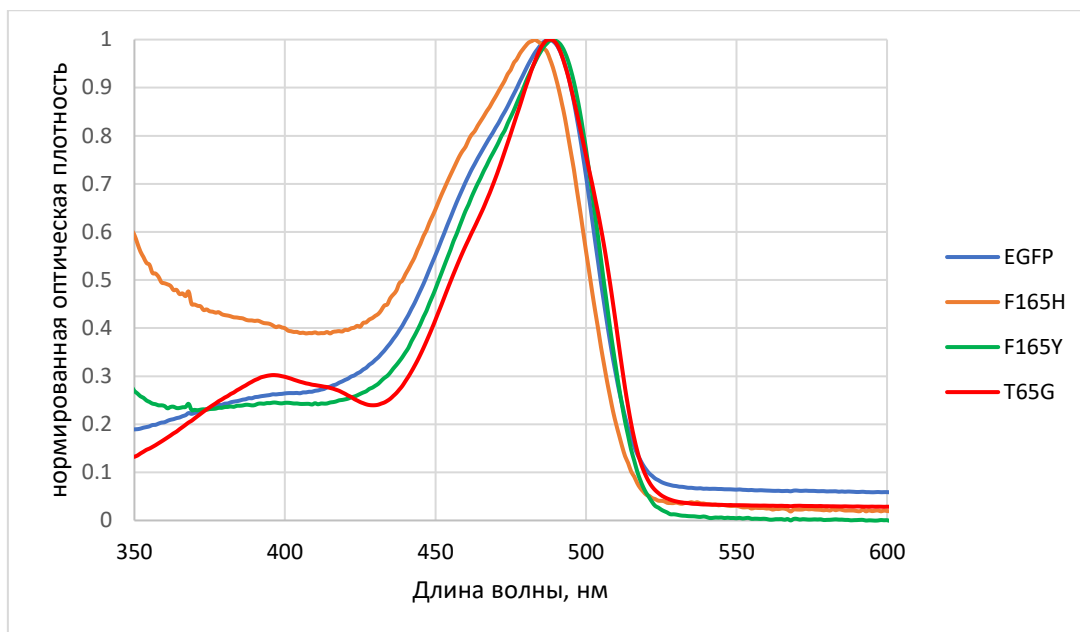
Мы измерили коэффициенты экстинкции и квантовые выходы флуоресценции полученных мутантов, а также рассчитали их относительную яркость. После чего были проведены эксперименты по изучению фотостабильности *in vitro* на иммобилизованных белках без окислителя и с одноэлектронным окислителем, а также в клеточной среде DMEM, где преобладают двухэлектронные окислители. Результаты представлены в таблице 3.

**Таблица 3.** Параметры полученных мутантов EGFP. *EC* - коэффициент экстинкции, *QY* - квантовый выход, *RB* - относительная яркость, *RP* - относительная фотостабильность.\*

Белок	EC, М <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup>	QY	RB	RP в PBS, <i>in vitro</i>	RP в PBS с окислителем (500 мкМ K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]), <i>in vitro</i>	RP в DMEM, <i>in vitro</i>
EGFP	55000	0.6	1	1	1	1
F165H	40600	0.68	0.84	0.13	0.41	0.58
F165I	55100	0.46	0.77	0.62	0.31	1
F165Y	55600	0.57	0.96	0.37	0.69	2.53
T65G	70000	0.06	0.13	1.8	1.87	2.44

\*Для EGFP показан абсолютный квантовый выход, для мутантов показаны квантовые выходы, измеренные относительно EGFP с тем же поглощением (см. Материалы и методы). Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP. Относительная фотостабильность - это время полубесцвечивания интересующего ФБ по сравнению с EGFP, облученном при тех же условиях.

Замена F165I приводила к существенному снижению скорости “созревания” хромофора, поэтому соответствующий мутант был исключен из дальнейшего исследования. На рисунке 32 представлены спектры возбуждения полученных мутантов.



**Рис. 32.** Спектры поглощения белков EGFP, EGFP-F165H, EGFP-F165Y и EGFP-T65G. Максимум анионной формы хромофора – 488 нм, максимум нейтральной формы – 400 нм.

Спектры полученных белков близки к спектру поглощения EGFP. У F165H наблюдается неспецифическое поглощение в диапазоне 370-420 нм (мы связываем его с присутствием в образце нерастворимых частиц, рассеивающих свет), также детектируется небольшое плечо депротонированного хромофора у мутанта T65G. Спектры эмиссии и возбуждения флуоресценции соответствуют таковым у EGFP (не показаны).

Внесенные нами замены привели к интересным результатам. Так, замена F165H существенно снизила фотостабильность мутанта за счет некоего альтернативного механизма фотообесцвечивания, изучение которого выходит за рамки диссертации, а замены F165K и F165I весьма негативно повлияли на скорость созревания хромофора. По результатам всех проведенных экспериментов мы выбрали мутанты F165Y и T65G как наиболее яркие и/или фотостабильные, для дальнейшего перекрестного мутагенеза с мутантами по 145 положению.

### 5.2.6. Двойные и тройные мутанты EGFP по положениям 65, 145, 165

Мы скомбинировали полученные замены F165Y и T65G с заменами Y145M и Y145C, рассчитывая, что некоторые двойные или тройные мутанты будут обладать улучшенными характеристиками. Результаты изучения спектральных свойств и фотостабильности в различных условиях при широкопольной микроскопии представлены в таблице 4. Первый полученный мутант, содержащий замену Y145C (Y145C/F165Y), при измерении фотостабильности демонстрировал фотоактивацию (увеличение интенсивности флуоресценции). Эта особенность затрудняет анализ его свойств и применение как

традиционного флуоресцентного маркера, поэтому данная комбинация замен была исключена из дальнейших исследований.

*Таблица 4. Параметры полученных мутантов EGFP. EC - коэффициент экстинкции, QY - квантовый выход, RB - относительная яркость, RP - относительная фотостабильность.\**

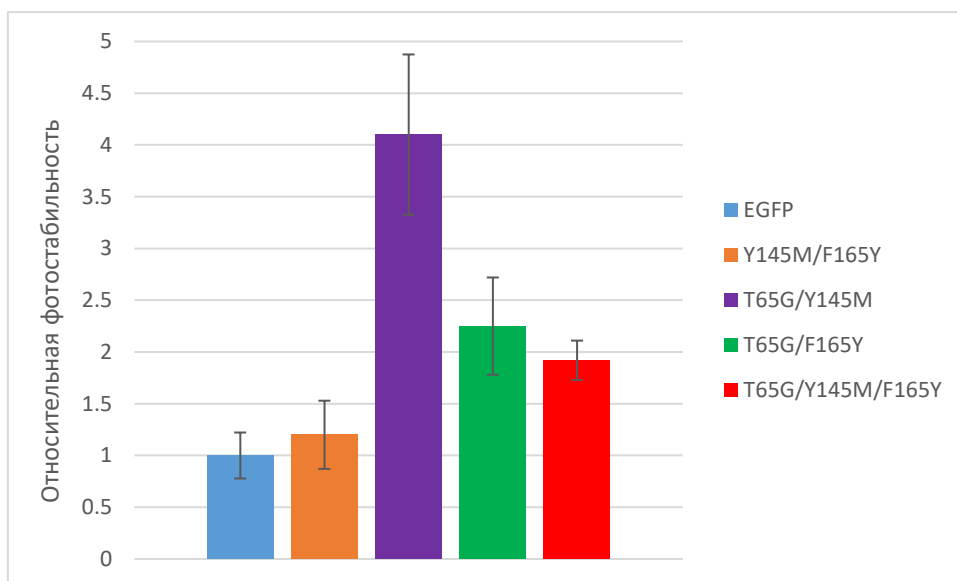
Белок	EC, M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	QY	RB	RP в PBS, <i>in vitro</i>	RP в PBS с окислителем (500 мкМ K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]), <i>in vitro</i>	RP в DMEM, <i>in vitro</i>
EGFP	55000	0,6	1	1	1	1
Y145M/ F165Y	56300	0.72	1.23	0.31	1.3	1.19
Y145C /F165Y	61200	0.33	0.62	0.81	6.7	1.69
T65G /Y145M	84500	0.08	0.20	1.75	15.6	4.06
T65G /F165Y	84000	0.20	0.51	0.81	1.04	2.25
T65G /Y145M /F165Y	86000	0.30	0.78	1.77	7.6	1.92

\* Для EGFP показан абсолютный квантовый выход, для мутантов показаны квантовые выходы, измеренные относительно EGFP с тем же поглощением (см. Материалы и методы). Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP. Относительная фотостабильность - это время полубесцвечивания интересующего ФБ по сравнению с EGFP, облученном при тех же условиях.

Как следует из полученных результатов (табл. 4), наибольшей фотостабильностью во всех тестовых условиях обладал мутант T65G/Y145M, однако снижение квантового выхода его флуоресценции почти на порядок величины приводит к существенной потере яркости. По всей видимости, за уменьшение квантового выхода ответственна замена T65G. Стоит также отметить высокие значения коэффициентов экстинкции мутантов,

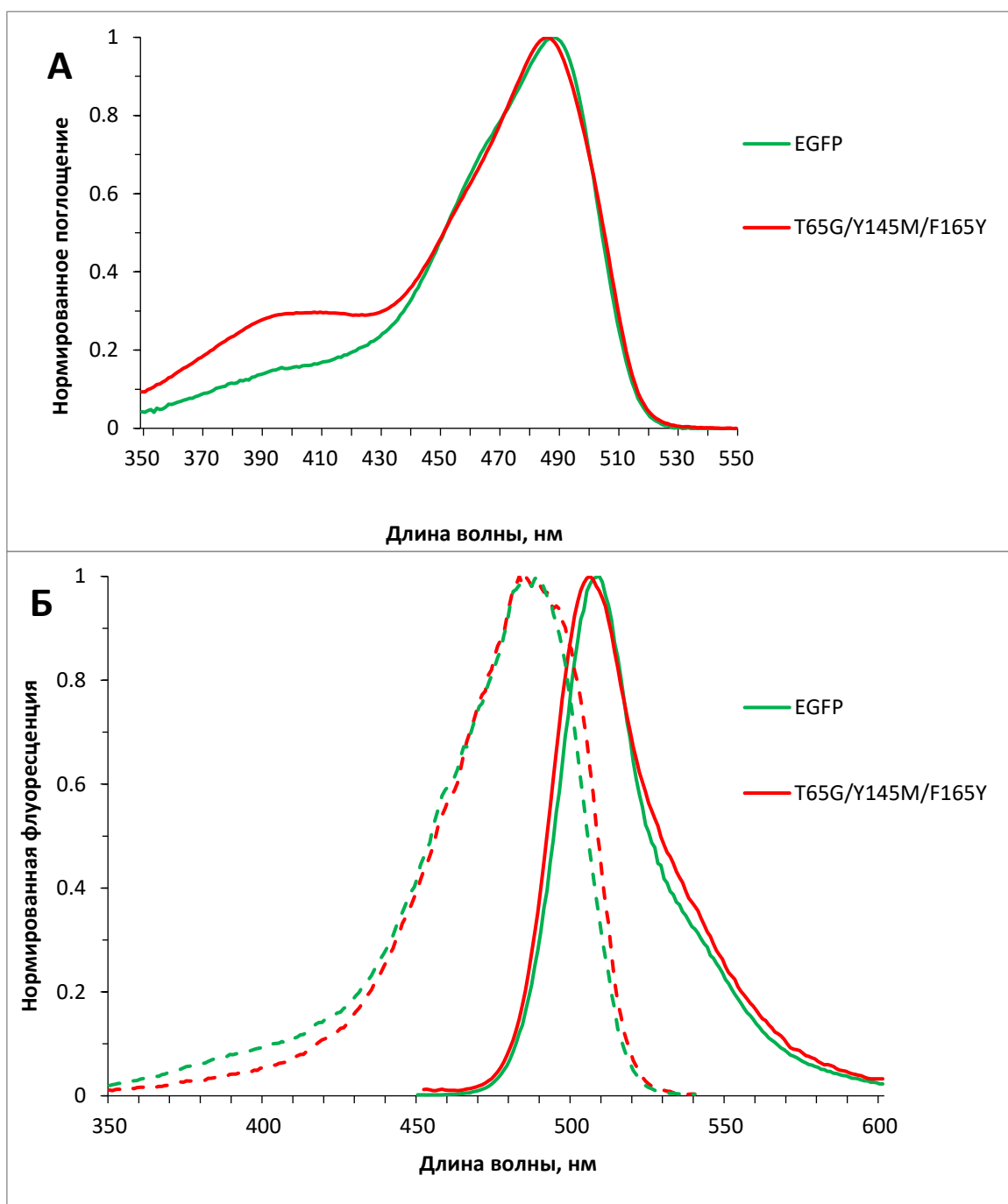
содержащих эту замену. Замена же F165Y, по-видимому, компенсирует снижение квантового выхода, обусловленное мутацией T65G.

Мы провели изучение фотостабильности мутантов, содержащих замены T65G, Y145M, F165Y в клетках НЕК293Т, результаты представлены на рис. 33.



**Рис. 33.** Увеличение фотостабильности (времени полубесцвечивания) мутантов EGFP по сравнению с EGFP (его фотостабильность принята за 1) при широкопольной микроскопии живых клеток НЕК293Т. Показаны значения стандартного отклонения для 30-40 клеток в трех независимых экспериментах.

Наиболее фотостабильным из полученных является мутант EGFP-T65G/Y145M, однако сравнительно низкий квантовый выход флуоресценции этого белка ограничивает его использование в микроскопии. По совокупности яркости и фотостабильности наибольший интерес представляет тройной мутант T65G/Y145M/F165Y. На рисунке 34 представлены спектры поглощения, возбуждения и эмиссии флуоресценции данного белка. Форма спектра поглощения свидетельствует о том, что хромофор находится по большей части в депротонированном состоянии, а спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции соответствуют таковым у исходного белка EGFP.



**Рис. 34.** Спектры поглощения и флуоресценции очищенного препарата белка EGFP и EGFP-T65G/Y145M/F165Y. А. Спектры поглощения (максимум поглощения – 488 нм); Б. Спектры возбуждения (слева, пунктир) и эмиссии (справа, сплошная линия) флуоресценции. Максимум возбуждения – 488 нм, максимум эмиссии – 510 нм.

Комбинируя замены по двум и трем положениям, нам удалось получить перспективные новые мутанты, в том числе сочетающие высокую яркость и фотостабильность. Кислотное равновесие хромофора у данных мутантов сдвинуто в сторону депротонирования, а фотостабильность в некоторых случаях до 15 раз выше, чем у EGFP.

### 5.3. ТРОЙНОЙ МУТАНТ EGFP КАК МЕТКА ДЛЯ FLIM-МИКРОСКОПИИ

У некоторых полученных нами мутантов наблюдался заметно сниженный квантовый выход флуоресценции при быстром «созревании» хромофора и высоком коэффициенте молярной экстинкции. В частности, относительно низкий квантовый выход и высокий коэффициент экстинкции мутантов EGFP, содержащих замену T65G, позволили нам сделать предположение о том, что время жизни флуоресценции данных белков может быть короче, чем у исходного EGFP. Контраст по времени жизни флуоресценции открывает перспективы использования этих мутантов в качестве меток для микроскопии времён жизни флуоресценции (FLIM). Данный современный метод визуализации использует временной домен вместо спектрального, позволяя в одном спектральном канале визуализировать несколько меток, обладающих разными временами жизни флуоресценции [15], [86]. Для того, чтобы проверить предположение о природе снижения квантовых выходов, мы провели измерения времени жизни флуоресценции ряда полученных нами мутантов как *in vitro*, так и *in cellulo*.

Мы начали с измерения времён жизни флуоресценции очищенных препаратов EGFP, EGFP-T65G, T65G/Y145M и T65G/Y145M/F165Y при возбуждении двухфотонным лазером ( $\lambda=900$  нм; измерения проводились в капле раствора белка, нанесённой на предметное стекло). Время жизни флуоресценции EGFP составило около 2,8 нс (см. табл. 5), что близко к литературным значениям для этого флуорофора [87], [88]. Все три мутанта продемонстрировали более короткие времена (таблица 5).

**Таблица 5.** Спектральные свойства и времена жизни флуоресценции EGFP и его мутантов. \*

ФБ	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , нм	EC, $M^{-1}cm^{-1}$	QY	RB, %	FL, пс	RP, %	
						<i>in vitro</i>	<i>in cellulo</i>
EGFP	489/509	55000	0.60	100	2800±70	100±8	100±20
T65G	488/508	70000±1500	0.06±0.01	13±2	1320±30	180±25	240±63
T65G/ Y145M	484/508	84500±1400	0.08±0.01	20±3	820±8	175±12	700±280
T65G/ Y145M/ F165Y	487/509	86000±1200	0.30±0.04	78±12	820±5	190±4	230±45

\* Для EGFP показан абсолютный квантовый выход, для мутантов показаны квантовые выходы, измеренные относительно EGFP с тем же поглощением (см. Материалы и методы). Относительная яркость рассчитывается как произведение молярного коэффициента экстинкции и квантового выхода флуоресценции и дается по сравнению с яркостью EGFP. Относительная фотостабильность – это время полубесцвечивания интересующего ФБ по сравнению с EGFP, облученного в тех же условиях. Левый столбец соответствует фотостабильности *in vitro* очищенного белка в PBS, правый – фотостабильности в клетках HEK293T, экспрессирующих интересующий ФБ.

Так, EGFP-T65G обладал  $\tau$ -1,3 нс (табл. 5), а T65G/Y145M и T65G/Y145M/F165Y – около 800 пс. Примечательно, что роль хромофоробразующего глицина (G65) в сокращении времени жизни флуоресценции GFP-подобных белков описана в литературе [85]. Судя по результатам наших измерений, замена Y145M, внесённая дополнительно к T65G, дополнительно сокращает время жизни флуоресценции. Интересно, что мутанты с одиночной заменой Y145M и двойной заменой Y145M/F165Y характеризуются  $\tau$  3 и 2,6 нс, соответственно (в таблице не показаны). Мутант EGFP T65G/Y145M, напомним, обладает небольшим квантовым выходом (около 0,08; табл. 4 и 5), что весьма характерно для флуорофоров с коротким временем жизни флуоресценции. Тройной же мутант T65G/Y145M/F165Y отличается одновременно высокой яркостью (~80% от EGFP, QY =



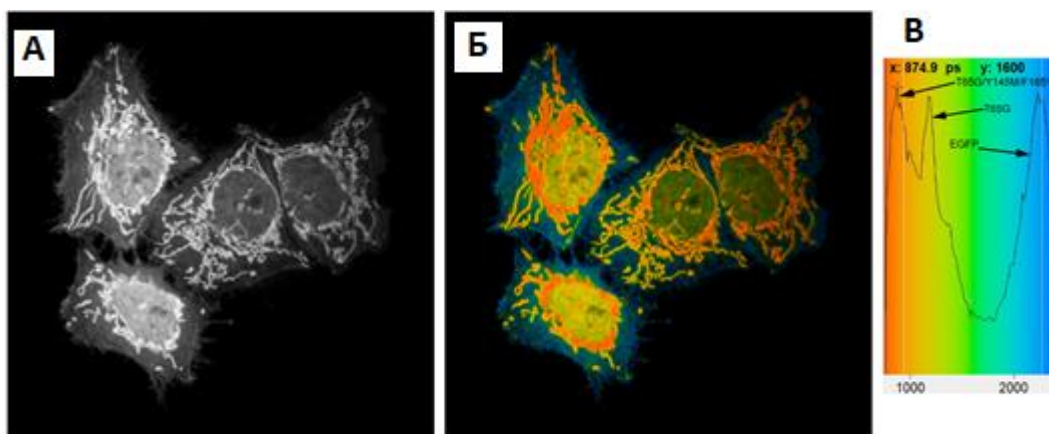
0,3,  $EC = 86000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) и коротким временем жизни флуоресценции, табл. 5). Кривые затухания флуоресценции показаны в Приложении 7.4.

Такое сочетание флуоресцентных характеристик с одной стороны делает этот мутант потенциально привлекательной меткой для FLIM-визуализации, с другой – является уникальным среди описанных флуоресцентных белков (ФБ). Время жизни флуоресценции большинства ФБ находится в пределах от 2,3 до 3,5 нс, хотя были зафиксированы экстремальные значения от 0,7 до более 5,1 нс [87]. Важно отметить, что время жизни обычно почти линейно пропорционально квантовому выходу флуоресценции<sup>6</sup>. Таким образом, ФБ с временем жизни <1,0 нс обладают низким (<0,1) квантовым выходом флуоресценции. Например, mGarnet2 и TagRFP675 – ФБ с наименьшими временами жизни флуоресценции, зарегистрированными до настоящего времени (760 и 900 пс, соответственно) и красной эмиссией, имеют квантовый выход менее 10% [89], [90]. Кроме того, в литературе мы не встретили описания флуоресцентных белков с субнаносекундными временами жизни, испускающих в других областях спектра, за исключением отдельных чрезвычайно тусклых мутантов или даже хромобелков [91]. Низкая яркость флуоресценции таких меток усложняет их применение в многопараметрической FLIM.

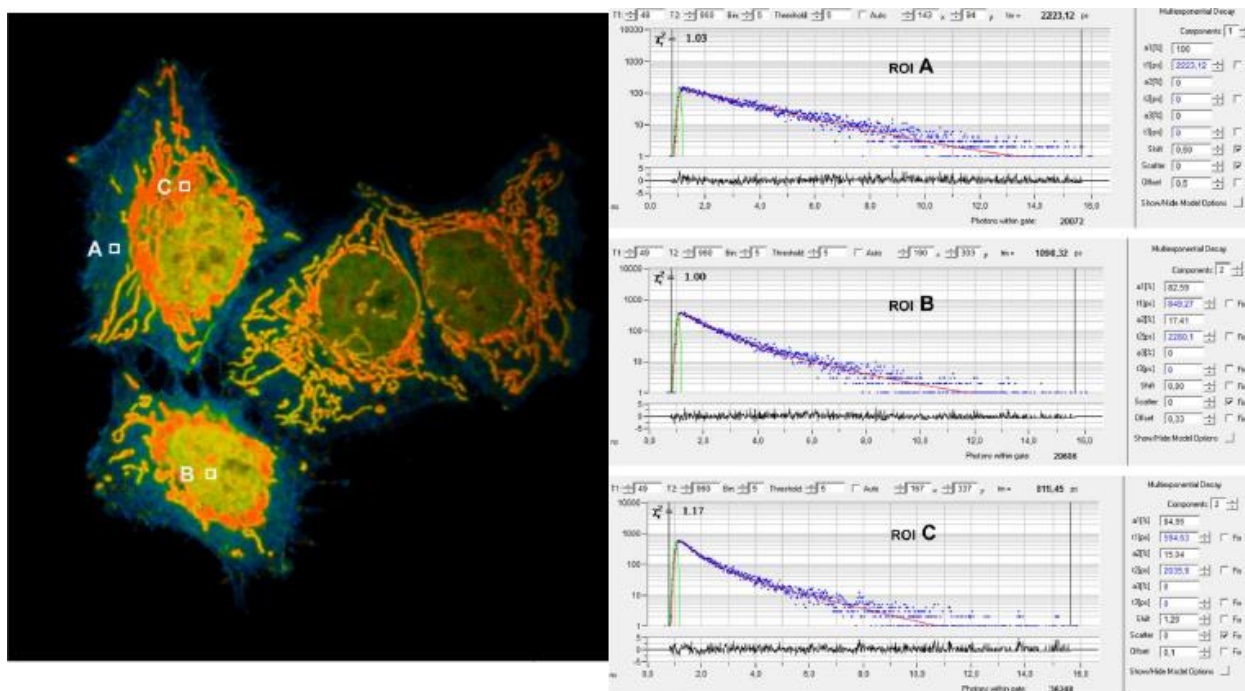
Итак, мутант EGFP T65G/Y145M/F165Y характеризуется субнаносекундным временем жизни при сравнительно высокой яркости флуоресценции. Чтобы проверить его практическую ценность для многопараметрического FLIM в зеленом канале, были выбраны три белка с близкими спектрами эмиссии и разными временами жизни флуоресценции: EGFP (2,8 нс), EGFP-T65G (1,3 нс) и собственно T65G/Y145M/F165Y (0,8 нс). На основе кодирующих последовательностей их генов были созданы химерные генетические конструкции, обеспечивающие экспрессию трёх указанных маркёров в разных компартментах эукариотической клетки: EGFP-актин – в цитоплазме, T65G-гистон H2B – в ядре и T65G/Y145M/F165Y – в митохондриях (рис. 35 и 36). Обладая практически одинаковыми спектрами эмиссии флуоресценции, выбранные ФБ не могут быть надёжно различимы с помощью обычной флуоресцентной микроскопии, однако в FLIM они были визуализированы как независимые метки (рис. 35, 36).

---

<sup>6</sup> (<http://www.fpvis.org/FP.html>)



**Рис. 35.** Флуоресцентная микроскопия и микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции живых клеток *HeLa*, экспрессирующих EGFP-актин (главным образом в цитоплазме,  $T_m \sim 2,3$  нс), EGFP T65G-гистон 2B (в ядре,  $T_m \sim 1,3$  нс), EGFP T65G / Y145M / F165Y-mito (в митохондриях,  $T_m \sim 0,8$  нс). (A) Изображение интенсивности флуоресценции в оттенках серого, (Б) комбинированная интенсивность + изображение времени жизни флуоресценции, где яркость представляет собой количество фотонов, а цвет – среднее время жизни флуоресценции, (B) условное обозначение цвета для изображения времени жизни флуоресценции с гистограммой распределения времени жизни флуоресценции (диапазон составляет 780-2350 пс). Для получения этих изображений использовалось однофотонное возбуждение флуоресценции при 488 нм.



**Рис. 36.** Данные падения флуоресценции и анализ данных изображений для живых клеток HeLa при FLIM. Верхняя панель показывает выборку из 3 ROI (5x5 пикселей, A - цитоплазматический, B-ядерный, C-митохондрии). Ниже приведены скриншоты из окна сбора и анализа данных Becker & Hickl SPCImage для каждого показанного ROI. Синие точки основного графика представляют собой данные экспериментального падения флуоресценции красная линия показывает экспоненциальную аппроксимацию данных, зеленая кривая – аппаратная функция (IRF). Дополнительный график в нижней части каждого снимка экрана показывает остаточные погрешности аппроксимации. В ROI A одноэкспоненциальная аппроксимация ( $\tau \sim 2.2$  нс) хорошо описывает экспериментальные данные, указывая на наличие единственного сигнала EGFP-актин. В ROI B и C двухкомпонентная модель обеспечивает более подходящее описание, позволяющее отделить сигнал EGFP-актин ( $\tau_2 \sim 2,2$  нс) от более коротких сигналов T65G ( $\tau_1 \sim 0,85$  нс, ядро) и T65G/Y145M/F165Y ( $\tau_1 \sim 0,6$  нс, митохондрии).

Мы обнаружили существенную разницу в значениях времени жизни флуоресценции всех проанализированных белков *in cellulo* по сравнению с выделенным белком (2,2 против 2,8 нс для EGFP, 0,85 против 1,3 нс для T65G и 0,6 против 0,8 нс для T65G/Y145M/F165Y) Похожее изменение времени жизни флуоресценции в клетках было описано для EGFP и некоторых других ФБ [87], [92], [93]. Различия в экспериментальных

значениях времени жизни флуоресценции одного и того же флуорофора могут быть отнесены и к аппаратным особенностям различных систем визуализации.

Чтобы адекватно интерпретировать конкретные роли введенных аминокислотных замен и приблизиться к формированию гипотезы, надёжно объясняющей наблюдаемые взаимосвязи между временем жизни флуоресценции и квантовым выходом в описанных мутантах, необходимы как сложные дополнительные эксперименты, так и теоретические вычисления. На данном этапе мы можем лишь предположить, что мутации существенно изменили равновесие между безызлучательными процессами в возбужденном состоянии (такими как перенос электрона и/или изменение конформации хромофора) и излучательной релаксацией возбуждённого состояния. Принимая во внимание уравнения

$$\Phi = \frac{k_r}{k_r + k_{nr}} \quad \tau = \frac{1}{k_r + k_{nr}}$$

, связывающие квантовый выход и экспериментальное время жизни

флуоресценции через константы скоростей излучательных и безызлучательных процессов (квантовый выход флуоресценции -  $\Phi$ , и время жизни флуоресценции -  $\tau$ , константы скорости излучательных -  $k_r$  - и безызлучательных -  $k_{nr}$  - процессов в возбужденном состоянии флуорофора), можно в первом приближении рассчитать эти константы для EGFP и его тройного мутанта. Так,  $k_r$  в EGFP примерно в два раза, а  $k_{nr}$  - в 6 раз ниже, чем соответствующие константы скорости в T65G/Y145M/F165Y.

Отметим также, что мутант EGFP-T65G/Y145M/F165Y, получивший название BrUSLEE (Bright Ultimately Short Lifetime Enhanced Emitter), не только является удачной меткой для многопараметрического FLIM, но и открывает возможность к использованию высокой частоты повторений (> 80 МГц) источника возбуждения для более быстрой визуализации [94]. Флуоресцентные свойства BrUSLEE нарушают стереотип о жёсткой связи между короткими временами жизни и низкими квантовыми выходами флуоресценции в флуоресцентных белках и призывают к разработке новых ярких субнаносекундных ФБ разных цветов.

## 6. ВЫВОДЫ

1) Рутин сохраняет активность при длительном хранении в растворе DMSO на комнатной температуре и в водном растворе при глубокой заморозке. Оптимальная концентрация рутина при флуоресцентной микроскопии – около 20 мг/л.

2) а) Рутин не оказывает влияние на фотостабильность ряда зеленых флуоресцентных белков (copGreen, copGreen2, TagGFP2 и Emerald) и в 1,5 раза увеличивает фотостабильность белка mEmerald.

б) Рутин увеличивает фотостабильность EGFP в среде RPMI1640 в 2,5 раза, но не влияет на фотообесцвечивание в среде F12, которая обеспечивает восьмикратный прирост фотостабильности EGFP (по сравнению с DMEM).

Тестирование различных веществ, входящих в F12 показало, что композит из цианокобаламина, липоевой кислоты, тимидина и гипоксантина способен увеличивать фотостабильность EGFP в среде DMEM в 2 раза. Также выявлена роль FeSO<sub>4</sub>, который увеличивает фотостабильность EGFP в 2 раза, причем его эффект наблюдается только в экспериментах с живыми клетками.

3) Условия культивирования клеток НЕК293 существенно влияют на результаты экспериментов по измерению фотостабильности EGFP. Так, наблюдается положительная корреляция увеличения фотостабильности с ростом плотности культуры клеток и концентрации в культуральной среде фетальной сыворотки.

4) Предложены модельные механизмы первичного процесса переноса электрона с возбуждённого хромофора EGFP: туннелирование и «скачкообразный» механизм. Для более вероятного «скачкообразного» механизма предсказаны промежуточные акцепторы электронов – Tyr145 и Phe165. Экспериментальная проверка подтвердила ключевую роль остатка Tyr145: мутант EGFP-Y145L обладал повышенной (до 80 раз) фотостабильностью.

5) Комбинирование мутаций по теоретически предсказанным положениям (145, 165), а также по хромофоробразующему треонину-65 позволило получить ряд перспективных мутантов EGFP с высокими коэффициентами экстинкции и увеличенной фотостабильностью (до 15 раз *in vitro*, до 7 раз *in cellulo*). Среди них мутант

T65G/Y145M/F165Y, в котором сочетается высокая яркость и короткое время жизни флуоресценции, является перспективной меткой для FLIM-микроскопии.

## 7. ПРИЛОЖЕНИЯ

### 7.1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ala – аланин

Arg – аргинин

Asn – аспарагин

АТФ – аденозинтрифосфат

Cys – цистеин

DMEM – Dulbecco`s modified Eagle medium

DMSO - диметилсульфоксид

EGFP – enhanced green fluorescent protein

EYFP – enhanced yellow fluorescent protein

ELISA - Enzyme-linked immuno sorbent assay, иммуноферментный анализ

ET – electron transport, перенос электрона

FAD – флавинадениндинуклеотид

FMN – флавинмоноклеотид

Glu – глутаминовая кислота

Gly – глицин

Ile – изолейцин

Lys – лизин

Met – метионин

NAD<sup>+</sup>, NADH – никотинамидадениндинуклеотид, его окисленная и восстановленная формы

NADP<sup>+</sup>, NADPH – никотинамидадениндинуклеотидфосфат, его окисленная и восстановленная формы

Phe - фенилаланин

Ser – серин

Tyr – тирозин

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ПААГ – полиакриламидный гель

РНК – рибонуклеиновая кислота

УФ – ультрафиолетовый свет

ФБ – флуоресцентные белки

## 7.2. ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ САЙТ-НАПРАВЛЕННОГО МУТАГЕНЕЗА

Название праймера	Последовательность праймера
Y145L-mutant_E222G_top	GTCCTGCTGGGCTTCGTGACC
Y145L-mutant_E222G_bottom	GGTCACGAAGCCCAGCAGGAC
EGFP-S205V-mutant_top	AGCACCCAGGTCGCCCTGAGC
EGFP-S205V-mutant_bottom	GCTCAGGGCGACCTGGGTGCT
EGFP_F165H_top	AAGGTGAACCACAAGATCCGC
EGFP_F165H_bottom	GCGGATCTTGTGGTTCACCTT
EGFP_F165Y_top	AAGGTGAACTACAAGATCCGC
EGFP_F165Y_bottom	GCGGATCTTGTAGTTCACCTT
EGFP_F165I_top	AAGGTGAACATCAAGATCCGC
EGFP_F165I_bottom	GCGGATCTTGATGTTACCTT
EGFP_F165K_top	AAGGTGAACA <del>AAA</del> AAGATCCGC
EGFP_F165K_bottom	GCGGATCTTTT <del>T</del> TGTTACCTT

Мутация	top_	bottom_
Y145I	GAGTACAACATCAACAGCCAC	GTGGCTGTTGATGTTGTACTC
Y145V	GAGTACAACGTGAACAGCCAC	GTGGCTGTTCACGTTGTACTC
Y145P	GAGTACAACCCTAACAGCCAC	GTGGCTGTTAGGGTTGTACTC
Y145T	GAGTACAACACCAACAGCCAC	GTGGCTGTTGGTGTGTACTC
Y145A	GAGTACAACGCCAACAGCCAC	GTGGCTGTTGGCGTTGTACTC



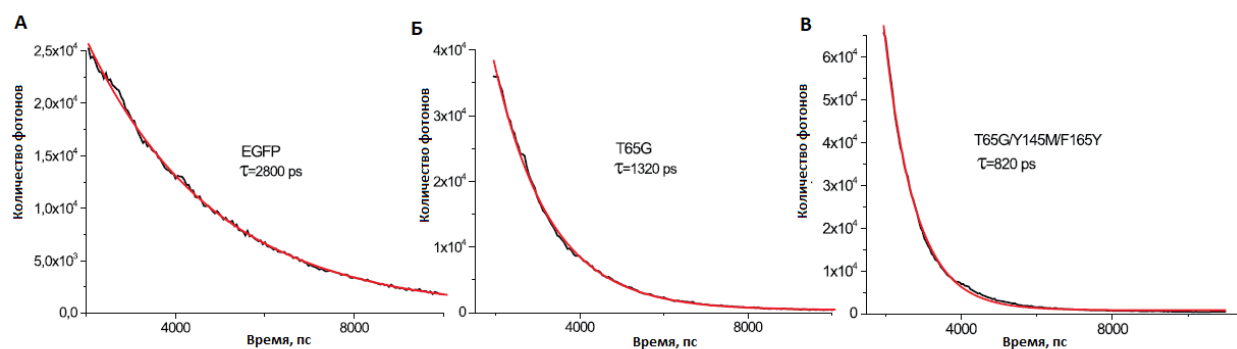
Y145M	GAGTACAAC <b>A</b> TGAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>C</b> ATGTTGTACTC
Y145H	GAGTACAAC <b>C</b> ACAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>G</b> TGGTTGTACTC
Y145Q	GAGTACAAC <b>C</b> AGAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>C</b> TGGTTGTACTC
Y145N	GAGTACAAC <b>A</b> ACAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>G</b> TTGTTGTACTC
Y145K	GAGTACAAC <b>A</b> AAAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>T</b> TTGTTGTACTC
Y145D	GAGTACAAC <b>G</b> ATAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>A</b> TCGTTGTACTC
Y145E	GAGTACAAC <b>G</b> AAAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>T</b> TCGTTGTACTC
Y145C	GAGTACAAC <b>T</b> GCAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>G</b> CAGTTGTACTC
Y145W	GAGTACAAC <b>T</b> GGAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>C</b> CAGTTGTACTC
Y145R	GAGTACAAC <b>C</b> GCAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>G</b> CGGTTGTACTC
Y145S	GAGTACAAC <b>A</b> GCAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>G</b> CTGTTGTACTC
Y145G	GAGTACAAC <b>G</b> GCAACAGCCAC	GTGGCTGTT <b>G</b> CCGTTGTACTC

### 7.3. ОТЛИЧИЯ В СОСТАВАХ СРЕД DMEM И HAM'S F12 (ПО «ПАНЭКО»)

Вещество	DMEM, мг/л	F12, мг/л
L-Ala	-	8,9
L-Arg	84,0	211,0
L-Asn	-	15,0
L-Asp	-	13,0
L-Cys	-	35,0
L-цистин	63,0	-
L-Glu	-	14,7
L-Met	30,0	4,5
L-Phe	66,0	5,0
L-Pro	-	34,5
L-Tyr	104,0	7,8
Биотин	-	0,07
Холин хлорид	4	14,0
Мио-инозитол	7,2	18,0
D-пантотонат Ca	4,0	0,5
Тиамин	-	-
CaCl <sub>2</sub>	200,0	33,2
MgSO <sub>4</sub>	97,67	-
MgCl <sub>2</sub>	-	57,22
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	108,7	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	142,0
CuSO <sub>4</sub>	-	0,003
FeSO <sub>4</sub>	0,07	0,83
ZnSO <sub>4</sub>	-	0,86
Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	-	-
Линолевая кислота	-	0,08
Путресцин	-	0,161
Липоевая кислота	-	0,21
B12	-	1,4
Тимидин		0,7

Гипоксантин	-	4,1
Рибофлавин	0,4	0,04
Пиридоксаль HCl	-	-
Пиридоксин HCl	4	0,06
Никотинамид	4	0,04

## 7.4. КРИВЫЕ ЗАТУХАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ



**Рис. 37.** Кривые затухания флуоресценции выделенного EGFP (А) и его мутантов (Б, В) регистрировались при двухфотонном возбуждении в водном растворе. Данные аппроксимировались моноэкспоненциальной функцией. Экспериментальные кривые падения показаны черным цветом, аппроксимация - красным. Времена жизни ( $\tau$ ) показаны под названиями белков.

## 8. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] A. Portu, M. Carpano, A. Dagrosa, R. L. Cabrini, and G. Saint Martin, “Qualitative autoradiography with polycarbonate foils enables histological and track analyses on the same section,” *Biotech. Histochem.*, vol. 88, no. 5, pp. 217–221, 2013.
- [2] B. W.L., “CHEM2015: Diffraction of X-rays by Crystals,” *Nobel Lect.*, p. CHEM2015 Lecture 2: Diffraction of X-rays by Cryst, 1922.
- [3] E. Jensen, “Technical Review: in situ hybridization.,” *Anat. Rec. (Hoboken).*, vol. 00, pp. 1349–1353, 2014.
- [4] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, and D. Prasher, “Green fluorescent protein as a marker for gene expression,” *Science (80- )*, vol. 263, no. 5148, pp. 802–805, 1994.
- [5] A. M. Bogdanov *et al.*, “Green fluorescent proteins are light-induced electron donors,” *Nat. Chem. Biol.*, vol. 5, no. 7, pp. 459–461, 2009.
- [6] O. Shimomura, “Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture).,” *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 48, no. 31, pp. 5590–5602, 2009.
- [7] R. Y. Tsien, “The 2009 Lindau Nobel Laureate Meeting: Roger Y. Tsien, Chemistry 2008.,” *J. Vis. Exp.*, vol. 144, no. 35, pp. 2009–2010, 2010.
- [8] Y. A. Labas *et al.*, “Diversity and evolution of the green fluorescent protein family.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 7, pp. 4256–61, 2002.
- [9] “<http://www.uniprot.org/uniprot/P42212>.” .
- [10] M. Orm , A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, and S. J. Remington, “Crystal Structure of the *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein,” *Science (80- )*, vol. 273, no. 5280, pp. 1392–1395, 1996.
- [11] D. Chudakov, M. Matz, S. Lukyanov, and K. Lukyanov, “Fluorescent Proteins and Their Applications in Imaging Living Cells and Tissues,” *Physiol. Rev.*, vol. 90, no. 3, pp. 1103–1163, 2010.
- [12] W. W. Ward and S. H. Bokman, “Reversible Denaturation of *Aequorea* Green-Fluorescent Protein: Physical Separation and Characterization of the Renatured Protein,” *Biochemistry*, vol. 21, no. 19, pp. 4535–4540, 1982.
- [13] F. Yang, L. G. Moss, G. N. Phillips, G. N. Phillips Jr., and G. N. Phillips, “The molecular structure of green fluorescent protein,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 14, no. 10, pp. 1246–1251,

- 1996.
- [14] T. Ha and P. Tinnefeld, “Photophysics of Fluorescence Probes for Single Molecule Biophysics and Super-Resolution Imaging,” *Annu Rev Phys Chem*, vol. 63, no. 2, pp. 595–617, 2012.
- [15] M. M. Y. Berezin and S. Achilefu, “Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging,” *Chem. Rev.*, vol. 110, no. 5, pp. 2641–2684, 2011.
- [16] R. Y. Tsien, “the Green Fluorescent,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 199, no. 2, pp. 293–306, 1998.
- [17] S. R. Meech, “Excited state reactions in fluorescent proteins,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 10, p. 2922, 2009.
- [18] A. Acharya *et al.*, “Photoinduced chemistry in fluorescent proteins: Curse or blessing?,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 2, pp. 758–795, 2017.
- [19] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, and R. Y. Tsien, “A guide to choosing fluorescent proteins,” *Nat. Methods*, vol. 2, no. 12, pp. 905–909, 2005.
- [20] and C. R. B. Tim B. McAnaney, Wei Zeng, Camille F. E. Doe, Nina Bhanji, Stuart Wakelin, David S. Pearson, Paul Abbyad, Xinghua Shi, Steven G. Boxer, “Protonation , Photobleaching , and Photoactivation of Yellow Fluorescent Protein,” *Biochemistry*, vol. 44, no. 14, pp. 5510–5524, 2005.
- [21] K. M. Dean, J. L. Lubbeck, J. K. Binder, L. R. Schwall, R. Jimenez, and A. E. Palmer, “Analysis of red-fluorescent proteins provides insight into dark-state conversion and photodegradation,” *Biophys. J.*, vol. 101, no. 4, pp. 961–969, 2011.
- [22] A. Drobizhev, Mikhail Hughes, Thomas E. Stepanenko, Yuriy Wnuk, Pawel O’Donnell, Kieran Scott, J. Nathan Callis, Patrik R. Mikhaylov, Alexander Dokken, Leslie Rebane, “Primary role of the chromophore bond length alternation in reversible photoconversion of red fluorescence proteins,” *Sci. Rep.*, vol. 2, pp. 1–6, 2012.
- [23] P. P. Chapagain, C. K. Regmi, and W. Castillo, “Fluorescent protein barrel fluctuations and oxygen diffusion pathways in mCherry,” *J. Chem. Phys.*, vol. 135, no. 23, pp. 6–11, 2011.
- [24] D. B. and M. F. Arijit Roy, Philippe Carpentier, “Diffusion pathways of oxygen species in the phototoxic fluorescent protein KillerRed,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 9, no. 10,

- p. 1286, 2010.
- [25] A. Jiménez-Banzo, S. Nonell, J. Hofkens, and C. Flors, “Singlet oxygen photosensitization by EGFP and its chromophore HBDI,” *Biophys. J.*, vol. 94, no. 1, pp. 168–172, 2008.
- [26] B. C. Ana Jimenez-Banzo, Xavier Ragas, Stefania Abbruzzetti, Cristiano Viappiani and C. F. and S. Nonell, “Singlet oxygen photosensitisation by GFP mutants: oxygen accessibility to the chromophore,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 9, no. 10, p. 1286, 2010.
- [27] S. Pletnev *et al.*, “Structural basis for phototoxicity of the genetically encoded photosensitizer KillerRed,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 46, pp. 32028–32039, 2009.
- [28] P. Carpentier, S. Violot, L. Blanchoin, and D. Bourgeois, “Structural basis for the phototoxicity of the fluorescent protein KillerRed,” *FEBS Lett.*, vol. 583, no. 17, pp. 2839–2842, 2009.
- [29] E. De Rosny and P. Carpentier, “GFP-like phototransformation mechanisms in the cytotoxic fluorescent protein killerred unraveled by structural and spectroscopic investigations,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 134, no. 43, pp. 18015–18021, 2012.
- [30] N. Malkani and J. A. Schmid, “Some secrets of fluorescent proteins: Distinct bleaching in various mounting fluids and photoactivation of cyan fluorescent proteins at YFP-excitation,” *PLoS One*, vol. 6, no. 4, pp. 1–7, 2011.
- [31] I. Jusuk, C. Vietz, M. Raab, T. Dammeyer, and P. Tinnefeld, “Super-Resolution Imaging Conditions for enhanced Yellow Fluorescent Protein (eYFP) Demonstrated on DNA Origami Nanorulers,” *Sci. Rep.*, vol. 5, no. August, pp. 1–9, 2015.
- [32] R. B. Vegh *et al.*, “Chromophore photoreduction in red fluorescent proteins is responsible for bleaching and phototoxicity,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 118, no. 17, pp. 4527–4534, 2014.
- [33] G. J. Kremers, K. L. Hazelwood, C. S. Murphy, M. W. Davidson, and D. W. Piston, “Photoconversion in orange and red fluorescent proteins,” *Nat. Methods*, vol. 6, no. 5, pp. 355–358, 2009.
- [34] C. Duan *et al.*, “Structural evidence for a two-regime photobleaching mechanism in a reversibly switchable fluorescent protein,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, no. 42, pp. 15841–15850, 2013.

- [35] P. J. Cranfill *et al.*, “Quantitative assessment of fluorescent proteins,” *Nat. Methods*, vol. 13, no. 7, pp. 557–562, 2016.
- [36] G. H. Patterson and D. W. Piston, “Photobleaching in two-photon excitation microscopy,” *Biophys. J.*, vol. 78, no. 4, pp. 2159–2162, 2000.
- [37] Y.-Amy E. Jablonski, Russell B. Vegh, Jung-Cheng Hsiang, Bettina Bommarius, and R. Cheng Chen, Kyril M. Solntsev, Andreas S. Bommarius, Laren M. Tolbert, and Dickson, “Optically Modulatable Blue Fluorescent Proteins,” vol. 385, no. 1, pp. 22–29, 2010.
- [38] R. B. Vegh *et al.*, “Hidden photoinduced reactivity of the blue fluorescent protein mKalamal,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 19, pp. 12472–85, 2015.
- [39] W. P. Dempsey *et al.*, “In vivo single-cell labeling by confined primed conversion,” *Nat. Methods*, vol. 12, no. 7, pp. 645–648, 2015.
- [40] O. M. Subach, G. H. Patterson, L. M. Ting, Y. Wang, J. S. Condeelis, and V. V. Verkhusha, “A photoswitchable orange-to-far-red fluorescent protein, PSmOrange,” *Nat. Methods*, vol. 8, no. 9, pp. 771–780, 2011.
- [41] A. M. Bogdanov, E. A. Bogdanova, D. M. Chudakov, T. V. Gorodnicheva, S. Lukyanov, and K. A. Lukyanov, “Cell culture medium affects GFP photostability: A solution,” *Nat. Methods*, vol. 6, no. 12, pp. 859–860, 2009.
- [42] A. M. Bogdanov, E. I. Kudryavtseva, and K. A. Lukyanov, “Anti-Fading Media for Live Cell GFP Imaging,” *PLoS One*, vol. 7, no. 12, pp. 1–4, 2012.
- [43] M. Gutscher *et al.*, “Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 553–559, 2008.
- [44] H. He, S. Li, S. Wang, M. Hu, Y. Cao, and C. Wang, “Manipulation of cellular light from green fluorescent protein by a femtosecond laser,” *Nat. Photonics*, vol. 6, no. 10, pp. 651–656, 2012.
- [45] H. W. Ai, N. C. Shaner, Z. Cheng, R. Y. Tsien, and R. E. Campbell, “Exploration of new chromophore structures leads to the identification of improved blue fluorescent proteins,” *Biochemistry*, vol. 46, no. 20, pp. 5904–5910, 2007.
- [46] M. A. Mena, T. P. Treynor, S. L. Mayo, and P. S. Daugherty, “Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 12, pp. 1569–1571, 2006.



- [47] P. A. S. Nathan C. Shaner, Michael Z. Lin, Michael R. McKeown and R. Y. T. Kristin L. Hazelwood, Michael W. Davidson, “Improving the photostability of bright monomeric orange and red fluorescent proteins,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 545–551, 2008.
- [48] S. Zhong, D. Navaratnam, and J. Santos-Sacchi, “A genetically-encoded YFP sensor with enhanced chloride sensitivity, photostability and reduced pH interference demonstrates augmented transmembrane chloride movement by gerbil prestin (SLC26a5),” *PLoS One*, vol. 9, no. 6, 2014.
- [49] N. Agmon, “Proton pathways in green fluorescence protein,” *Biophys. J.*, vol. 88, no. 4, pp. 2452–2461, 2005.
- [50] H. Ren, B. Yang, C. Ma, Y. S. Hu, P. G. Wang, and L. Wang, “Cysteine Sulfoxidation Increases the Photostability of Red Fluorescent Proteins,” *ACS Chem. Biol.*, vol. 11, no. 10, pp. 2679–2684, 2016.
- [51] C. Duan, M. Byrdin, M. El Khatib, X. Henry, V. Adam, and D. Bourgeois, “Rational design of enhanced photoresistance in a photoswitchable fluorescent protein,” *Methods Appl. Fluoresc.*, vol. 3, no. 1, p. 14004, 2015.
- [52] V. Adam, R. Berardozzi, M. Byrdin, and D. Bourgeois, “Phototransformable fluorescent proteins: Future challenges,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 20, no. 1, pp. 92–102, 2014.
- [53] G. Donnert, C. Eggeling, and S. W. Hell, “Major signal increase in fluorescence microscopy through dark-state relaxation,” *Nat. Methods*, vol. 4, no. 1, pp. 81–86, 2007.
- [54] G. Donnert, C. Eggeling, and S. W. Hell, “Triplet-relaxation microscopy with bunched pulsed excitation,” *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 8, no. 4, p. 481, 2009.
- [55] R. M. Wachter, D. Yarbrough, K. Kallio, and S. J. Remington, “Crystallographic and energetic analysis of binding of selected anions to the yellow variants of green fluorescent protein,” *J. Mol. Biol.*, vol. 301, no. 1, pp. 157–171, 2000.
- [56] G. Morris and R. Huey, “AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility,” *J. ...*, vol. 30, no. 16, pp. 2785–2791, 2009.
- [57] I. A. Balabin, X. Hu, and D. N. Beratan, “Exploring biological electron transfer pathway dynamics with the Pathways Plugin for VMD,” *J. Comput. Chem.*, vol. 33, no. 8, pp. 906–910, 2012.

- [58] M. H. M. Olsson, G. Hong, and A. Warshel, “Frozen density functional free energy simulations of redox proteins: Computational studies of the reduction potential of plastocyanin and rusticyanin,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, no. 17, pp. 5025–5039, 2003.
- [59] K. B. Bravaya, M. G. Khrenova, B. L. Grigorenko, A. V Nemukhin, and A. I. Krylov, “Supporting materials for The effect of protein environment on electronically excited and ionized states of the green fluorescent protein chromophore Vertical excitation and detachment energies : The cluster model,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 115, pp. 8296–8303, 2011.
- [60] J.-D. Chai and M. Head-Gordon, “Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 10, no. 44, p. 6615, 2008.
- [61] and K. S. James C. Phillips, Rosemary Braun, Wei Wang, James Gumbart, Emad Tajkhorshid, Elizabeth Villa, Christophe Chipot, Robert D. Skeel, Laxmikant Kalé, “NIH Public Access,” *J Comput Chem*, vol. 55, no. 20, pp. 6197–6214, 2011.
- [62] Y. Shao *et al.*, “Advances in molecular quantum chemistry contained in the Q-Chem 4 program package,” *Mol. Phys.*, vol. 113, no. 2, pp. 184–215, 2015.
- [63] T. Van Voorhis, T. Kowalczyk, B. Kaduk, L.-P. Wang, C.-L. Cheng, and Q. Wu, “The Diabatic Picture of Electron Transfer, Reaction Barriers, and Molecular Dynamics,” *Annu. Rev. Phys. Chem.*, vol. 61, no. 1, pp. 149–170, 2010.
- [64] N. Foloppe and A. D. MacKerell, “All-Atom Empirical Force Field for Nucleic Acids: I. Parameter Optimization Based on Small Molecule and Condensed Phase Macromolecular Target Data,” *J. Comput. Chem.*, vol. 21, no. 2, pp. 86–104, 2000.
- [65] N. Reuter, H. Lin, and W. Thiel, “Green fluorescent proteins: Empirical force field for the neutral and deprotonated forms of the chromophore. Molecular dynamics simulations of the wild type and S65T mutant,” *J. Phys. Chem. B*, vol. 106, no. 24, pp. 6310–6321, 2002.
- [66] A. M. Bogdanov, E. A. Bogdanova, D. M. Chudakov, T. V. Gorodnicheva, S. Lukyanov, and K. A. Lukyanov, “Cell culture medium affects GFP photostability: A solution,” *Nat. Methods*, vol. 6, no. 12, pp. 859–860, 2009.
- [67] I. G. Zenkevich, A. Y. Eshchenko, S. V. Makarova, A. G. Vitenberg, Y. G. Dobryakov, and V. A. Utsal, “Identification of the products of oxidation of quercetin by air oxygen at ambient temperature,” *Molecules*, vol. 12, no. 3, pp. 654–672, 2007.

- [68] E. B. Dechene, "The relative stability of rutin and quercetin in alkaline solution.," *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc. (Baltim).*, vol. 40, no. 10, pp. 495–497, 1951.
- [69] M. Ghiasi and M. M. Heravi, "Quantum mechanical study of antioxidative ability and antioxidative mechanism of rutin ( vitamin P ) in solution," *Carbohydr. Res.*, vol. 346, no. 6, pp. 739–744, 2011.
- [70] G. Gong, Y. Qin, W. Huang, S. Zhou, X. Yang, and D. Li, "Rutin inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis through regulating reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction pathway in human umbilical vein endothelial cells," *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 628, no. 1–3, pp. 27–35, 2010.
- [71] M. Byrdin *et al.*, "A long-lived Triplet State is the Entrance Gateway to Oxidative Photochemistry in Green Fluorescent Proteins A long- lived Triplet State is the Entrance Gateway to Oxidative Pho- tochemistry in Green Fluorescent Proteins .," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 140, no. 8, pp. 2897–2905, 2018.
- [72] D. A. Shagin *et al.*, "GFP-like Proteins as Ubiquitous Metazoan Superfamily : Evolution of Functional Features and Structural Complexity," vol. 21, no. 5, 2004.
- [73] P. G. Wilmann *et al.*, "° Crystal Structure of copGFP , a Representative The 2 . 1 A Member of the Copepod Clade Within the Green Fluorescent Protein Superfamily," pp. 890–900, 2006.
- [74] O. M. Subach *et al.*, "Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe," *Chem Biol*, vol. 15, no. 10, pp. 1116–1124, 2009.
- [75] A. R. Pombinho, V. Laizø, D. M. Molha, and S. M. P. Marques, "Development of two bone-derived cell lines from the marine teleost *Sparus aurata* ; evidence for extracellular matrix mineralization and cell-type-specific expression of matrix Gla protein and osteocalcin," *Cell Tissue Res*, vol. 315, pp. 393–406, 2004.
- [76] R. A. Crossley *et al.*, "Riboflavin Biosynthesis Is Associated with Assimilatory Ferric Reduction and Iron Acquisition by *Campylobacter jejuni* □," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 73, no. 24, pp. 7819–7825, 2007.
- [77] K. A. Lukyanov and V. V. Belousov, "Biophotonics: The slow fade of cell fluorescence," *Nat. Photonics*, vol. 6, no. 10, pp. 641–643, 2012.
- [78] H. B. Gray and J. R. Winkler, "Electron tunneling through proteins," *Q. Rev. Biophys.*, vol. 36, no. 3, pp. 341–372, 2003.

- [79] A. M. Bogdanov *et al.*, “Turning on and off Photoinduced Electron Transfer in Fluorescent Proteins by  $\pi$ -Stacking, Halide Binding, and Tyr145 Mutations,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, no. 14, pp. 4807–4817, 2016.
- [80] F. G. P. Torsten Ehrig, Dennis J. O’Kane, “Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra,” *FEBS Lett.*, vol. 367, no. 4, pp. 163–166, 1995.
- [81] N. G. Gurskaya *et al.*, “A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulea* and its fluorescent mutants,” *Biochem. J.*, vol. 373, no. Pt 2, pp. 403–408, 2003.
- [82] R. Saha, P. K. Verma, S. Rakshit, S. Saha, S. Mayor, and S. K. Pal, “Light driven ultrafast electron transfer in oxidative redding of Green Fluorescent Proteins,” *Sci. Rep.*, vol. 3, pp. 1–7, 2013.
- [83] S. J. A. R. Emington, “Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein,” vol. 94, no. March, pp. 2306–2311, 1997.
- [84] C. Scharnagl and S. F. Fischer, “Molecular Basis for pH Sensitivity and Proton Transfer in Green Fluorescent Protein : Protonation and Conformational Substates from,” vol. 77, no. October, pp. 1839–1857, 1999.
- [85] J. A. Sniegowski, J. W. Lappe, H. N. Patel, H. A. Huffman, and R. M. Wachter, “Base Catalysis of Chromophore Formation in Arg 96 and Glu 222 Variants of Green Fluorescent Protein \*,” vol. 280, no. 28, pp. 26248–26255, 2005.
- [86] J. N. Henderson, R. Gepshtein, J. R. Heenan, K. Kallio, D. Huppert, and S. J. Remington, “Structure and Mechanism of the Photoactivatable Green Fluorescent Protein,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, no. 12, pp. 4176–4177, 2009.
- [87] K. S. Sarkisyan *et al.*, “Green Fluorescent Protein with Anionic Tryptophan-Based Chromophore and Long Fluorescence Lifetime,” *Biophys. J.*, vol. 109, no. 2, pp. 380–389, 2015.
- [88] J. Goedhart *et al.*, “Structure-guided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%,” *Nat. Commun.*, vol. 3, 2012.
- [89] G. Matela, P. Gao, G. Guigas, A. F. Eckert, K. Nienhaus, and G. Ulrich Nienhaus, “A far-red emitting fluorescent marker protein, mGarnet2, for microscopy and STED nanoscopy,” *Chem. Commun.*, vol. 53, no. 5, pp. 979–982, 2017.

- [90] K. D. Piatkevich, V. N. Malashkevich, K. S. Morozova, N. A. Nemkovich, S. C. Almo, and V. V. Verkhusha, “Extended Stokes shift in fluorescent proteins: Chromophore-protein interactions in a near-infrared TagRFP675 variant,” *Sci. Rep.*, vol. 3, pp. 1–11, 2013.
- [91] S. Ganesan, S. M. Ameer-beg, T. T. C. Ng, B. Vojnovic, and F. S. Wouters, “A dark yellow fluorescent protein (YFP)-based Resonance Energy-Accepting Chromoprotein (REACH) for Förster resonance energy transfer with GFP,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, no. 11, pp. 4089–4094, 2006.
- [92] K. Suhling *et al.*, “Imaging the Environment of Green Fluorescent Protein,” *Biophys. J.*, vol. 83, no. December, pp. 3589–3595, 2002.
- [93] T. Nakabayashi and N. Ohta, “Sensing of Intracellular Environments by Fluorescence Lifetime Imaging of Exogenous Fluorophores,” *Anal. Sci.*, vol. 31, no. 4, pp. 275–285, 2015.
- [94] D. Mcloskey, D. Campbell, A. Allison, and G. Hungerford, “Fast time-correlated single-photon counting fluorescence lifetime acquisition using a 100 MHz semiconductor excitation source,” *Meas. Sci. Technol.*, vol. 22, p. 067001, 2011.