

На правах рукописи

Горбачев Дмитрий Андреевич

Новые генетически кодируемые фотосенсибилизаторы

Специальность 1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в отделе биофотоники в лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Лукьянов Константин Анатольевич, член-корреспондент РАН, профессор РАН, доктор биологических наук.

Официальные оппоненты:

1. Случанко Николай Николаевич, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, руководитель группы белок-белковых взаимодействий, ФИЦ Биотехнологии РАН

2. Демидюк Илья Валерьевич, доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории белковой инженерии, ФГБУ Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук

Защита состоится «29» июня 2022 года в 11:00 на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, а также на сайте института www.ibch.ru.

Автореферат разослан « »

2022 г

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук В.А. Олейников



Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования

Фотосенсибилизаторы – красители, способные вырабатывать активные формы кислорода при облучении светом. Фотохимические реакции, вызываемые фотосенсибилизаторами, приводят к образованию активных форм кислорода и окислению органических молекул, что наносит клеткам значительный ущерб и, в конечном итоге, может приводить к их гибели. Это послужило причиной широкого применения фотосенсибилизаторов как в фундаментальных исследованиях, так и в биомедицине. Например, фотодинамическая терапия, основанная на селективном накоплении фотосенсибилизатора в клетках опухоли и ее последующем облучении, эффективно используется при лечении некоторых онкологических и кожных заболеваний.

Фотосенсибилизаторы можно разделить на два типа веществ: органические молекулы (производные порфиринов и родственных ароматических соединений) и белки, которые представлены фототоксичными флуоресцентными белками и белками с экзогенным фототоксичным хромофором.

Большинство флуоресцентных белков не обладают фототоксическим эффектом, так как их хромофор экранирован от окружающего растворителя вторичной структурой белка – β -бочонком. Считается, что изолированность хромофора объясняет пониженный уровень фототоксичности типичного флуоресцентного белка для клеток и тканей при флуоресцентной микроскопии по сравнению с небольшими органическими красителями. Однако существует флуоресцентный белок – KillerRed, в котором β -бочонок экранирует хромофор не полностью и способствует образованию водного канала, который открывает молекулам воды и кислорода доступ к хромофору. При освещении зеленым или оранжевым светом KillerRed вырабатывает активные формы кислорода, демонстрируя гораздо более высокий уровень фототоксичности по сравнению с другими флуоресцентными белками. Эта особенность является отличительным свойством KillerRed и позволяет использовать его для прицельной фотоинактивации клеточных белков, а также для избирательного уничтожения клеточных популяций.

По сравнению с существующими химическими аналогами KillerRed и другие генетически кодируемые фотосенсибилизаторы образуют гораздо меньше активных форм кислорода и, следовательно, имеют более низкий уровень фототоксичности. Кроме того, по сравнению с большим спектральным разнообразием фототоксичных красителей, количество существующих на данный момент фототоксичных флуоресцентных белков невелико: зеленые miniSOG и его улучшенный вариант SOPP3P, красный флуоресцентный белок KillerRed и его мономерный вариант SuperNova, а также инфракрасный FAP. В связи с чем получение фототоксичных белков других цветов и с улучшенной фототоксичностью является актуальной задачей.

Целью данного проекта являлось создание генетически кодируемого фотосенсибилизатора, активируемого синим светом, и создание нового варианта белка SuperNova с увеличенной фототоксичностью.

Для выполнения этих целей были поставлены следующие задачи:

1. На основе белка KillerRed методами направленного и случайного мутагенеза создать новый фототоксичный белок с измененными спектрами поглощения и флуоресценции.
2. Методом случайного мутагенеза увеличить фототоксичность белка SuperNova.
3. Разработать количественный тест на фототоксичность для культур клеток млекопитающих и бактерий.
4. Сравнить фототоксичность новых генетически кодируемых фотосенсибилизаторов и белков KillerRed и SuperNova.

Научная новизна проведенных исследований

Результатом данной работы стало получение генетически кодируемых фотосенсибилизаторов KillerOrange и mKillerOrange, активируемых синим светом. Было показано, что KillerOrange не уступает в фототоксичности белку KillerRed и может быть использован вместе с ним для независимого воздействия на разные популяции клеток.

Также были получены более фототоксичные варианты белков KillerRed и SuperNova – KillerRed2 и SuperNova2. Было показано, что внесение одной аминокислотной замены S10R приводит к увеличению скорости и полноты созревания красного хромофора, что вызывает увеличение фототоксичности.

Полученные новые генетически кодируемые фотосенсибилизаторы продемонстрировали высокую фототоксичность в клетках бактерий и млекопитающих, что подтвердило эффективность их использования в данных системах.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получение новых генетически кодируемых фотосенсибилизаторов и разработка более эффективных систем контроля за внутриклеточными белками на их основе позволит существенно расширить их применение в научных исследованиях и медицине.

Белок, который при облучении будет вырабатывать активные формы кислорода независимо от KillerRed, можно использовать для воздействия на разные клеточные популяции и синхронные биологические процессы – как одновременно, так и независимо друг от друга. Такой подход, приводящий к высокой селективности, быстро развивается в ряде химических и биохимических систем. Поэтому, использование KillerOrange в перспективе позволит расширить возможности оптического контроля за функционированием белков и развитием организмов, а также увеличить общий уровень токсичности фотосенсибилизаторов при фотодинамической терапии. Кроме того, возбуждаемые синим светом флуоресцентные белки подходят для двухфотонного возбуждения инфракрасным светом, что позволит глубже проникать в ткани исследуемого организма.

Полученные новые варианты фототоксичных белков KillerRed2 и SuperNova2 позволят увеличить эффективность использования генетически кодируемых фотосенсибилизаторов, расширить возможности их применения и снизить дозы облучения при сохранении фототоксичного эффекта, что уменьшит неспецифическое воздействие света на клетки и ткани при облучении.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Исследования проведены с использованием современных методов и подходов: различные техники молекулярного клонирования, культивирование иммортализованных клеточных линий, создание стабильных клеточных линий с исследуемыми белками, широкопольная флуоресцентная микроскопия. Эксперименты выполнены в количестве, достаточном для получения статистически достоверных результатов. Результаты исследований были обработаны стандартными методами вариационной статистики в соответствии с числом сравниваемых параметров с нормальным распределением. Научные положения, выводы и практические предложения построены на основе достоверных результатов исследований, подтвержденных первичной документацией, и согласуются с поставленными целью и задачами работы. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Практические предложения аргументированы. Материал, представленный в работе, согласуется с независимыми данными, опубликованными по тематике, близкой к диссертационной.

Структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 90 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 122 ссылки. Диссертация содержит 45 рисунков и 1 таблицу.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на двух конференциях: Janelia Junior Scientist Workshop on Protein Engineering "Making and Using Tools for Neuroscience and Other Biological Problems" в США в 2018 году и FEBS Congress, в Польше в 2019 году.

По материалам работы было опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах.

Основное содержание работы

1. Литературный обзор

Обзор литературы представлен во второй главе и состоит из четырех разделов. Первый раздел представляет краткий обзор по флуоресцентным белкам, в котором описана структура флуоресцентных белков и механизм образования их хромофоров. Во втором разделе дано описание фотосенсибилизаторов, областей их применения и механизмов образования активных форм кислорода. В третьем разделе описаны типы генетически кодируемых фотосенсибилизаторов, а четвертый раздел посвящен белку KillerRed и детальному описанию его структуры, хромофора, предполагаемого механизма образования активных форм кислорода и его применения в биологических исследованиях.

2. Экспериментальная часть

2.1 Создание варианта белка KillerRed, который не формирует DsRed-подобный хромофор

KillerRed был первым генетически кодируемым фотосенсибилизатором, разработанным в 2006 году. С тех пор были опубликованы еще несколько работ о белках, которые образуют активные формы кислорода без добавления дополнительных кофакторов: SuperNova – мономерный вариант KillerRed, miniSOG и SOPP3 – флавопротеины, которые

образуют синглетный кислород при облучении синим светом, главным образом, по механизму типа II. Вместе они охватывают спектральный диапазон от 430 до 590 нм, который можно использовать для производства активных форм кислорода.

Было показано, что красные белки, такие как KillerRed, имеющие DsRed-подобный хромофор, проходят через зеленую или синюю переходные формы до того, как их хромофор созревает в красную форму. Для получения мутанта с другим спектром поглощения мы провели случайный мутагенез белка KillerRed, ожидая найти замену, нарушающую образование ацилиминной связи в процессе созревания хромофора, и, следовательно, образование красного хромофора. После визуального скрининга около 100 000 колоний мы обнаружили мутант KillerRed, который имел заметную зеленую флуоресценцию и очень тусклую флуоресценцию в красной части спектра. Полученный мутант содержал три аминокислотные замены, относительно исходного белка – I64L, D114G и T115S. Поскольку белки с GFP-подобными хромофорами и DsRed-подобными хромофорами имеют специфические спектры поглощения, которые легко отличить друг от друга, мы выделили и очистили белок KillerRed и его мутант KillerRed I64L/D114G/T115S (**Рисунок 1**). Спектр поглощения очищенного KillerRed I64L/D114G /T115S значительно отличается от спектра поглощения KillerRed и имеет пик с максимумом при 514 нм и смещенное в синюю область спектра плечо, характерное для GFP-подобных хромофоров.

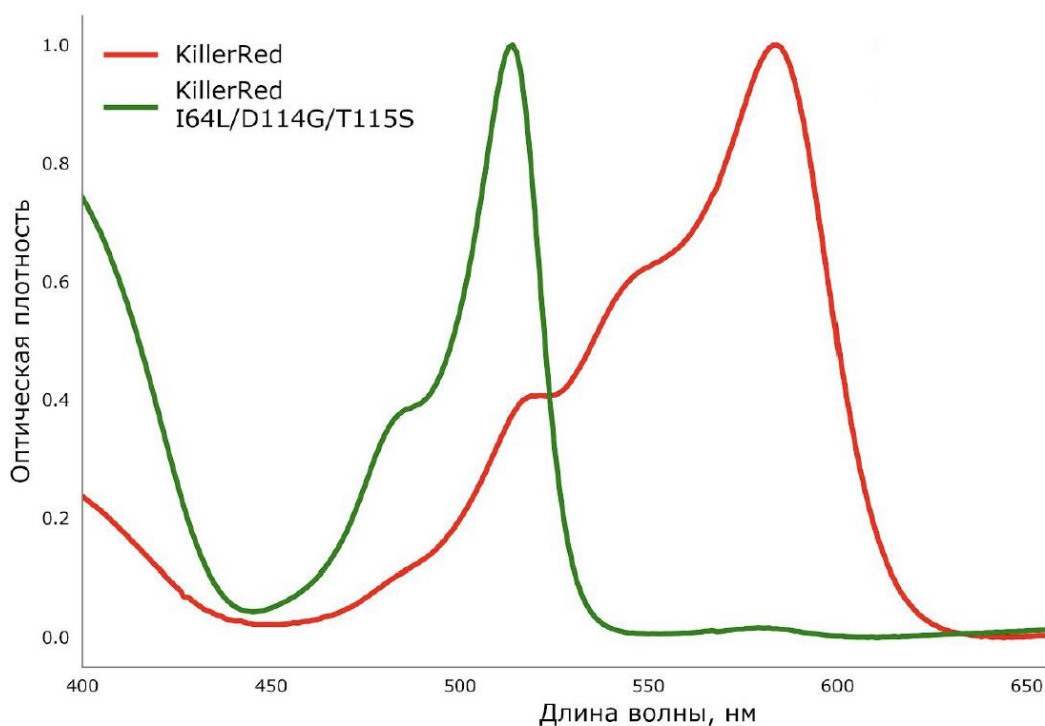


Рисунок 1. Спектры поглощения белков KillerRed и KillerRed I64L/D114G/T115S.

Отсутствие поглощения при 550-600 нм у KillerRed I64L/D114G/T115S указывает на то, что введенные мутации почти полностью предотвращают образование DsRed-подобного хромофора. Пик с максимумом при 514 нм и характерным плечом при 480–485 нм свидетельствует о том, что образование хромофора останавливается на стадии «классического» GFP-подобного хромофора.

Мутации, обнаруженные в идентифицированном нами варианте KillerRed, представляют интерес в контексте существующей литературы по мутагенезу

флуоресцентных белков. В частности, мутации в положении 64 ранее были описаны, как влияющие на созревание хромофора: например, в *A. victoria* GFP мутация F64L улучшает созревание хромофора при экспрессии при 37°C, а в хромопротеине из *Acropora millepora* мутация S64C изменяет цвет белка. Мутации D114G и T115S расположены в соседних положениях петли, соединяющей β -цепи 5 и 6 (**Рисунок 2**), и могут вносить вклад в адаптацию β -бочонка при замене изолейцина на лейцин в положении 64.

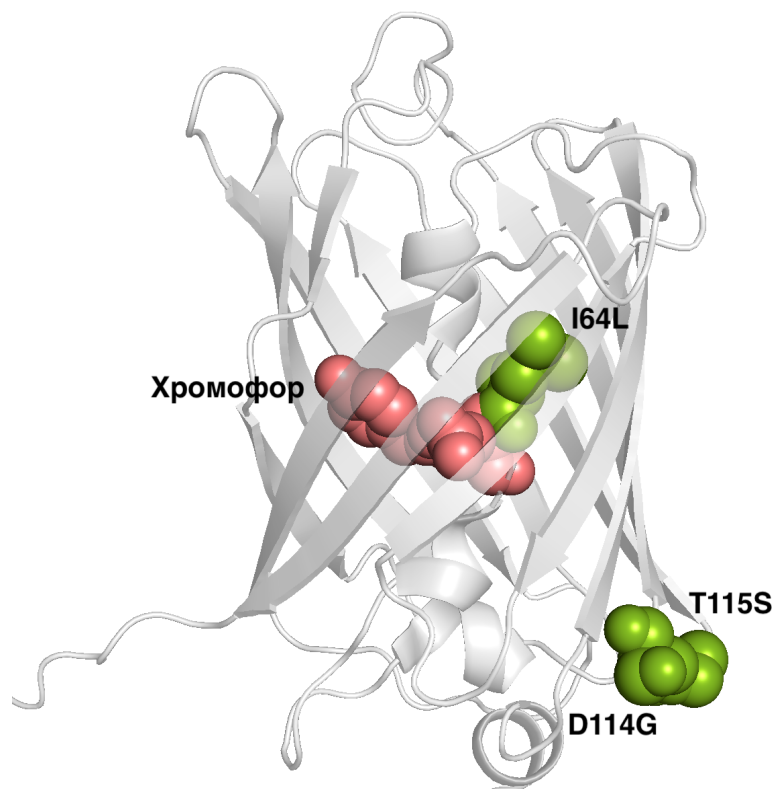


Рисунок 2. Расположение хромофора и мутаций I64L, D114G и T115S в структуре белка KillerRed.

Полученный мутант KillerRed I64L/D114G/T115S образует хромофор на основе тирозина, однако степень созревания его хромофора в 2,5 раза ниже, чем у KillerRed.

2.2 Разработка KillerOrange – оранжевого варианта белка KillerRed

После создания зеленого варианта белка KillerRed, было принято решение изменить стратегию: не менять аминокислотное окружение хромофора случайным мутагенезом, а целенаправленно заменить 66 аминокислотный остаток тирозина в хромофоре KillerRed на ароматические аминокислоты гистидин, фенилаланин и триптофан. Замены Y66H и Y66F приводили к полной потере флуоресценции KillerRed. Последующий раунд случайного мутагенеза не привел к появлению флуоресцентных клонов у данных мутантов. Мутант с заменой Y66W был слабо флуоресцентным в оранжевой области спектра, и нам удалось увеличить его яркость посредством трех раундов случайного мутагенеза. Конечный мутант, несущий 7 замен (KillerRed G3C/Y66W/D113S/N145S/F177L/Y221H/E236Q), представлял собой ярко-оранжевый флуоресцентный белок с максимумом возбуждения при 512 нм и максимумом эмиссии при 555 нм (**Рисунок 3**). Мы назвали его KillerOrange.

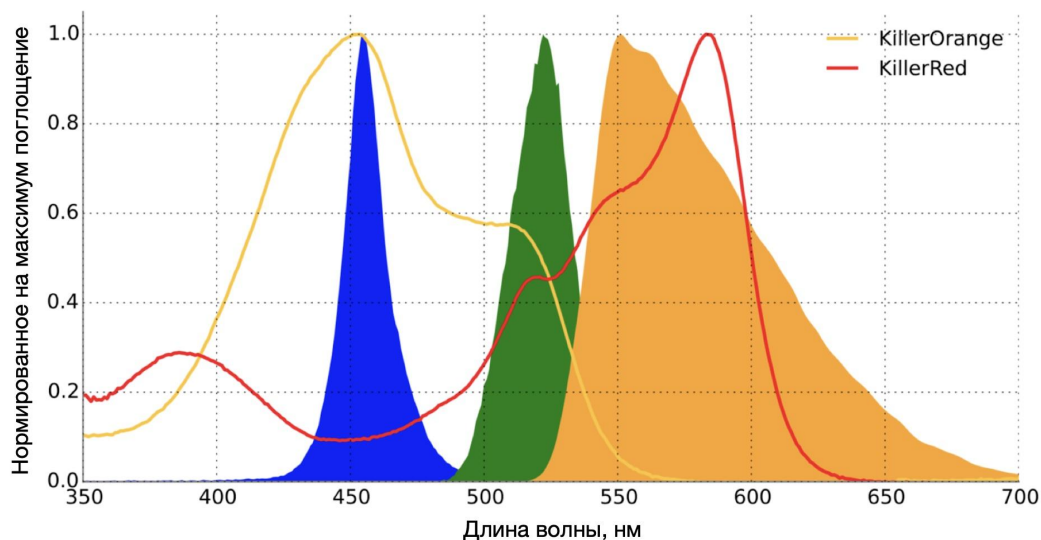


Рисунок 3. Спектры поглощения KillerRed и KillerOrange. Сплошной заливкой показаны спектры эмиссии диодов 450–495, 505–545 и 540–600 нм, синий, зеленый и оранжевый, соответственно.

2.2.1 Спектральные характеристики KillerOrange

Спектры поглощения KillerOrange имеют два максимума при 455 и 514 нм (**Рисунок 4**), которые, вероятно, соответствуют незрелому CFP-подобному хромофору и зрелому mHoney-Dew-подобному ацилимин-содержащему хромофору на основе триптофана (**Рисунок 5**). Коэффициенты экстинкции KillerOrange составляли $41200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при 455 нм и $22600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при 514 нм. Несмотря на наличие двух форм, флуоресценция белка практически полностью находится в оранжевой области спектра с максимумом при 555 нм (сдвиг Стокса более 40 нм) и квантовым выходом 42%. При этом незрелая форма на 455 нм мало способствует излучению флуоресценции.

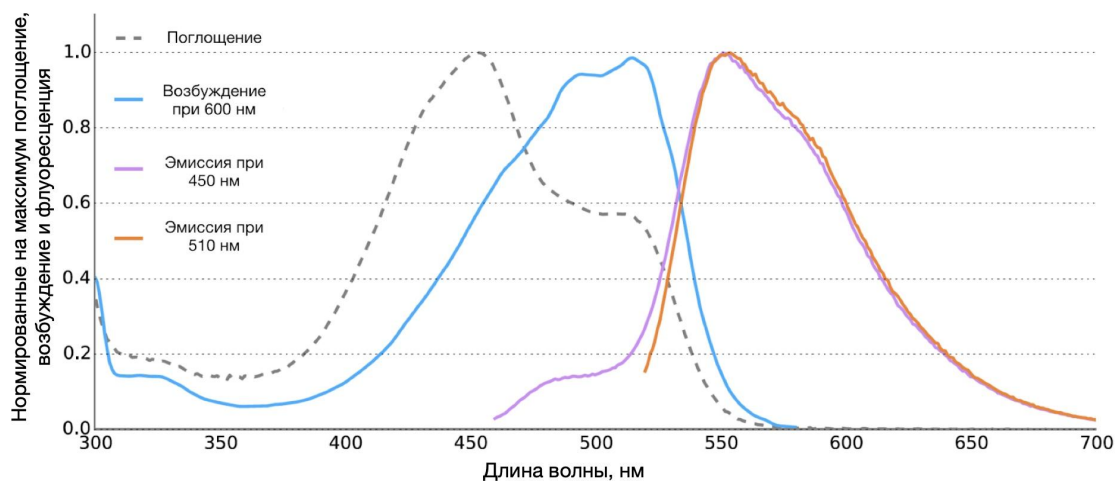


Рисунок 4. Спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции белка KillerOrange.

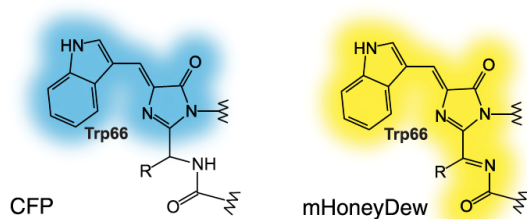


Рисунок 5. Структура хромофоров CFP и mHoneyDew.

Время жизни флуоресценции KillerOrange характеризуется полиэкспоненциальным затуханием и зависит от значения pH: 1,5 нс при pH 5,5, 1,9 нс при pH 7,4 и 2,6 нс при pH 9,5 (**Рисунок 6**). Как видно из pH-зависимости спектров KillerOrange (**Рисунок 7**), увеличение времени жизни флуоресценции в щелочных условиях сопровождается увеличением интенсивности флуоресценции, что свидетельствует о повышении квантового выхода при увеличении pH.

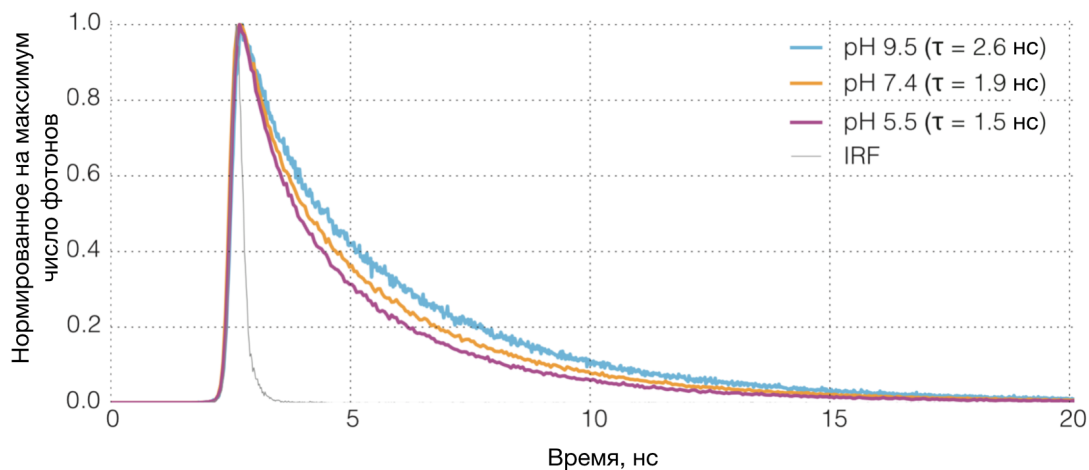


Рисунок 6. Зависимость времени жизни флуоресценции белка KillerOrange от pH.

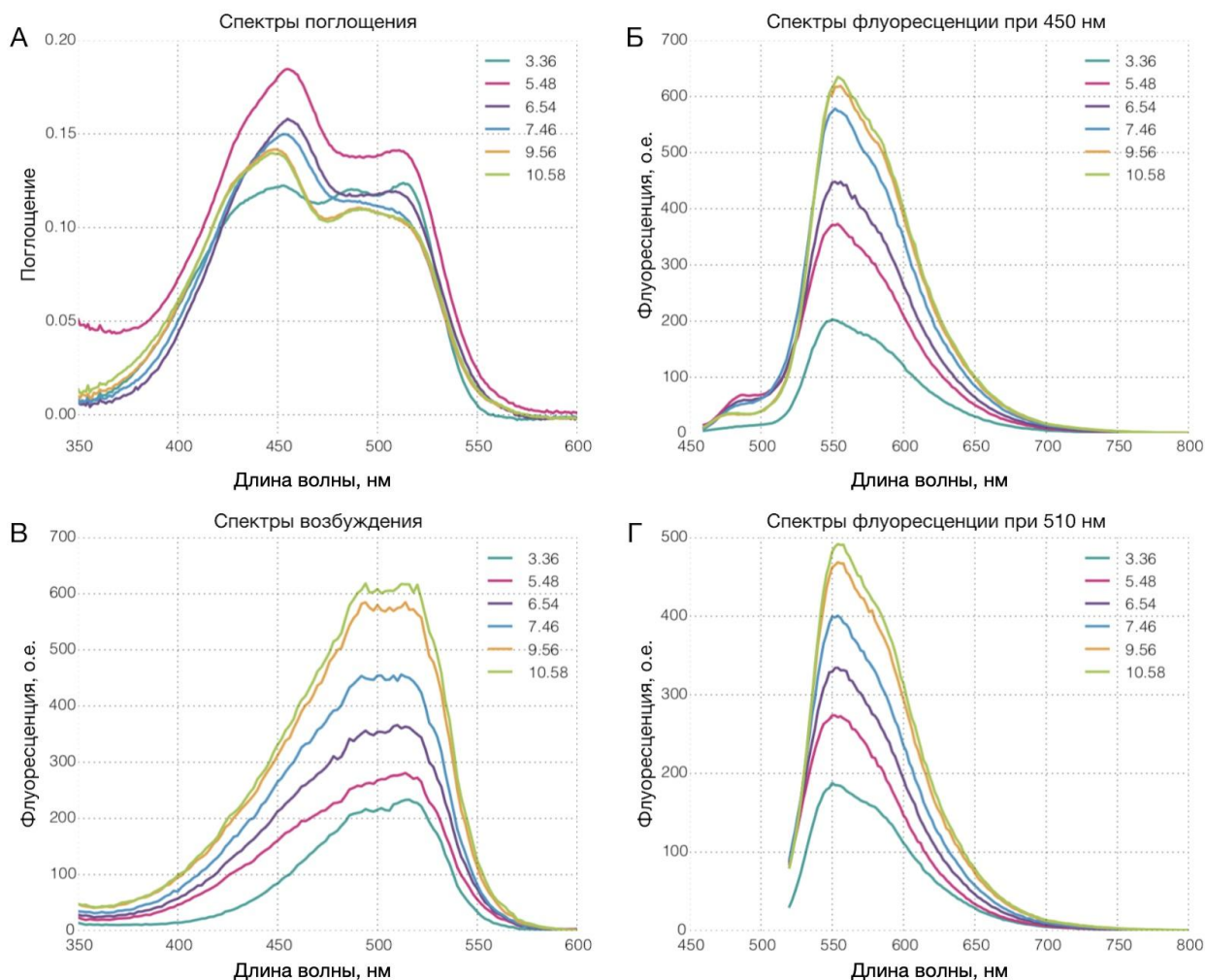


Рисунок 7. (А) Зависимость спектров поглощения белка KillerOrange от pH; (Б) Спектры флуоресценции при возбуждении светом 450 нм; (В) Спектры возбуждения при детекции флуоресценции 610 нм; (Г) Спектры флуоресценции при возбуждении светом 510 нм.

2.2.2 Определение фототоксичности KillerOrange

Для оценки фототоксичности KillerOrange при различных условиях освещения мы проводили тест на фототоксичность с использованием методики подсчета колониеобразующих единиц. Используя синий свет с высокой степенью интенсивности (470/20 нм, 1 Вт / см²), мы обнаружили, что клетки, экспрессирующие KillerOrange, практически полностью погибают в результате 60-секундного облучения (уменьшение в 222 раза) (**Рисунок 8, А**), что подтверждает высокий уровень фототоксичности белка KillerOrange.

Для проверки возможности независимого использования KillerOrange и KillerRed мы провели аналогичный эксперимент с тремя белками (**Рисунок 8, В**). Мы смешивали три популяции клеток *E. coli*, по отдельности экспрессирующие белки KillerOrange, EGFP и KillerRed.

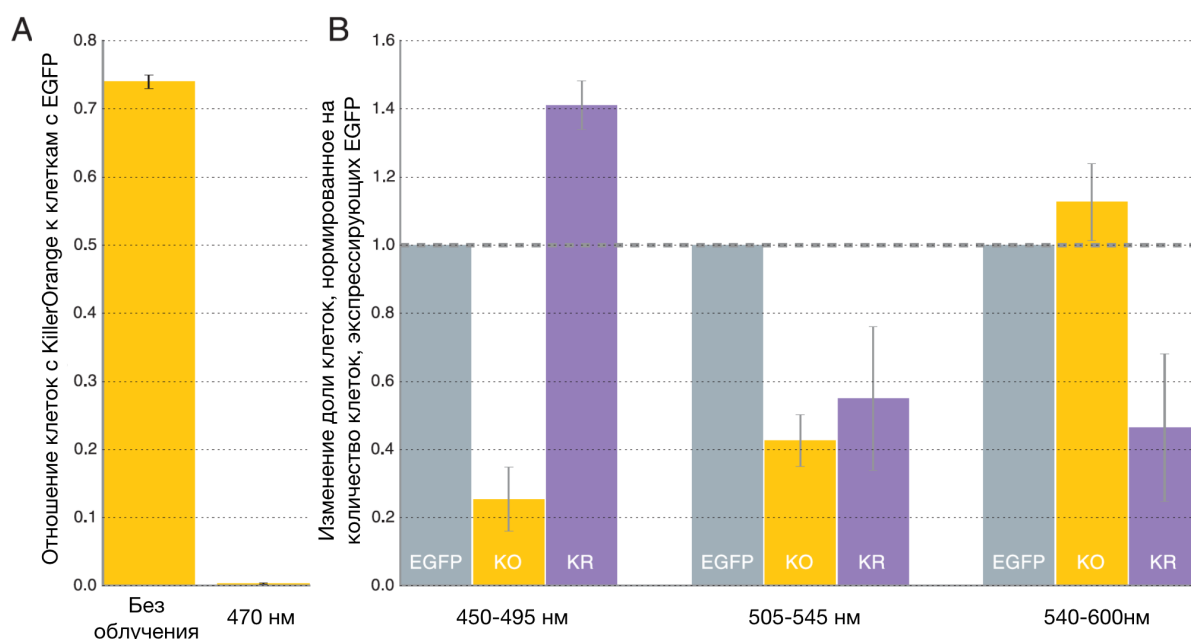


Рисунок 8. (А) Облучение синим светом 470/20 нм приводит к избирательному уничтожению бактериальных клеток, экспрессирующих KillerOrange, в смеси с клетками, экспрессирующими EGFP. (В) Токсичность KillerOrange (KO) и KillerRed (KR) при облучении светом разных длин волн.

Мы облучали аликвоты суспензии клеток светом 450–495, 505–545 и 540–600 нм (спектры светодиодов показаны на **Рисунок 3**). Облучение светом 540–600 нм приводило к селективному уничтожению клеток, экспрессирующих KillerRed, тогда как облучение светом 450–495 нм убивало большинство клеток, экспрессирующих KillerOrange. Интересно, что облучение светом с длиной волны 505-545 нм было почти одинаково эффективным при уничтожении клеток KillerOrange и KillerRed.

Таким образом, мы показали, что, комбинируя различные источники света, можно добиться точного контроля над клеточными популяциями, экспрессирующими KillerOrange и KillerRed.

2.2.3 Создание мономерного варианта KillerOrange

Мы также создали мономерный mKillerOrange путем введения единственной замены Y66W в белок SuperNova. Интересно, что полученный белок имел практически такие же спектры поглощения и флуоресценции (**Рисунок 9**), как и KillerOrange, но при этом не содержал дополнительных замен. К сожалению, mKillerOrange в клетках бактерий обладал

меньшей фототоксичностью, чем KillerOrange (**Рисунок 9**), что ожидаемо, учитывая невысокую фототоксичность белка SuperNova и отсутствие мутаций, которые компенсировали бы негативный эффект от введения объемного остатка триптофана в б6 положение.

На основе полученных нашими коллегами кристаллических структур мы решили провести сайт-направленный мутагенез, чтобы идентифицировать аминокислотные остатки, ответственные за фототоксичность KillerOrange и mKillerOrange. Глутамин в 159 положении и треонин в 201 были идентифицированы как сайты, влияющие на равновесие транс-цис- и цис-цис-конформаций триптофана б6 в хромофоре.

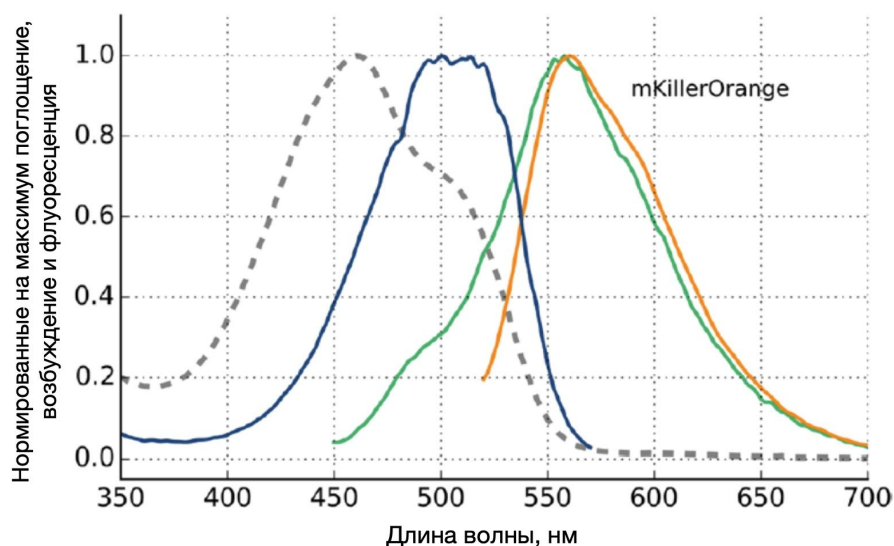


Рисунок 9. Спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции белка mKillerOrange. Обозначения: пунктир – спектр поглощения, зеленый – спектр флуоресценции при возбуждении на 440 нм, оранжевый – спектр флуоресценции при возбуждении на 510 нм, синий – спектр возбуждения при детекции флуоресценции на 580 нм.

Также в более раннем исследовании KillerRed было показано, что глутамат в б8 положении, расположенный сразу после хромофора, влияет на фототоксичность белка. Поэтому мы создали мутанты со следующими одиночными заменами: Q159G и E68Q в KillerOrange и T201A в mKillerOrange. К сожалению, все три мутации привели к неспособности белков к формированию зрелого хромофора, что затрудняет вывод о конкретной роли этих остатков в фототоксичности и флуоресценции KillerOrange и mKillerOrange.

Мы также применили сайт-направленный мутагенез, чтобы заблокировать водный канал, который, как считается, имеет решающее значение для образования активных форм кислорода. Замена I199F и I199L в KillerOrange привела к значительной потере фототоксичности (**Рисунок 10**), в то время как спектральные свойства соответствующих мутантов были довольно сходны со спектральными свойствами KillerOrange (**Таблица 1**).

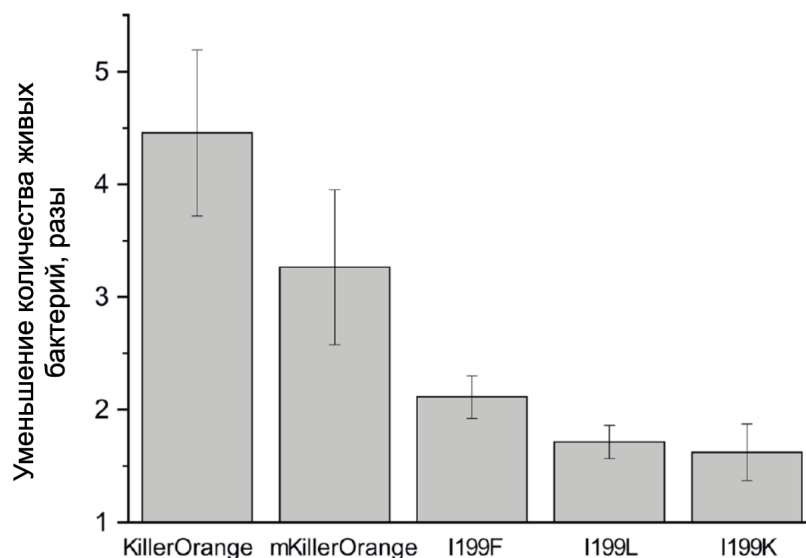


Рисунок 10. Уменьшение количества жизнеспособных бактерий *E.coli*, экспрессирующих данные флуоресцентные белки, после облучения синим светом.

Таблица 1. Спектральные характеристики KillerOrange и его мутантов.

	KillerOrange	mKillerOrange	KillerOrange I199F	KillerOrange I199L	KillerOrange I199K
Поглощение, нм (ЕС^а)	452 (35000)	458 (35000)	452 (29000)	450 (42000)	450 (43000)
ЕС при 514 нм	19000	20000	8000	23000	600
Циановая эмиссия, нм	~480 нм (плечо)	~480 нм (плечо)	~480 нм (плечо)	~480 нм (плечо)	478 нм (основной пик)
Оранжевая эмиссия, нм	555 нм (основной пик)	560 нм (основной пик)	563 нм (основной пик)	555 нм (основной пик)	545 нм (плечо)
Квантовый выход, при возбуждении на 510 нм	0.42	0.50	0.75	0.87	0.85

^аЕС – коэффициент экстинкции, М⁻¹см⁻¹

Удивительно, но замена изолейцина 199 на положительно заряженный объемный лизин привела к низкофототоксичному белку с преимущественно циановой флуоресценцией (Рисунок 11, Таблица 1).

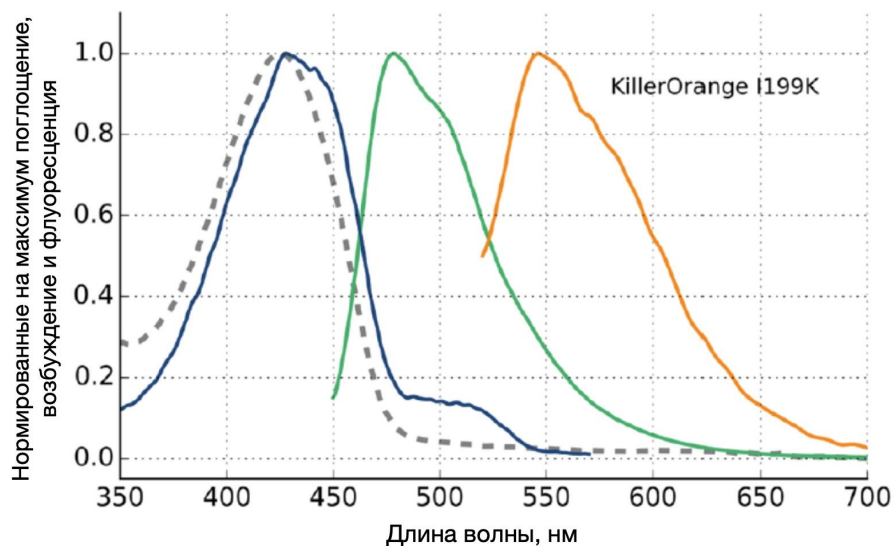


Рисунок 11. Спектры поглощения, возбуждения и флуоресценции белка KillerOrange I199K. Обозначения: Пунктир – спектр поглощения, зеленый – спектр флуоресценции при возбуждении на 440 нм, оранжевый – спектр флуоресценции при возбуждении на 510 нм, синий – спектр возбуждения при детекции флуоресценции на 580 нм.

Другие мутанты – A82S, I199M и I199R – имели тусклую оранжевую флуоресценцию и демонстрировали очень низкую скорость созревания, что не позволяло проводить прямое сравнение их фототоксичности с фототоксичностью родительского KillerOrange.

Результаты мутагенеза показали, что введение объемных остатков фенилаланина и лейцина в 199 положение прерывает цепь из молекул воды в водном канале, что приводит к снижению фототоксичности мутантов – предположительно, за счет замедления продукции активных форм кислорода. Все протестированные мутанты I199F/L/K обладали заметно более высоким квантовым выходом оранжевой флуоресценции по сравнению с родительским белком (**Таблица 1**), что свидетельствует о том, что объемные остатки в положении 199 могут ограничивать свободу движений хромофора, подавляя его безызлучательный переход.

3.3 Увеличение фототоксичности белков SuperNova и KillerRed

Одной из важных особенностей фотосенсибилизаторов является их олигомерная структура. Обычно предпочтительны мономерные фотосенсибилизаторы, так как они могут быть слиты с другими белками для направленной доставки активных форм кислорода без образования олигомерных структур и нарушения нормальной физиологии клеток. Так, в результате мутагенеза димерного фототоксического красного флуоресцентного белка KillerRed был создан мономерный фотосенсибилизатор под названием SuperNova. Однако в наших экспериментах фототоксичность SuperNova была недостаточной для большинства применений. Поэтому мы решили провести случайный мутагенез белка SuperNova, найти мутации, которые увеличивают фототоксичность данного белка, и проверить, как найденные мутации влияют на фототоксичность белка KillerRed.

Направленная эволюция фототоксичности флуоресцентных белков является сложной задачей частично из-за недостаточного понимания ее структурных детерминант, но в значительной степени из-за отсутствия подходящего высокопроизводительного метода скрининга. Ни один из существующих фототоксических флуоресцентных белков семейства GFP не был улучшен методами направленной эволюции, будь то рациональный дизайн или случайный мутагенез.

При работе с KillerRed и KillerOrange мы заметили, что фототоксичность данных белков повышалась с увеличением возраста бактерий. Мы предположили, что причиной роста фототоксичности является увеличение фракции полностью созревшего белка. Известно, что красные флуоресцентные белки образуют свои хромофоры в результате многоступенчатого процесса окисления с несколькими возможными конечными продуктами. В KillerRed, только красная форма хромофора отвечает за генерацию активных форм кислорода. Это могло бы объяснить наблюдаемую связь между возрастом бактериальных колоний и фототоксичностью.

Мы решили проверить наше предположение и найти мутантов SuperNova и KillerRed с улучшенной эффективностью сворачивания и скоростью созревания хромофора и, возможно, с повышенной фототоксичностью.

3.3.1 Мутация S10R в белках SuperNova и KillerRed приводит к увеличению эффективности созревания красного хромофора

На первом этапе работы мы решили определить, какой процент молекул SuperNova и KillerRed формируют хромофор. Для этого мы выделили и очистили данные белки и денатурировали их в щелочи. При щелочной денатурации Ds-Red подобных белков происходит преобразование как зеленой, так и красной формы хромофора в один и тот же спектральный вид. По соотношению белка, содержащего хромофор, и общего количества белка можно судить об эффективности образования хромофора. По данным, полученными при анализе спектров поглощения белков SuperNova и KillerRed в щелочных условиях (**Рисунок 12, А**), используя формулу Бугера-Ламберта-Бера $A = \epsilon c l$, которая описывает связь поглощения (A), коэффициента экстинкции (ϵ) и концентрации (c) мы определили, что доля молекул со зрелым хромофором оказалась низкой. Общую концентрацию белка и концентрацию белка, содержащего хромофор, определяли исходя из значений оптической плотности при 280 нм ($\epsilon = 11460 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) и 455 нм ($\epsilon = 44000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), соответственно (**Рисунок 12, А**). Оказалось, что только 35% молекул белка SuperNova и около 50% молекул белка KillerRed содержат хромофор, что указывает на возможность значительного улучшения этих белков путем направленной эволюции.

Так как только красная форма хромофора ответственна за фототоксичность, увеличение эффективности созревания должно привести к увеличению фототоксичности. В качестве модели для направленной эволюции мы решили выбрать белок SuperNova, так как он имеет относительно низкую яркость, степень созревания хромофора и фототоксичность. Мы предположили, что при скрининге библиотеки мутантов SuperNova на яркость сможем отобрать более эффективно созревающие мутанты SuperNova, которые будут более фототоксичны, чем исходный вариант.

Мы создали библиотеку мутантов белка SuperNova и провели скрининг на яркость в клетках *E. coli*. Среди отобранных мутантов один клон имел значительно улучшенную яркость, более чем в три раза превышающую яркость исходного белка. Он отличался от исходного белка одной заменой S10R. Полученный мутант был назван SuperNova2. Введение этой же мутации в KillerRed привело к варианту KillerRed S10R, который мы назвали KillerRed2. Мутация S10R расположена на первой петле, соединяющей N-концевую α -спираль и первый β -слой (**Рисунок 13**).

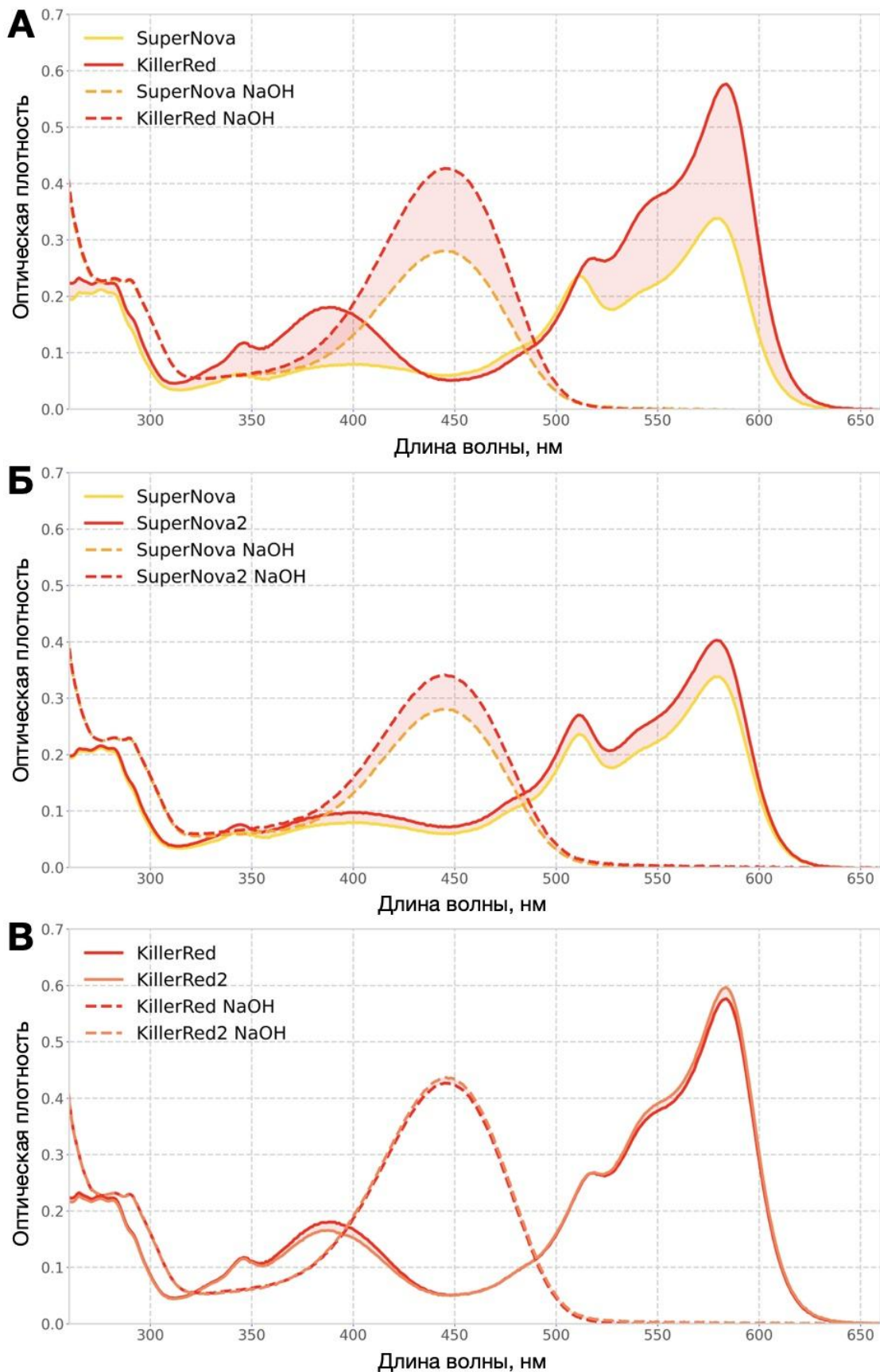


Рисунок 12. Спектры поглощения нативных и денатурированных щелочью белков SuperNova, SuperNova2, KillerRed и KillerRed2: (А) Спектры поглощения KillerRed и SuperNova в нативном виде и при денатурации в 1М NaOH; (Б) Сравнение спектров поглощения SuperNova и SuperNova2 в нативном виде и при денатурации в 1М NaOH; (В) Сравнение спектров поглощения KillerRed и KillerRed2 в нативном виде и при денатурации в 1М NaOH.

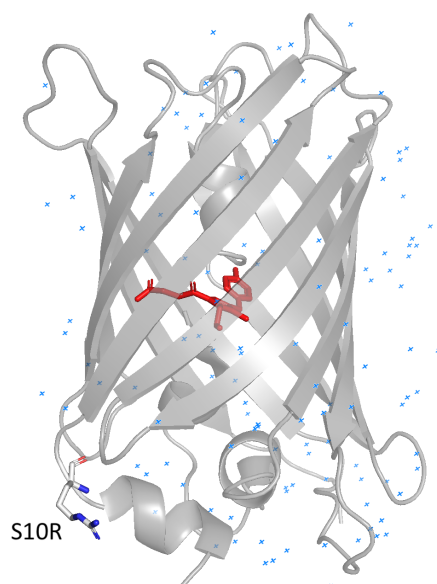


Рисунок 13. Модель белка SuperNova с заменой S10R.

3.3.2 Спектральные характеристики SuperNova2 и KillerRed2

Известно, что мутации в петлях между β -слоями в флуоресцентных белках в значительной степени влияют на их сворачивание и яркость, что может объяснять вероятный механизм действия мутации S10R. Мы проанализировали долю зрелого хромофора и обнаружили, что в SuperNova2 она увеличилась на 20% по сравнению с SuperNova (**Рисунок 12, Б**), в то время как в KillerRed2 она практически не изменилась (**Рисунок 12, В**). Спектры поглощения очищенных белков (**Рисунок 12, Б, В**) показали, что в обоих мутантах мутация S10R привела к небольшому снижению содержания зеленой формы хромофора и снижению содержания синей формы хромофора у KillerRed2. При этом спектры возбуждения и эмиссии полученных мутантов были аналогичны родительским белкам, как и коэффициент экстинкции и квантовый выход (**Рисунок 14**).

3.3.3 Созревание белков SuperNova2 и KillerRed2 *in vitro*

Дополнительно мы провели эксперименты по определению кинетики созревания белков *in vitro* (**Рисунок 15**), что позволило проследить за изменением синей, зеленой и красной форм хромофора во время созревания белков SuperNova, KillerRed и их мутантов.

По полученным данным можно сделать вывод, что увеличение эффективности созревания красного хромофора SuperNova2 достигается как за счет увеличения эффективности образования синей формы хромофора, так и за счет более эффективного перехода из синей формы хромофора в красную. Так, синей формы хромофора у SuperNova2 образуется в 1,5 раза больше, чем у SuperNova (**Рисунок 15, А, В**), а зрелого красного хромофора больше в два раза, что подтверждает увеличение эффективности созревания хромофора SuperNova2. Интересно, что для KillerRed2 данные по полноте созревания хромофора в эксперименте по определению кинетики созревания отличаются от данных, полученных на белках, выделенных из бактерий, что, вероятно, отражает разницу в условиях созревания белков, таких, как температура и pH.

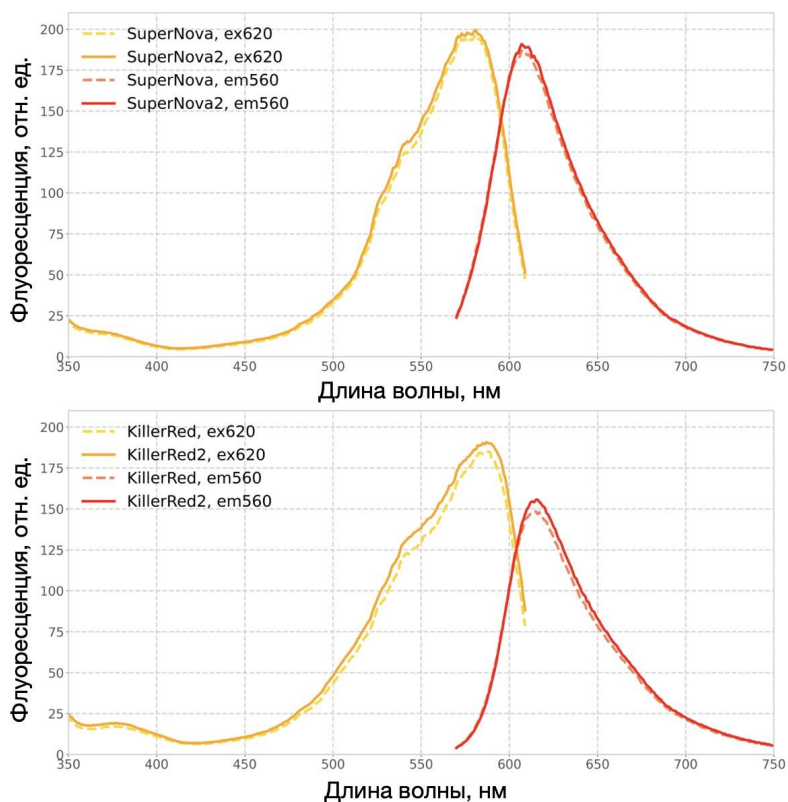


Рисунок 14. Спектры возбуждения (эмиссия при 620 нм) и эмиссии (возбуждение при 560 нм) очищенных белков (А) SuperNova и SuperNova2; (Б) KillerRed и KillerRed2.

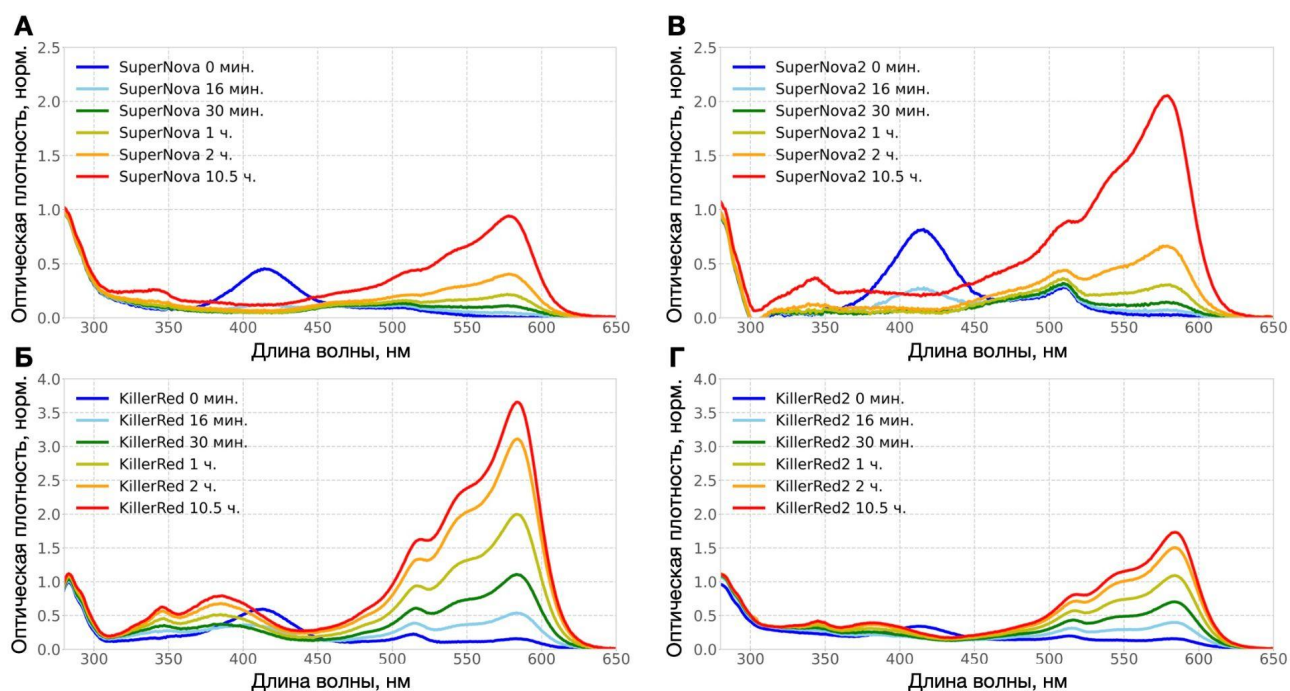


Рисунок 15. Кинетика спектров поглощения, демонстрирующая созревание хромофора *in vitro* для белков: (А) SuperNova; (Б) KillerRed; (В) SuperNova2; (Г) KillerRed2. Спектры нормированы на поглощение при 280 нм.

3.3.4 Измерение фототоксичности белков SuperNova2 и KillerRed2 в бактериях

Мы решили выяснить, как мутация S10R влияет на яркость и фототоксичность белков KillerRed и SuperNova внутри клеток бактерий. У бактериальных колоний, экспрессирующих SuperNova2, яркость была более чем в четыре раза выше чем у бактерий, экспрессирующих

SuperNova. В то же время KillerRed2 был немного более тусклым, чем исходный белок (**Рисунок 16**).

Фототоксичность в бактериях измеряли путем оценки изменения соотношения красных и зеленых клеток в смеси бактерий, экспрессирующих фототоксичный белок, и бактерий, экспрессирующих EGFP. Эксперименты проводили после 20 ч инкубации при 37°C и последующих 24 ч при комнатной температуре. Вкратце, мы смешали клетки *E. coli*, экспрессирующие GFP, и *E. coli*, экспрессирующие фототоксичный белок, в соотношении 1:1 и полученную смесь бактерий облучали оранжевым светом в течение разных промежутков времени. Затем облученные клетки высевали на чашку Петри. На следующий день подсчитывали зеленые и красные колонии и рассчитывали фототоксичность по изменению соотношения красных и зеленых колоний.

SuperNova2 продемонстрировал значительно более высокую фототоксичность, чем SuperNova, с почти 4-кратной разницей в количестве мертвых клеток, наблюдаемых после шести минут облучения (350 Дж/см²) (**Рисунок 16**), в то время как фототоксичность KillerRed2 была немного ниже, чем у KillerRed. Интересно, что когда эксперимент проводили без 24-часовой инкубации при комнатной температуре, SuperNova не обладал фототоксичным эффектом, а фототоксичность KillerRed и KillerRed2 была незначительно выше фототоксичности SuperNova2 (**Рисунок 17**). Это также указывает на то, что мутация S10R улучшает созревание белка SuperNova.

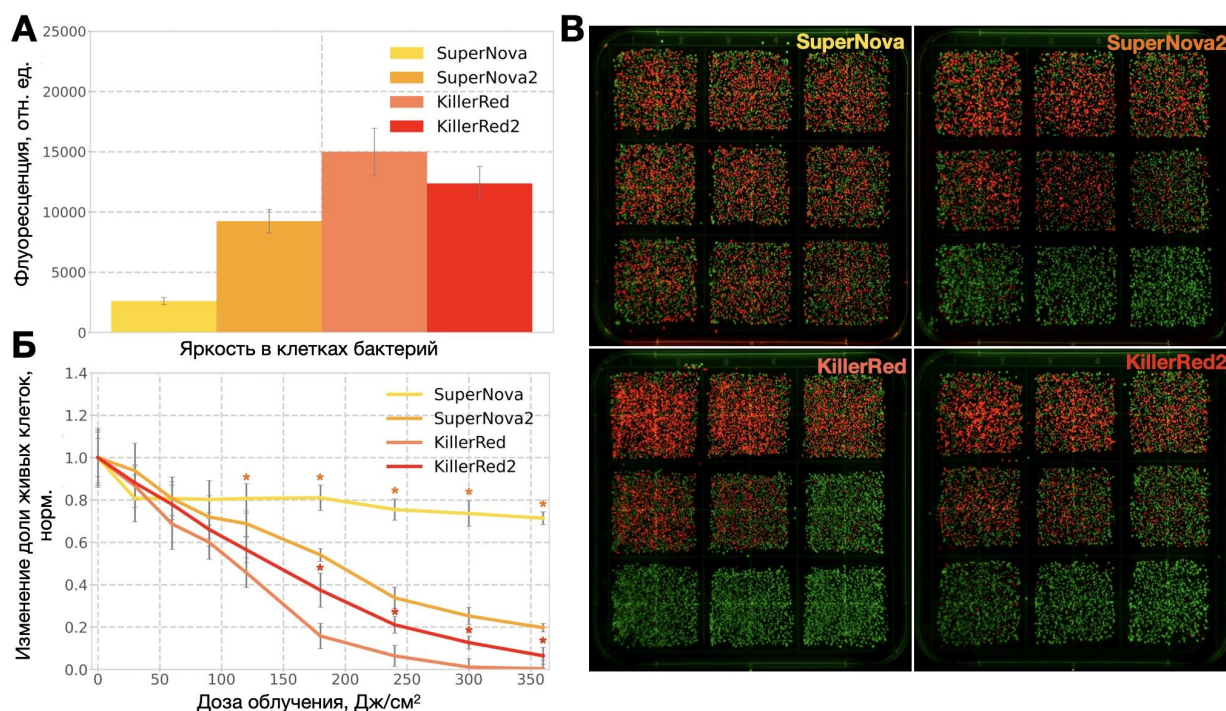


Рисунок 16. Экспрессия фототоксичных флуоресцентных белков в бактериях: (А) Яркость в клетках бактерий после инкубации в течение 20 часов при 37°C и 24 часов при комнатной температуре; (Б) Фототоксичность SuperNova, SuperNova2, KillerRed и KillerRed2 в клетках бактерий; (С) Фотографии чашек Петри с бактериальными колониями, экспрессирующими EGFP и один из фотосенсибилизаторов, после эксперимента по фототоксичности. Каждый квадратный участок на чашке представляет собой временную точку (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5 и 6 мин, что эквивалентно дозе облучения 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300 и 360 Дж/см². Порядок слева направо и сверху вниз). Ориентировочные значения дозы облучения, необходимые для уничтожения 50% клеток, показаны цветом на оси X на рисунке Б. * - p-value < 0.05 Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности SuperNova и SuperNova2, * - p-value < 0.05 Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности KillerRed и KillerRed2.

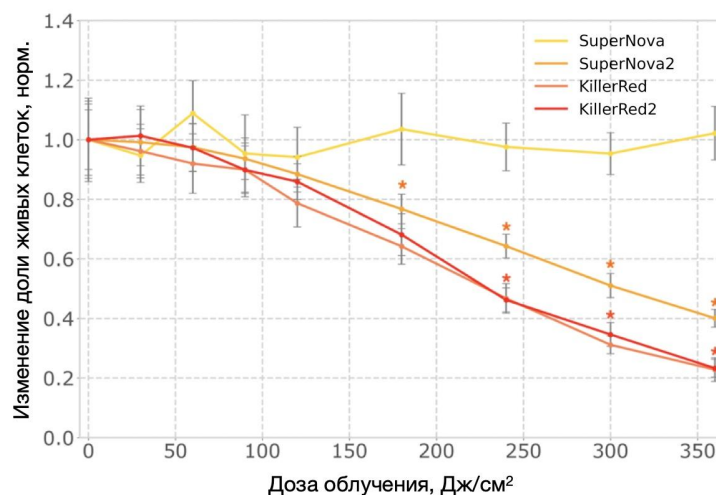


Рисунок 17. Фототоксичность SuperNova, SuperNova2, KillerRed и KillerRed2 в бактериях (эксперимент проводили после 20-часовой инкубации при 37 °С без дополнительной инкубации при комнатной температуре). * - p-value < 0.05 Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности SuperNova и SuperNova2, * - p-value < 0.05 Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности KillerRed и SuperNova2.

3.3.5 Измерение фототоксичности белков SuperNova2 и KillerRed2 в клетках млекопитающих

Мы также сравнили фототоксичность SuperNova, SuperNova2, KillerRed и KillerRed2 в культуре клеток млекопитающих. Одним из эффективных способов достижения фототоксического эффекта в клетках является направление фотосенсибилизатора в митохондрии или в плазматическую мембрану клетки. Для этого мы создали стабильные линии клеток HeLa Kyoto (**Рисунок 18, 19**), экспрессирующие один из фототоксичных белков с сигналами мембранной или митохондриальной локализации, соединенный с TagBFP2 через саморазрезающийся T2A пептид. TagBFP2 использовался в качестве референса, на который производили нормировку уровня экспрессии трансгена, чтобы исключить влияние разного уровня экспрессии на фототоксичность. Поэтому синяя флуоресценция референсного TagBFP2 использовалась при сортировке клеток, чтобы получить стабильные линии клеток с одинаковым уровнем экспрессии фотосенсибилизатора.

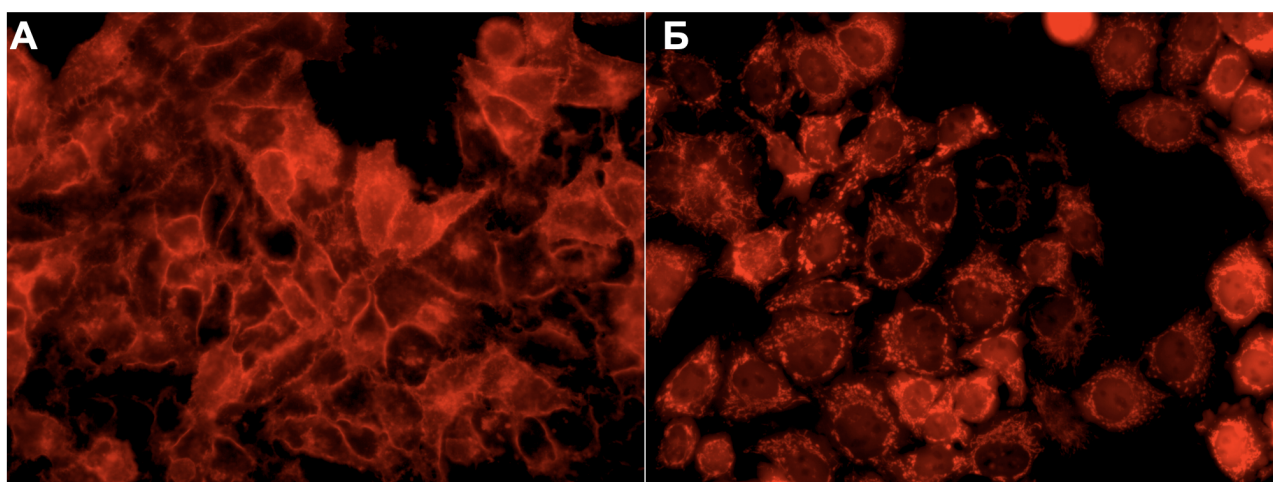


Рисунок 18. Стабильные линии клеток HeLa Kyoto, экспрессирующие (А) SuperNova2 с мембранной локализацией и (Б) SuperNova2 с митохондриальной локализацией. Широкопольный микроскоп, красный флуоресцентный канал.

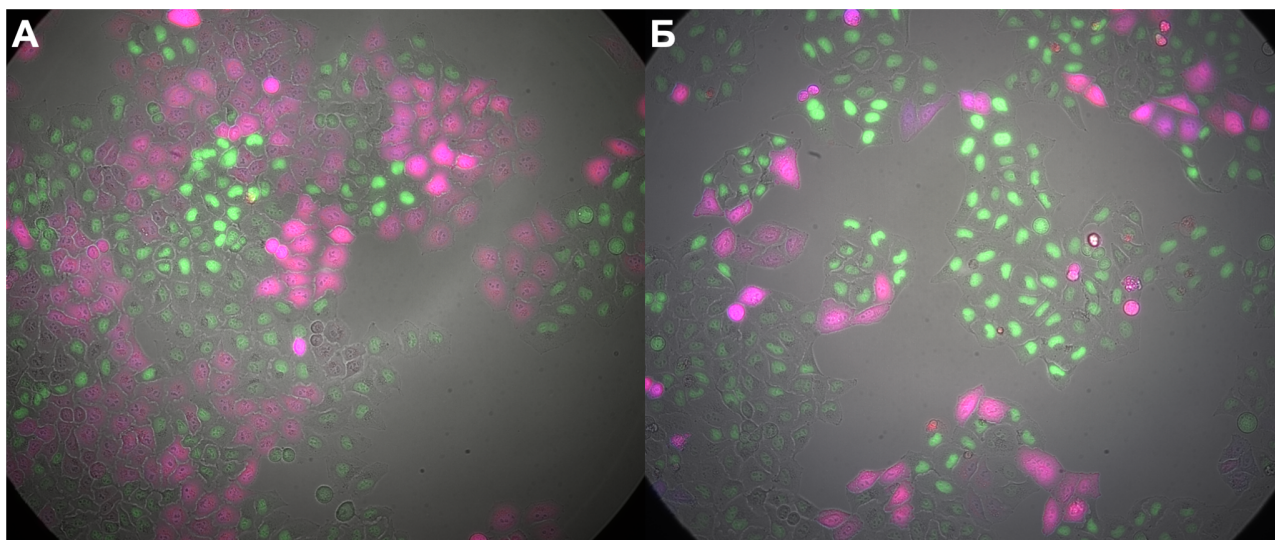


Рисунок 19. Популяции клеток линии HeLa Kyoto, экспрессирующих фототоксичный флуоресцентный белок SuperNova2 с митохондриальной локализацией с референсным белком TagBFP2, соединенный через T2A пептид, и EGFP с ядерной локализацией. (А) Не облученная светом популяция клеток, с практически равным соотношением клеток с SuperNova2 и EGFP; (Б) Облученная светом популяция клеток (доза облучения 115 Дж/см²), в которой соотношение клеток с SuperNova2 и EGFP изменилось в пользу клеток с EGFP. Широкопольный микроскоп, совмещенное изображение из четырех каналов: проходящий свет, синий, зеленый и красный флуоресцентные каналы.

В отличие от бактерий (**Рисунок 16, А**) в клетках млекопитающих и SuperNova2, и KillerRed2 были немного ярче, чем их родительские белки (**Рисунок 20, А**). Кроме того, они продемонстрировали более высокую фототоксичность (**Рисунок 20, Б-Д**). Так, например, при митохондриальной локализации при дозе облучения 40 Дж/см² SuperNova практически не проявляла фототоксического эффекта, в то время как популяция клеток, экспрессирующая SuperNova2, уменьшалась на 40% (**Рисунок 20, Б**). При мембранной локализации при дозах облучения около 150, 200, 250 Дж/см² количество живых клеток, экспрессирующих SuperNova2, в среднем было в два раза меньше, чем клеток, экспрессирующих SuperNova (**Рисунок 20, Г**). Чуть менее выраженное увеличение фототоксичности наблюдалось и для KillerRed2 (**Рисунок 20, В-Д**).

Мутация S10R приводит к более полному созреванию хромофора, что видно по увеличению видимой яркости внутри клетки. Мы полагаем, что увеличение доли белка со зрелым хромофором приводит к увеличению образования активных форм кислорода и, как следствие, увеличению фототоксичности. Интересно, что в клетках, экспрессирующих фотосенсибилизаторы, нацеленные на клеточную мембрану, низкие дозы света увеличивают пролиферацию клеток, в соответствии с наблюдениями, описанными в литературе.

3.3.6 Измерение скорости созревания белков SuperNova2 и KillerRed2 *in vivo*

Еще одним важным свойством фототоксичных флуоресцентных белков является скорость созревания их хромофоров *in vivo*. Более быстрое созревание приводит к более высокой концентрации фототоксичных молекул, что нелинейно соответствует наблюдаемому уровню фототоксичности. Чтобы сравнить скорость созревания красных генетически кодируемых фотосенсибилизаторов, мы использовали коэкспрессию с циановым флуоресцентным белком mTurquoise2 в качестве референса. Мы обнаружили, что в клетках млекопитающих скорость созревания KillerRed2 и SuperNova2 была в полтора раза выше, чем у родительских белков (**Рисунок 21**).

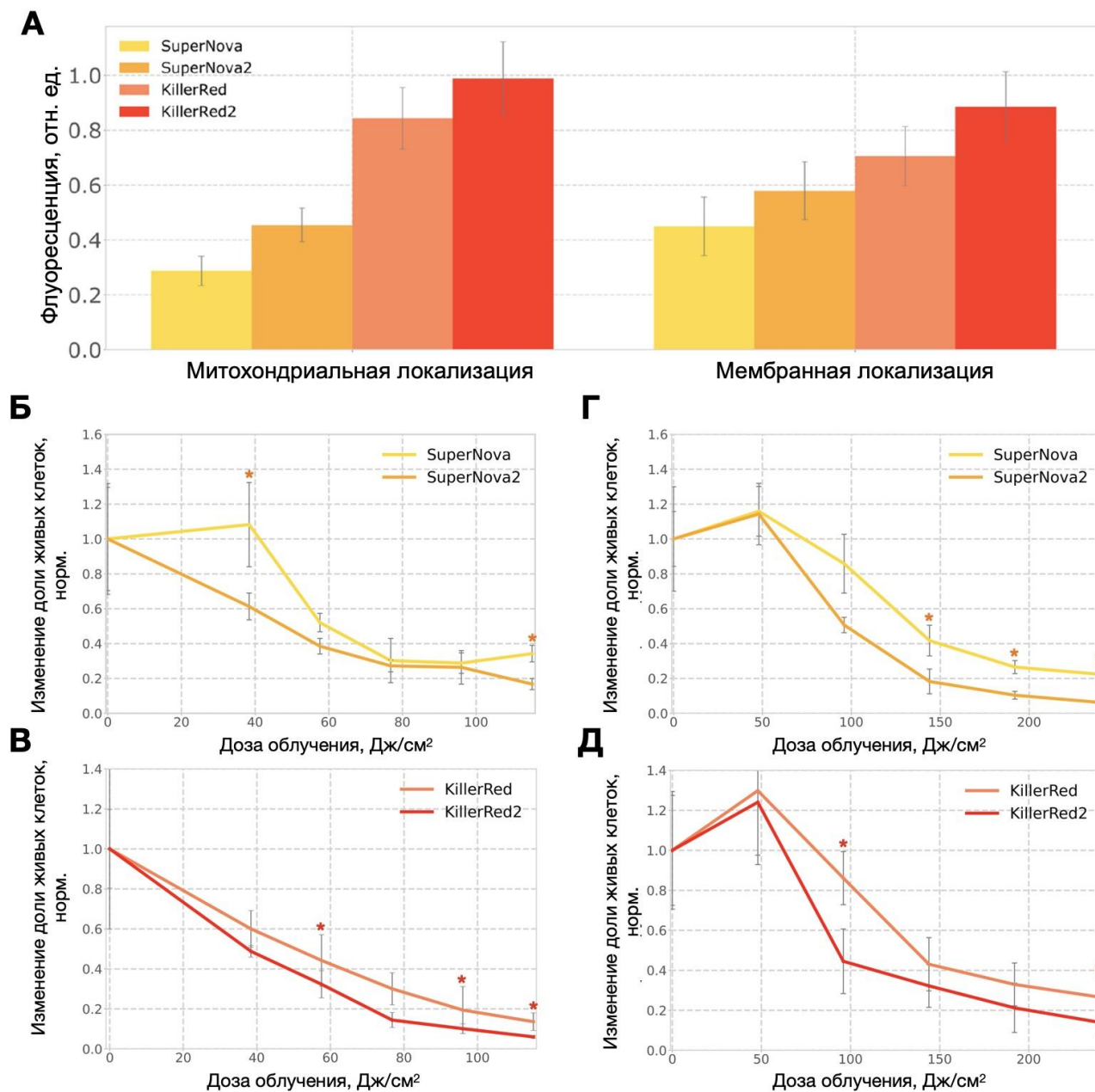


Рисунок 20. Экспрессия фототоксичных флуоресцентных белков в клетках HeLa Kyoto: (А) яркость клеток, экспрессирующих фототоксичные белки с митохондриальной и мембранной локализациями; (Б, В) Фототоксичность SuperNova2, SuperNova, KillerRed, KillerRed2 при митохондриальной локализации; (Г, Д) Фототоксичность SuperNova2, SuperNova, KillerRed, KillerRed2 при мембранной локализации. * - p-value < 0.05 Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности SuperNova и SuperNova2, * - p-value < 0.05 Статистически значимые различия при сравнении значений фототоксичности KillerRed и KillerRed2.

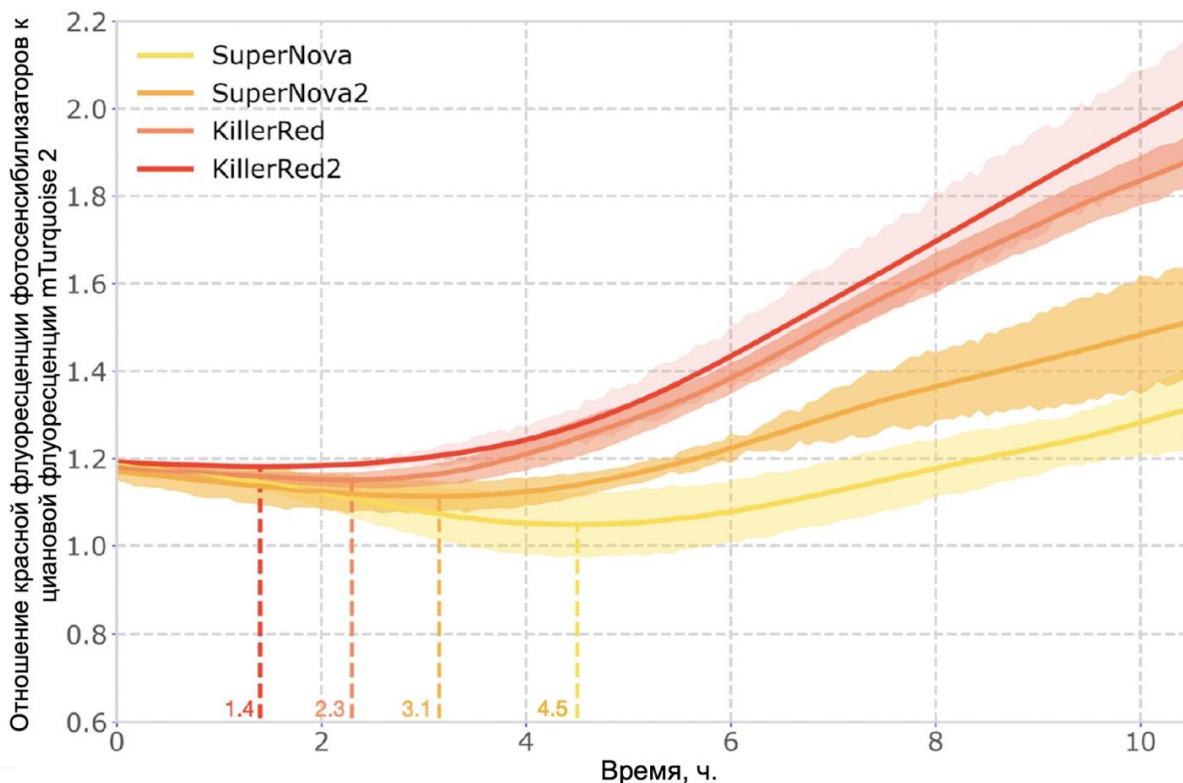


Рисунок 21. Динамика отношения красной флуоресценции фотосенсибилизаторов к циановой флуоресценции mTurquoise2 в клетках млекопитающих, коэкспрессирующих красные фототоксичные белки и mTurquoise2. Время, соответствующее экстремуму кривой (когда скорость накопления красной флуоресценции начинает превышать скорость накопления циановой флуоресценции), отмечено на оси X.

3.3.7 Измерение фотостабильности белков SuperNova2 и KillerRed2

Фотостабильность – еще один важный параметр флуоресцентных белков, который может влиять на их фототоксичность. Мы решили проверить фотостабильность KillerRed, SuperNova и их мутантов *in vivo* на стабильных линиях клеток Hela Kyoto, экспрессирующих фотосенсибилизаторы с мембранной и митохондриальной локализациями (**Рисунок 22**).

Как видно из полученных данных, мутация S10R практически не влияет на фотостабильность. Белки SuperNova и SuperNova2 имеют одинаковую фотостабильность, также как и KillerRed, KillerRed2. Интересно, что KillerRed/KillerRed2 оказались фотостабильнее, чем SuperNova/SuperNova2 примерно в 2-3 раза, в зависимости от локализации. Фотостабильность KillerRed/KillerRed2 при митохондриальной локализации в полтора раза больше, чем при мембранной локализации, в то время как фотостабильность SuperNova/SuperNova2 практически не зависит от локализации. Это может говорить о том, что SuperNova/SuperNova2 и KillerRed/KillerRed2 имеют разные pKa.

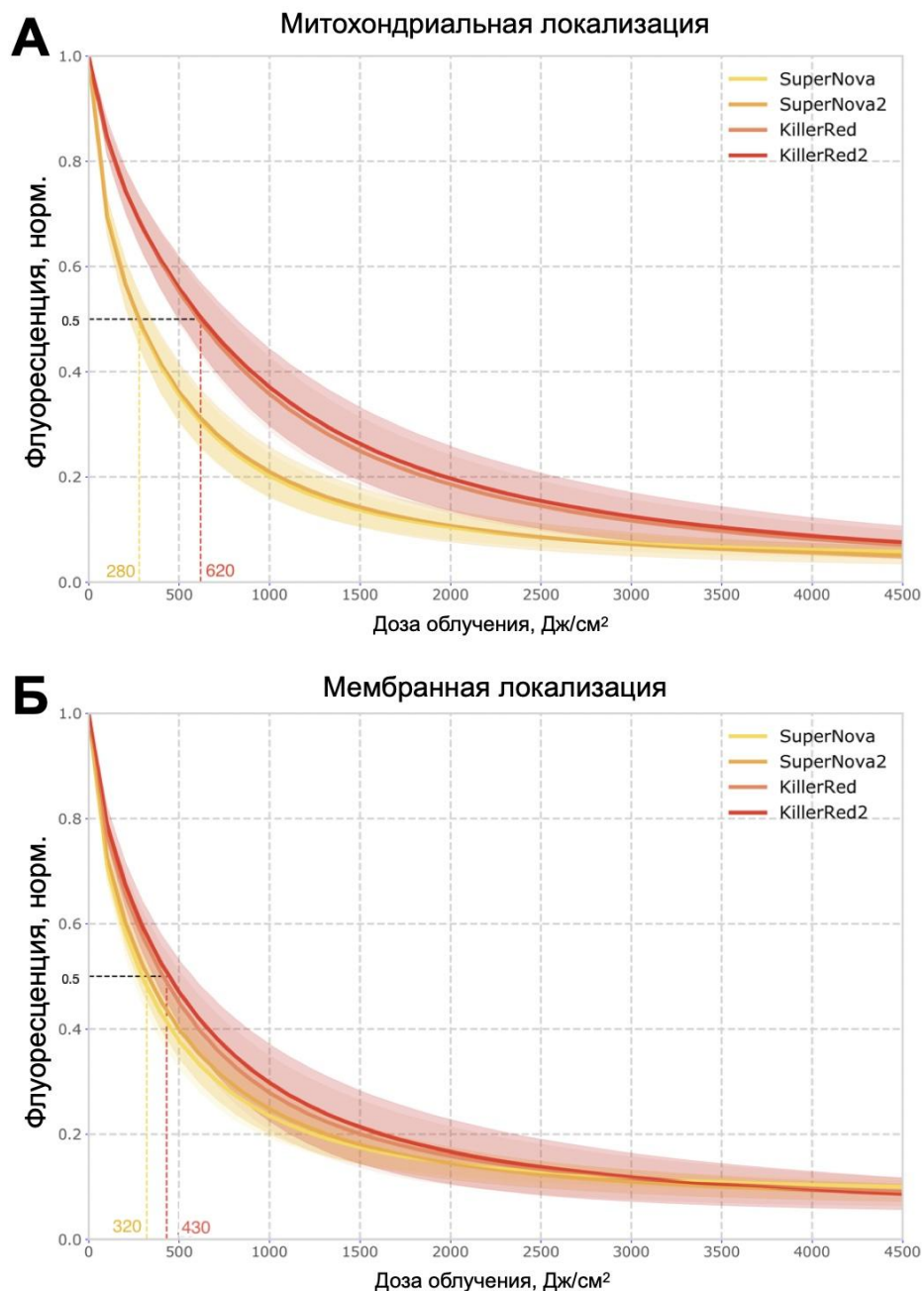


Рисунок 22. Фотостабильность SuperNova2, SuperNova, KillerRed и KillerRed2 *in vivo* при (А) митохондриальной и (Б) мембранной локализации. Доза облучения, необходимая для фотообесцвечивания 50% молекул, указана на оси X цветом.

4. Выводы

1. Разработанный количественный тест на фототоксичность для культур клеток млекопитающих и бактерий позволяет сравнить фототоксичность генетически кодируемых фотосенсибилизаторов.
2. Созданные новые фототоксичные белки KillerOrange и mKillerOrange активируются синим светом и могут быть использованы с KillerRed как вместе, так и независимо.
3. Мутация S10R в белках KillerRed и SuperNova увеличивает эффективность и скорость созревания красного хромофора и приводит к увеличению их фототоксичности в клетках бактерий и млекопитающих.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Sarkisyan KS*, Zlobovskaya OA*, **Gorbachev DA***, Bozhanova NG, Sharonov GV, Staroverov DB, Egorov ES, Ryabova AV, Solntsev KM, Mishin AS, Lukyanov KA. KillerOrange, a genetically encoded photosensitizer activated by blue and green light. *PLoS One* (2015), 10 (12), e0145287. *авторы внесли равный вклад в работу
2. Pletneva NV, Pletnev VZ, Sarkisyan KS, **Gorbachev DA**, Egorov ES, Mishin AS, Lukyanov KA, Dauter Z, Pletnev S. Crystal structure of phototoxic orange fluorescent proteins with a tryptophan-based chromophore. *PLoS One* (2015), 10 (12), e0145740.
3. **Горбачев Д.А.**, Саркисян К.С.. Мутант фототоксичного белка KillerRed, не формирующий DsRed-подобного хромофора. *Вестник РГМУ* (2019), 9 (6) 45–48.
4. **Gorbachev DA**, Staroverov DB, Lukyanov KA, Sarkisyan KS. Genetically encoded red photosensitizers with enhanced phototoxicity. *Int J Mol Sci* (2020), 21 (22) 1–12.
5. Yuzhakova DV, Shirmanova MV, Klimenko VV, Lukina MM, Gavrina AI, Komarova AD, **Gorbachev DA**, Sapogova NV, Lukyanov KA, Kamensky VA. PDT with genetically encoded photosensitizer miniSOG on a tumor spheroid model: A comparative study of continuous-wave and pulsed irradiation. *Biochim Biophys Acta* (2021), 1865 (12), 129978.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Gorbachev DA**, Sarkisyan KS, Mishin AS, Lukyanov KA, "New genetically encoded photosensitizers" FEBS Congress, Краков, Польша, 2019
2. **Gorbachev DA**, Sarkisyan KS, Mishin AS, Lukyanov KA, "Development of phototoxic fluorescent proteins by high-throughput sequencing-guided directed evolution," Janelia Junior Scientist Workshop on Protein Engineering: Making and Using Tools for Neuroscience and Other Biological Problems, Ashburn, США, 2018