

БУБЛИКОВ ГРИГОРИЙ СЕРГЕЕВИЧ

**ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МАРКЕРОВ
iRFP713, iRFP682 И iRFP670, СОЗДАНЫХ НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНЫХ
ФИТОХРОМОВ**

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

Кандидата биологических наук

03.01.03 – Молекулярная биология

Бубликов

Научные руководители:

кандидат биологических наук
Олеся Викторовна Степаненко

доктор физ.-мат. наук
Константин Константинович Туроверов

Санкт-Петербург

2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
<i>Актуальность исследования</i>	<i>5</i>
<i>Цели и задачи исследования</i>	<i>6</i>
<i>Основные положения, выносимые на защиту</i>	<i>7</i>
<i>Научная новизна работы.....</i>	<i>8</i>
<i>Теоретическое и практическое значение работы.....</i>	<i>8</i>
<i>Апробация работы.....</i>	<i>9</i>
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	13
<i>1.1. Бактериальные фитохромы</i>	<i>13</i>
<i>1.1.1 Классификация фитохромов.....</i>	<i>13</i>
<i>1.1.2. Доменная организация фитохромов</i>	<i>14</i>
<i>1.1.3. Структура бактериальных фитохромов.....</i>	<i>17</i>
<i>1.1.4 Фотосостояния бактериальных фитохромов: формы Pr, Pfr, Pnr.....</i>	<i>20</i>
<i>1.1.5. Узел полипептидной цепи – уникальный структурный элемент бактериальных фитохромов</i>	<i>23</i>
<i>1.1.5.1 Типы узлов в структуре различных белков.....</i>	<i>23</i>
<i>1.1.5.2 Функции узлов в белках</i>	<i>27</i>
<i>1.1.5.3 Фолдинг белков с узелковыми структурными элементами</i>	<i>28</i>
<i>1.2. Хромофоры бактериальных фитохромов.....</i>	<i>31</i>
<i>1.3. Флуоресцентные маркеры на основе бактериальных фитохромов.....</i>	<i>32</i>
<i>1.3.1 Разработка флуоресцентных маркеров</i>	<i>32</i>
<i>1.3.1.1. Биомаркеры серии IFP.....</i>	<i>32</i>
<i>1.3.1.2 Биомаркеры серии iRFP.....</i>	<i>33</i>
<i>1.3.1.3 Белок iSplit.....</i>	<i>34</i>
<i>1.3.1.4. Фотоактивируемые ближне-инфракрасные флуоресцентные белки.....</i>	<i>35</i>
<i>1.3.2 Использование флуоресцентных маркеров на основе бактериальных фитохромов для прижизненной визуализации клеточных процессов.....</i>	<i>36</i>
<i>1.3.3 Использование ближне-инфракрасные флуоресцентные белки в передовых технологиях получения изображений.</i>	<i>39</i>
<i>1.3.4 Использование бактериальных фитохромов в оптогенетике</i>	<i>40</i>
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	41
<i>2.1. Материалы</i>	<i>41</i>
<i>2.2. Методы</i>	<i>41</i>
<i>2.2.1. Анализ пространственной структуры белков.....</i>	<i>41</i>
<i>2.2.2. Флуоресцентные измерения</i>	<i>42</i>
<i>2.2.3. Регистрация и анализ кривых затухания флуоресценции.....</i>	<i>43</i>
<i>2.2.4. Измерение спектров кругового дихроизма</i>	<i>43</i>
<i>2.2.5. Выделение и очистка белков.</i>	<i>44</i>
<i>2.2.6. Проведение микродиализа</i>	<i>50</i>
<i>2.2.7. Анализ процессов денатурации – ренатурации NIR FPs.</i>	<i>51</i>
<i>2.2.8. Анализ денатурационных зависимостей.</i>	<i>51</i>

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	53
3.1. Изучение физико-химических и спектральных свойств ближне-инфракрасного флуоресцентного белка iRFP713, полученного на основе бактериального фитохрома, и его отдельных доменов	53
3.2. Изучение спектральных свойств биливердина, его производных и аналогов в растворителях с различной полярностью и вязкостью. Изучение влияния температуры на фотофизические свойства биливердина	67
3.3. Определение параметров равновесного связывания ближне-инфракрасного флуоресцентного белка на основе бактериального фитохрома с биливердином.....	73
3.4. Изучение кинетики взаимодействия флуоресцентного белка на основе бактериального фитохрома с биливердином и изменения структуры его холоформы при изменении внешних условий (например, кислотности, ионов металлов, окислительно-восстановительного потенциала)	76
3.5. Ковалентное и нековалентное связывание BV с мутантными формами iRFP713, iRFP682 и iRFP670	80
3.6. Структура и собственная УФ-флуоресценция NIR FPs и их мутантных вариантов с различным содержанием и локализацией цистеиновых остатков.	82
3.7. Спектральные свойства NIR FPs и их мутантных вариантов с различным содержанием и локализацией цистеиновых остатков.	89
3.8. Структура хромофора, ковалентно связанного с остатком Cys256 в GAF домене BphPs.	96
3.9. Стабильность NIR FPs и их мутантных форм.....	99
3.10. Процессы денатурации–ренатурации NIR FPs и их мутантных форм	106
3.11. Влияние краудинг-агентов на структуру и процессы денатурации флуоресцентных белков на основе бактериальных фитохромов	114
ВЫВОДЫ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

A	– параметр $A = I_{320}/I_{365}$
GdnHCl	– гуанидингидрохлорид
I_{320} и I_{365}	– интенсивность флуоресценции, зарегистрированная при длине волны 320 и 365 нм, соответственно
r	– анизотропия флуоресценции
BV	– биливердин
BphPs	– фоторецепторы бактериальные фитохромы
iRFP713	– инфракрасный флуоресцентный белок, значение 713 нм соответствует длине волны для максимума интенсивности флуоресценции
NIR FPs	– ближнее-инфракрасные флуоресцентные белки (биомаркеры)
PDB	– Protein data bank
PCB	– фикоцианобилин
CBD	– хромофор связывающий модуль (домен)
Dr	– <i>Deinococcus radiodurans</i>
RpBphP2	– <i>Rhodopseudomonas palustris</i>
Cph	– cyanobacterial phytochrome
PAS	– per-arnt-sim domain
GAF	– cGMP-specific phosphodiesterases, adenyl cyclases and FhlA
PHY	– phytochrome
HK	– histidine kinase
Pr	– red form
Pnr	– near-red form
Pfr	– far-red form
BiFC	– методом комплементации флуоресценции
PAiRFP	– фотоактивируемый iRFP
OD	– оптическая плотность
CD	– круговой дихроизм
θ	– молярная эллиптичность
TCEP	– tris(2-carboxyethyl)phosphine
PEG	– polyethylene glycol
DMSO	– dimethyl sulfoxide
PMSF	– phenylmethanesulfonyl fluoride
EDTA	– этилендиаминтетрауксусная кислота

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Прижизненная визуализация процессов, происходящих в клетках, тканях и в целом организме с высоким разрешением в реальном масштабе времени, является одной из фундаментальных задач молекулярной и клеточной биологии. Существенной вехой в решении этой задачи явилось открытие флуоресцентных белков и осознание того, что на их базе можно получать белки слияния с белками-мишенями и использовать их в качестве биомаркеров, позволяющих получать информацию о локализации целевых белков и протекании процессов, в которых они участвуют. В настоящее время усилия многих научных лабораторий мира направлены на создание биомаркеров с улучшенными характеристиками и, в частности, на создание биомаркеров, отвечающих так называемому ближне-инфракрасному «окну прозрачности» тканей (650–900 нм), где уже не поглощает гемоглобин эритроцитов и меланин и еще не поглощает вода. Однако спектры даже самых «длинноволновых» флуоресцентных белков не удовлетворяли этим условиям. Решением этой проблемы может стать использование в качестве флуоресцентных маркеров комплексов бактериальных фитохромов (BphPs) с биливердином (BV) – хромофором, который является продуктом распада гема и который всегда имеется в тканях животных и человека. Новые флуоресцентные маркеры на основе бактериальных фитохромов будут, несомненно, востребованы как при проведении фундаментальных исследований в области клеточной и молекулярной биологии, так и в медицине, поскольку их использование может в ряде случаев заменить рентген и томографию при том, что их использование безвредно для организма.

Принятые сокращения:

BV – биливердин; BphPs – бактериальные фитохромы; NIR FPs – ближнеинфракрасные флуоресцентные белки на основе BphPs; iRFP713, iRFP682 и iRFP670 – NIR FP с максимумами спектров флуоресценции при 713, 682 и 670 нм, соответственно; GdnHCl – гуанидингидрохлорид.

К настоящему времени создан ряд флуоресцентных биомаркеров на основе бактериальных фитохромов. В то же время систематического изучения физико-химических свойств этих белков не проводилось. В связи с этим актуальной задачей является изучение их стабильности и конформационных изменений при воздействии денатурирующих агентов, процессов фолдинга – анфолдинга, роли лиганда в стабилизации белка, изучение зависимости различных спектральных характеристик от структуры белка, локализации цистеиновых остатков, способных связывать BV, типах связывания BV с белком и т.д. Можно полагать, что такие исследования позволят объяснить спектральные свойства BV в уже созданных молекулярных маркерах и разработать стратегию создания новых маркеров с заданными спектральными и фотофизическими характеристиками.

Цели и задачи исследования

Цель работы состояла в выяснении факторов, определяющих спектральные свойства, квантовый выход и молекулярную яркость флуоресценции димерных флуоресцентных белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670, созданных на основе бактериальных фитохромов.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести изучение процессов сворачивания – разворачивания флуоресцентного белка iRFP713; выяснить роль узла, образованного его аминокислотной последовательностью, в процессах их сворачивания – разворачивания;
2. Провести сравнительное изучение спектральных свойств димерных белков iRFP682 и iRFP670, имеющих, в отличие от iRFP713, в каждом мономере два цистеиновых остатка, потенциально способных связывать BV;
3. Создать мутантные формы белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670, имеющие цистеиновые остатки, способные связывать BV, в PAS или в GAF доменах каждого мономера (iRFP670/C256S, iRFP682/C256S, iRFP713 и iRFP670/C15S, iRFP682/C15S и iRFP713/C15S/V256C, соответственно), имеющие цистеиновые остатки как в PAS, так и в GAF доменах (iRFP670, iRFP682 и

iRFP713/V256C), и не имеющие цистеиновых остатков вовсе (iRFP670/C15S/C256S, iRFP682/C15S/C256S и iRFP713/C15S);

4. Изучить спектральные свойства и процессы разворачивания – сворачивания созданных мутантных рекомбинантных форм белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Необратимость денатурации iRFP713 в холоформе и агрегация молекул белка при попытке ренатурации из развернутого состояния обусловлена наличием хромофора, связанного с белком ковалентно. Белок iRFP713 в апоформе сохраняет структуру, присущую холоформе белка, и способен взаимодействовать с BV в соотношении 1:1. Конформация и микроокружение хромофора в образующемся комплексе и в нативном холобелке совпадают;
- Наличие узла в структуре белка не препятствует эффективному рефолдингу iRFP713;
- BV, встроенный в карман GAF домена, но не связанный ковалентно или связанный ковалентно с Cys 15 NIR FP, имеет длинноволновые полосы поглощения и флуоресценции;
- BV, встроенный в карман GAF домена и ковалентно связанный с Cys 256 NIR FP, имеет коротковолновые полосы поглощения и флуоресценции, более высокий квантовый выход флуоресценции по сравнению с BV, связанным с Cys 15 или не связанным ковалентно;
- Мутантная форма iRFP713/V256C имеет самый высокий из всех созданных на сегодняшний день NIR FP квантовый выход флуоресценции, яркость флуоресценции *in vivo* и *in vitro*;
- Спектральные свойства димерных NIR FP в значительной мере определяются межмономерным и междоменным аллостерическим влиянием цистеиновых остатков, которое препятствует или способствует ковалентному связыванию BV во втором мономере димерных NIR FPs.

Научная новизна работы:

Впервые показано, что ковалентно связанный BV препятствует процессу ренатурации NIR FP, в то время как наличие узла в аминокислотной последовательности не препятствует этому процессу;

Впервые показано, что цистеиновый остаток в GAF домене белков iRFP682 и iRFP670 (Cys256) способен связывать BV ковалентно;

Выявлено аллостерическое влияние мономера, в котором BV ковалентно связан с Cys256, на второй мономер димерных белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670;

Впервые показано, что наиболее узкие и коротковолновые спектры поглощения и флуоресценции имеют белки с двумя цистеиновыми остатками Cys15 и Cys256, локализованными в PAS и в GAF доменах;

Создана новая мутантная форма iRFP713/V256C, которая имеет наибольший, среди известных к настоящему времени флуоресцентных белков на основе бактериальных фитохромов квантовый выход и молекулярную яркость флуоресценции.

Теоретическое и практическое значение работы

Установлена причина необратимости денатурации NIR FP – наличие BV, ковалентно связанного с полипептидной цепью белка, но не наличие узла в его структуре;

Обнаружено аллостерическое влияние связывания BV с цистеиновым остатком одного из мономеров димерных белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670 на связывание BV с цистеиновым остатком второго мономера;

Обнаружено аллостерическое влияние наличия цистеиновых остатков в PAS домене димерных белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670 на способность связывания BV с цистеиновыми остатками в GAF домене. Полученные данные представляют теоретический интерес для понимания спектральных свойств флуоресцентных маркеров, созданных на основе бактериальных фитохромов;

Данные о спектральных свойствах и процессах сворачивания – разворачивания димерных белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670 могут иметь

важное практическое значение при разработке новых флуоресцентных биомаркеров;

Результаты работы используются при проведении лекционно-практических занятий для студентов 4 курса Кафедры биофизики СПбГПУ.

Личный вклад автора

Все экспериментальные процедуры, описанные в работе, проведены автором лично. Материалы, которые автор представил в настоящей работе, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

Апробация работы

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ в отечественных и зарубежных рецензируемых изданиях (3 статьи и 9 тезисов). Материалы работы были представлены на следующих съездах, симпозиумах и конференциях:

- XXI Международной школе-семинаре "Spectroscopy of molecules and crystals", Береговое, Украина, 22-29 сентября 2013 г.;
- IV Конференции молодых ученых Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, 18–20 марта 2014 г.;
- 32-м Европейском конгрессе по молекулярной спектроскопии, Дюссельдорф, Германия, 24 – 29 августа 2014 г.;
- XVI Международном симпозиуме по люминесцентной спектроскопии: фундаментальные основы и применение, Патрас, Греция, 24-27 сентября 2014 г.;
- Тематической конференции Американского биофизического общества "Significance of Knotted Structures for Function of Proteins and Nucleic Acids", Варшава, Польша, 17-21 сентября 2014 г.;
- Десятой Санкт-Петербургской конференции молодых ученых с международным участием «Современные проблемы науки о полимерах»,

проводимой Институтом высокомолекулярных соединений РАН, Санкт-Петербург, Россия, 10-13 ноября 2014 г.;

- V съезде биофизиков России. Ростов на Дону, Россия, 4-10 октября 2015 г.;
- Международной конференции «Физика. СПб», проводимой Физико-техническим институтом им. А.Ф. Иоффе РАН, Санкт-Петербург, 26—29 октября 2015 г.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Stepanenko Olesya V., Bublikov G. S., Stepanenko Olga V., Shcherbakova D. M., Verkhusha V. V., Turoverov K. K., Kuznetsova I. M. (2014). A knot in the protein structure – probing the near-infrared fluorescent protein iRFP designed from a bacterial phytochrome. *FEBS J.* 281: 2284–2298.
2. Степаненко Олеся В., Бубликов Г. С., Степаненко Ольга В., Рычков Г.Н., Поварова О.И., Верхуша В.В., Туроверов К.К., Кузнецова И.М. (2015). Узлы в структуре белков. *Цитология* 57(3): 177–183.
3. Stepanenko Olesya V., Baloban M., Bublikov G. S., Shcherbakova D. M., Stepanenko Olga V., Turoverov K. K., Kuznetsova I.M. and Verkhusha V.V. (2016) Allosteric effects of chromophore interaction with dimeric near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes. *Scientific Reports* 6:18750:1–13; suppl. 1–10;

Тезисы:

1. Stepanenko Olesya V., Bublikov G. S., Verkhusha V.V., Kuznetsova I. M. (2013). The unfolding-refolding of iRFP derived from bacterial phytochrome. XXI International school-seminar “Spectroscopy of molecules and crystals. Abstract book (Beregove, Ukraine), p. 266.
2. Степаненко Олеся В., Бубликов Г.С., Степаненко Ольга В., Туроверов К.К., Кузнецова И.М. (2014). Физико-химические свойства флуоресцентного белка iRFP – ближне-инфракрасного биомаркера нового поколения. IV Конференция молодых ученых Института цитологии РАН. Тезисы докладов. (Санкт-Петербург). *Цитология* 56 (5): 379–380.

3. Bublikov G.S., Stepanenko Olesya V., Stepanenko Olga V., Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V., Turoverov K.K., Kuznetsova I.M. (2014). Spectral properties of biliverdin in solution and in near-infrared fluorescent protein iRFP. 32th European Congress on Molecular Spectroscopy. (Dusseldorf, Germany). Abstract book, p. 269.
4. Stepanenko Olesya V., Shcherbakova D.M., Bublikov G.S., Verkhusha V.V., Turoverov K.K., Kuznetsova I.M. (2014). The chromophore prevents the refolding of the near-infrared fluorescent protein iRFP designed from bacterial phytochrome. XVI International Symposium on Luminescence Spectrometry ISLS 2014: Fundamentals and Applications. (Rhodes, Greece). Abstract book P43.
5. Stepanenko Olesya V., Bublikov G.S., Stepanenko Olga V., Verkhusha V.V., Turoverov K.K., Kuznetsova I.M. (2014). The knot and chromophore of near-infrared fluorescent probe iRFP: impact on protein folding. Biophysical Society Thematic Meeting "Significance of Knotted Structures for Function of Proteins and Nucleic Acids" (WARSAW, POLAND). Abstract book, p. 93.
6. Bublikov G.S., Stepanenko Olesya V., Stepanenko Olga V., Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V., Turoverov K.K., Kuznetsova I.M. (2014). Near-infrared biomarker iRFP713: complex formation with biliverdin, spectral characteristics, the role of knot in protein structure and folding. 10th Saint-Petersburg Young Scientists Conference. (Saint-Petersburg). p.80.
7. Бубликов Г.С., Степаненко Олеся В., Щербакова Д.М., Кузнецова И.М. (2015). "Флуоресцентные свойства димерных ближне-инфракрасных флуоресцентных маркеров на основе бактериальных фитохромов." Современные тенденции развития науки и технологий 3(2): 16-18.

8. Степаненко Олеся В., Бубликов Г.С., Балобан М.В., Щербакова Д.М., Кузнецова И.М., Туроверов К.К., Верхуша В.В. (2015). "Аллостерия в димерных ближне-инфракрасных белках iRFP713, iRFP 682 и iRFP670 на основе бактериальных фитохромов" V съезд биофизиков Росси. Ростов на Дону, Материалы докладов, том 1, стр.115.
9. Бубликов Г.С., Степаненко Олеся В., Щербакова Д.М., Кузнецова И.М., Верхуша В.В., Туроверов К.К. (2015). "Биливердин как хромофор ближне-инфракрасных биомаркеров." Физика.СПб/2015. Международная конференция. Санкт-Петербург, стр. 47–49.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Бактериальные фитохромы

1.1.1 Классификация фитохромов

Фитохромы относятся к классу фоторецепторов (или фоточувствительных пигментов), появление которых эволюционно было направлено на эффективное использование энергии света и защиты от повреждений, вызванных им. Действию света подвержено большинство организмов на земле. Свет является первичным источником энергии, ДНК-повреждающим агентом, источником генерации активных форм кислорода. Фоторецепторы вовлечены в сигнальные пути, активируемые светом. Поглощение света фоторецептором запускает конформационные изменения в его структуре, которые передаются на эффекторный домен (обычно этот домен обладает некоторой ферментативной активностью), это приводит либо к активации, либо к дезактивации эффекторного домена, что, в свою очередь, запускает сигнальный каскад. Впервые фитохромы были найдены в растениях (Butler et al., 1959), но сейчас известно, что эти белки широко распространены (Blumenstein et al., 2005; Brandt et al., 2008; De Riso et al., 2009; Froehlich et al., 2005; Wu et al., 1997), в том числе и в прокариотах (Hughes et al., 1997; Montgomery and Lagarias, 2002). Фитохромы воспринимают красный и дальне-красный свет посредством его поглощения простетической группой в составе белка, которая представляет собой линейную тетрапирольную молекулу (производное билина). Хромофором бактериальных фитохромов (BphPs) и фитохромов грибов является биливердин (BV); фитохромы цианобактерий и растений связывают фикоцианобилин (PCB) и фитохромобилин (PB), соответственно (Рис. 1.1) (Rockwell and Lagarias, 2010). Присоединение хромофора к апо-форме фитохромов из цианобактерий требует присутствия фермента лиазы, в то время как ковалентное связывание хромофора с фитохромами растений и бактерий осуществляется автокаталитически.

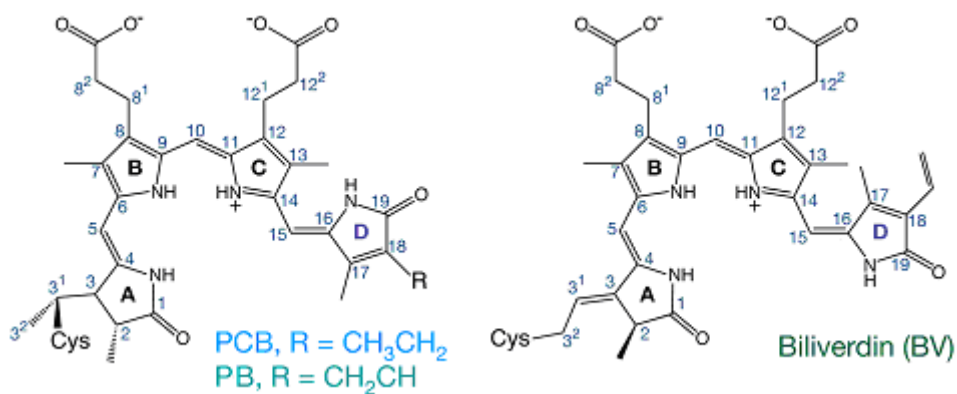


Рис. 1.1. Структура хромофоров фитохромов.

1.1.2. Доменная организация фитохромов

Бактериальные фитохромы представляют собой димерные молекулы, субъединицы которых, в свою очередь, образованы несколькими доменами, соединенными между собой α -спиральными участками. Связывание биливердина происходит в хромофор-связывающем домене белка (chromophore-binding domain, CBD), который в бактериальных фитохромах представлен двумя суб-доменами: PAS и GAF. PAS домен представляет собой тандемный повтор, который встречается в многочисленных рецепторных и регуляторных белках. Название домена PAS произошло из первых букв названий белков, в которых впервые были идентифицированы эти домены: транскрипционных регуляторных факторов биологических часов (PER белки) из *Drosophila melanogaster*, ядерного белка-переносчика арил-гидрокарбонового рецептора мыши (ARNT) и регуляторного белка Sim (Single-minded) из *Drosophila melanogaster*. Название домена GAF также являющегося акронимом названий белков, где этот домен был выявлен: цГМФ-зависимой фосфодиэстеразы (cGMP phosphodiesterase), аденил-циклазы (adenyl cyclase) и транскрипционного активатора FhlA. Домены GAF широко распространены в клетках растений и бактерий, они способны связывать различные типы небольших сигнальных молекул. N-концевой PAS домен фитохромов содержит остаток цистеина (Cys24 в фитохроме из *Deinococcus radiodurans*), к которому ковалентно пришивается хромофор; сам хромофор при этом располагается в кармане, образованном GAF доменом (Рис. 1.2). По-видимому, сначала хромофор встраивается в карман GAF домена, после чего создаются условия его ковалентного связывания с цистеиновым остатком, локализованным в PAS домене. В канонических фитохромах полипептидная цепь белка после CBD домена образует PHY домен, функция которого

фитохромы растений

фитохром Sph1 цианобактерий

бактериальные фитохромы

фитохромы грибов и водорослей

фитохром Sph2 цианобактерий

PAS domain (knot)
 other PAS domain
 GAF domain
 bilin
 B/G GAF domain
 Cys
 PHY domain
 H
 His kinase
 REC domain (RR)
 GGDEF domain
 EAL domain

Трехдоменную конструкцию PAS/GAF/PHY также называют фотосенсорным модулем (photosensory core module, PCM). Вслед за PCM модулем располагается эффекторный домен, который в большинстве случаев является гистидиновой киназой (Auldrige and Forest, 2011).

В бактериальных фитохромах могут быть и другие эффекторные домены. Например бактериофитохром BphG1 из бактерий *Rhodobacter sphaeroides* в качестве эффекторного домена содержит GGDEF/EAL модуль. Домены GGDEF, обладающий дигуанилатциклазной активностью и EAL, обладающий фосфодиэстеразной

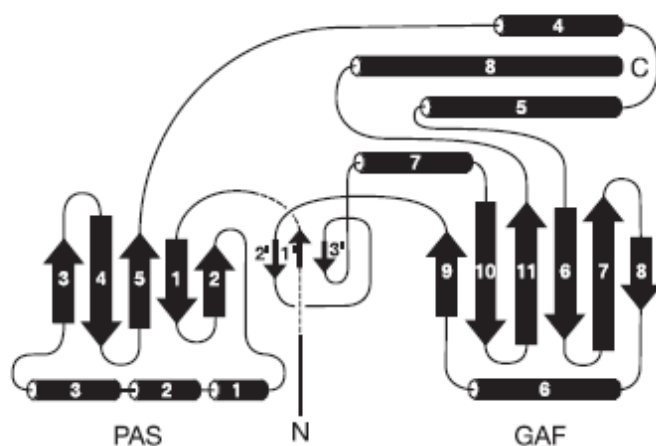
активностью, участвуют в регуляции уровня цикло-ди-ГМФ, известного вторичного мессенджера в бактериальных клетках. Интересно, что полноразмерный нативный BphG1 обладает только фосфодиэстеразной активностью, которая не регулируется светом. Отщепление EAL в BphG1 приводит к демаскировке дигуанилатциклазной активности, которая существенно активируется при облучении фрагмента PAS-GAF-PHY-GGDEF белка BphG1 светом. Какие функции проявляет BphG1 в нативных клетках в природе, происходит ли отщепление домена EAL и, если да, то каким образом это происходит, остается невыясненным (Tarutina et al., 2006). Бактериальный фитохром RpBphP1 из *R. palustris* имеет в качестве эффекторного домена PAS/PAC-HOS участок. Предполагают, что при фотоактивации RpBphP1 образует гетеродимеры с репрессорным белком RpPpsR2, что уменьшает количество функционально активных гомодимеров RpPpsR2 и, в результате, приводит к синтезу около 30 фотосинтетических генов (Bellini and Papiz, 2012).

Следует заметить, что только фитохромы, использующие в качестве хромофора биливердин IX α , (BV), а именно фитохромы бактерий, грибов и некоторых водорослей, имеют консервативный цистеиновый остаток в N-концевом участке PAS домена; в фитохромах растений и цианобактерий, использующих в качестве хромофора фикоцианобилин и фитохромобилин, консервативный цистеин расположен в GAF домене (Rockwell and Lagarias, 2010) (Рис. 1.2). Наблюдаются и другие различия в структуре фитохромов из разных организмов. Фитохромы растений и некоторых водорослей имеют дополнительные PAS домены, расположенные с С-конца от PCM модуля, и в их киназном домене отсутствует остаток His, являющийся объектом фосфорилирования в полноценных гистидиновых киназах. Фитохромы растений, грибов и водорослей, кроме того, имеют более длинные N-концевые участки, а фитохромы грибов и водорослей могут иметь дополнительные С-концевые домены. Наиболее разнообразны фитохромы цианобактерий. Они могут иметь каноническую структуру, состоящую из PAS/GAF/PHY/His-kinase доменов, как в случае Cph1 из цианобактерий *Synechocystis sp.*, или иметь фотосенсорный модуль, состоящий лишь из GAF/PHY, либо только GAF домена. В дальнейшем, мы сконцентрируемся на свойствах именно бактериальных фитохромов (Рис. 1.2).

1.1.3. Структура бактериальных фитохромов

Домен DrCBD фитохрома из *Deinococcus radiodurans*, был закристаллизован, что позволило определить его пространственную структуру методом рентгеноструктурного анализа. (Рис. 1.3) (Wagner et al., 2005; Wagner et al., 2007).

А



Б

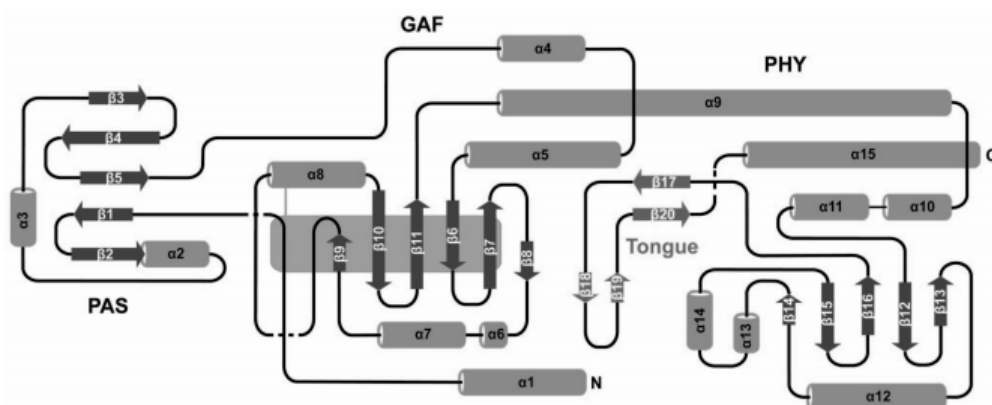


Рис. 1.3. Структура фитохромов. (Wagner et al., 2005; Wagner et al., 2007)

(А) Структура хромофор-связывающего домена DrCBD бактериального фитохрома из *Deinococcus radiodurans*;

(Б) Структура PMS модуля была разрешена только для фитохрома Cph1 из цианобактерий *Synechocystis sp.*

Было показано, что PAS домен DrCBD (аминокислоты 38 – 128) образован пятью антипараллельными β -тяжами ($\beta 2$, $\beta 1$, $\beta 5$, $\beta 4$ и $\beta 3$), фланкированными с одной стороны тремя α -спиралями ($\alpha 1$ – $\alpha 3$). Следующий GAF домен состоит из слоя шести антипараллельных β -тяжей ($\beta 9$, $\beta 10$, $\beta 11$, $\beta 6$, $\beta 7$ и $\beta 8$), расположенного между пучком из трех α -спиралей ($\alpha 4$, $\alpha 5$ и $\alpha 8$). Неструктурированный N-концевой участок из 35 остатков PAS домена и участок полипептидной цепи (остатки 225 – 257) GAF домена

образуют узел, который локализован между PAS и GAF доменами. Первоначально структура узла была ошибочно классифицирована как трилистный узел, в котором полипептидная цепь имеет 3 пересечения (Wagner et al., 2005), но рентгеноструктурные данные CBD фитохрома из *D. radiodurans* (DrCBD), полученные с большим разрешением, позволили отнести этот узел к типу «восьмерка» (figure-of-eight) с 4-мя пересечениями полипептидной цепи (Wagner et al., 2007). Структура узла стабилизирована небольшим гидрофобным ядром, в котором важную роль играет остаток Ile35, образующий Ван-дер-Ваальсовы контакты с остатками Val232, Leu234, Leu248 и Leu253. Узел скрепляется водородными связями между боковой цепью остатка Gln36 из N-концевого остатка и основной цепью остатков Ala225 и Arg254, расположенных непосредственно в начале и конце участка петли, формирующего «лассо».

Лиганд-связывающий сайт в GAF домене представляет собой щель, образованную между α -спиралями $\alpha 6$ и $\alpha 7$ с одной стороны и β -слоем с другой стороны. Во взаимодействии с хромофором принимают участие многочисленные аминокислоты и молекулы связанной воды. Необходимо отметить, что остатки Asp207-Ile208-Pro209, так называемого DIP мотива, являются консервативным для всех фитохромов. Остаток Pro209 ответственен за изгиб цепи между α -спиралями $\alpha 8$ и $\alpha 6$ GAF домена, что позволяет, остаткам DIP мотива взаимодействовать с хромофором.

К настоящему времени разрешены структуры РМС-модуля для фитохромов DrBphP, RpBphP2 и RpBphP3, Cph1 (Essen et al., 2008), имеющих темновое Pr-состояние, и фитохрома PaBphP (Yang et al., 2008), имеющего темновое Pfr-состояние. Было показано, что ядро РНУ домена образует типичную α/β укладку, в которой центральный антипараллельный β -слой из 5 β -тяжей окружен одиночной α -спиралью с одной стороны и пучком α -спиралей с другой (рис. 1.3, Б, 1.4). Таким образом, ядра РНУ и GAF доменов очень похожи, хотя гомология аминокислотной последовательности этих доменов порядка 10 %. Блоки PAS-GAF и РНУ образуют структуру, которая связана в двух точках. Во-первых, длинная α -спираль $\alpha 9$ (длина 66 Å) связывает два блока ковалентно. Вторая точка соприкосновения двух узлов в фитохроме обеспечивается необычным выступом (остатки Pro442 – Gln490, нумерация как в Cph1), напоминающим язык, между тяжом $\alpha 16$ и α -спиралью $\alpha 15$ РНУ домена. Этот необычный участок представляет собой длинную β -шпильку, которая простирается от РНУ домена по

направлению к PAS-GAF блоку. Эта шпилька присутствует во всех фитохромах и включает несколько высококонсервативных остатков, включая PRxSF мотив (Pro471 – Arg472 – x – Ser473 – Phe472), WGG (Trp450 – Gly451 – Gly452) и остаток Glu480. Различие размера шпильки фитохромов определяется, в основном, длиной концевой участка, который является частично неупорядоченным и, по-видимому, слабо взаимодействует с GAF доменом. Боковая цепь Arg472 из PRxSF мотива направлена внутрь хромофор-связывающего сайта и образует водородные связи с другим консервативным остатком, Asp207, который в свою очередь взаимодействует с хромофором. Остатки Trp450, Gly451 и Glu480 образуют водородные связи между собой и с атомами основной цепи, которые стабилизируют β -шпильку. Остаток Gly452 образует водородную связь с Arg472 и, вероятно, важен для правильной ориентации последнего.

Для понимания структурных механизмов, лежащих в основе фотоактивации, важным оказалось разрешение структуры РМС-модуля в фотоактивированном Pfr-состоянии. В настоящее время это удалось сделать только для фитохрома *DrBphP*, поскольку время жизни этого фитохрома в Pfr-состоянии относительно большое и темновая релаксация в Pr-состояние происходит медленно (порядка нескольких дней). Это позволило предложить модель передачи светового сигнала, воспринимаемого хромофором, на эффекторный домен. Согласно этой модели, мелкомасштабные конформационные изменения хромофора при его переходе из Pr- в Pfr- состояние постепенно накапливаются, приводя сначала к изменению структуры β -ветви на α -спираль в участке шпильки РНУ домена, который контактирует с хромофором. Это в свою очередь вызывает крупномасштабные структурные изменения, приводящие к изгибу длинных α -спиралей, соединяющих РНУ и НК, что вызывает глобальное изменение пространственной структуры белка и изменение расстояния между эффекторными доменами разных мономеров белка в димере. Сопоставление структуры РМС-модуля *DrBphP* в фотоактивированном Pfr-состоянии, со структурой РМС-модуля *PaBphP* в темновом Pfr-состоянии и структурой РМС-модулей *Cph1*, *DrBphP* и *RpBphP2* и *RpBphP3* в темновых Pr-состояниях, позволяет предполагать, что данный механизм запуска сигнала является общим для бактериальных фитохромов с эффекторным доменом НК, вне зависимости от начального темнового состояния. К настоящему времени структура полноразмерных бактериальных фитохромов не разрешена.

1.1.4 Фотосостояния бактериальных фитохромов: формы Pr, Pfr, Pnr

Бактериальные фитохромы могут существовать в трех состояниях, отличающихся конформацией хромофора и поглощающих в области 630-660 нм (Pnr-форма), 680-710 нм (Pr-форма) и 740-760 нм (Pfr-форма). Большинство фитохромов в темноте находятся в Pr-состояние, которое рассматривается как основное неактивное состояние. В Pr-форме хромофор положительно заряжен, поскольку остатки азота во всех четырех пирольных кольцах протонированы. Лишь некоторые фитохромы в темноте приобретают Pfr (или Pnr) состояние. Как отмечалось выше, в темноте Pfr-состояние имеют фитохромы PaBphP из *Pseudomonas aeruginosa*, RpBphP1 и RpBphP5 из *R. Palustris* (Bellini, Papiz, 2012; Tashler et.al., 2005).

В Pnr-форме пирольное D-кольцо хромофора, по-видимому, находится полностью вне плоскости остальной части молекулы BV (плоскости колец A, B и C), что нарушает электронное сопряжение этого кольца с хромофором (остальной частью молекулы) (Yang et al., 2015). В Pr и Pfr-формах D-кольцо находится в цис- и транс-конформации, соответственно, и сопряжено с остальной частью хромофора.

Недавно был выполнен анализ Pr-формы в Pfr-форм фитохрома из цианобактерий Cph1 методом ЯМР (Song et al., 2011). Было показано, что в Pfr-форме хромофор и его микроокружение имеют жесткую упорядоченную структуру, а в Pr-форме взаимодействия хромофора с его микроокружением гораздо слабее, сам хромофор и хромофор-связывающий карман более подвижны (Song et al., 2011). Высказано предположение, что увеличенная подвижность Pr-формы фитохромов является способом предотвращения передачи сигнала из-за тепловых флуктуаций, т.е. снижает уровень «шума».

Переходы между состояниями Pnr, Pr и Pfr ($Pnr \leftrightarrow Pr$ и $Pr \leftrightarrow Pfr$ переходы) происходит под действием облучения светом с определенной длиной волны. Этот процесс является сложным, сопровождается изомеризацией хромофора вокруг связи C15=C16 между C и D-пирольными кольцами, временным отщеплением и связыванием протона, при этом образуется несколько промежуточных фотопродуктов, таких как Lumi-R, Meta-Ra и Meta-Rc. Изомеризация хромофора при переходе в Pfr-форму приводит к конформационным изменениям в структуре белка и, в конечном итоге, запускает передачу сигнала, поэтому Pfr-форму называют сигнальной. Обратный

переход из Pfr-формы в основную Pr-форму может осуществляться либо медленно при помощи тепловой релаксации, либо быстро под действием облучения дальне-красным светом. В виду эффективной безызлучательной дезактивации Pr-формы посредством ее перехода в Pfr-форму большинство бактериальных фитохромов имеют невысокий квантовый выход. Следует заметить, что функция PNY домена вероятно не сводится к односторонней передаче «информации о поглощении света» от GAF домена к эффекторному домену. В отсутствии PNY домена происходит ингибирование фотоконверсии хромофора из Pr- в Pfr-форму в «укороченных» белковых конструкциях, содержащих лишь PAS и GAF домены.

Предполагается, что разрушение водородной связи между остатком Asp207 GAF домена и остатком Arg PNY домена затрагивает процесс временного переноса протона, происходящего при фотоконверсии (Toh et al., 2011; Wagner et al., 2008). Ингибирование переноса протона при удалении PNY домена заметно уменьшает эффективность безызлучательной дезактивации возбужденного состояния хромофора посредством фотоконверсии. При этом значительно увеличивается время жизни возбужденного состояния «укороченных» фитохромов и возрастает квантовый выход флуоресценции белка (Toh et al., 2010). В тоже время, введение мутаций, которые приводят к мономеризации укороченной формы канонического фитохрома из *Deinococcus radiodurans* DrCBD, восстанавливает процессы фотоконверсии из Pr-формы в Pfr-форму (Auldrige et al., 2012). Ингибирование фотоконверсии, наблюдаемое в укороченных димерных формах бактериальных фитохромов, в нативных полноразмерных белках преодолевается за счет PNY домена, который воспринимает конформационные изменения, вызванные изомеризацией хромофора при фотоконверсии, и передает их на эффекторный домен. В мономерных укороченных формах бактериальных фитохромов ингибирование фотоконверсии снимается, вероятно, за счет увеличенной конформационной свободы спиральных участков, которые в димерных молекулах находятся в области взаимодействия субъединиц и плотно упакованы (Auldrige et al., 2012).

Некоторые нетипичные бактериальные фитохромы, такие как *RpVphP3* из *Rhodopseudomonas palustris*, флуоресцируют в основном состоянии. Изучение таких фитохромов помогает понять механизмы флуоресценции бактериальных фитохромов. Для VphP3 было показано, что высокий квантовый выход белка обусловлен

стабилизацией Pr-формы белка при образовании трех водородных связей между D-кольцом биливердина и боковыми цепями аминокислот белка (Ser297, His299 и Lys183), которые отсутствуют в канонических фитохромах (Toh et al., 2011; Toh et al., 2010). Эти взаимодействия уменьшают вероятность изомеризации вокруг связи C15=C16 между C и D-пирольными кольцами и, таким образом, увеличивают вероятность дезактивации возбужденного состояния хромофора с излучением. Соответственно *RpBphP3* характеризуется большим временем жизни в возбужденном состоянии (порядка 300 псек) и существенным квантовым выходом равным 0.043 по сравнению с чем остальными фитохромами.

Таким образом, увеличение квантового выхода флуоресценции бактериальных фитохромов можно достичь одним из трех способов, либо их комбинацией: 1) стабилизацией Pr-конформации, как это наблюдается в BphP3; 2) ингибированием переноса протона в возбужденном состоянии; 3) дестабилизацией Pfr-конформации (Auldrige et al., 2012).

Действительно, было показано, что введение мутаций D207N в каноническом фитохроме из *Deinococcus radiodurans*, а именно в его «укороченной» форме DrCBD, не содержащей РНУ и эффекторного доменов, приводит к увеличению квантового выхода флуоресценции белка за счет комбинации механизмов 2 и 3 (Auldrige et al., 2012). Замена консервативного остатка Asp207 на His приводит к такому же эффекту за счет изменения сети водородных связей, что может существенно влиять на перенос протона. Кроме того, было показано, что образование водородных связей между боковой цепью аспартата из консервативного трипептида DIP и D-пирольным кольцом хромофора в Pfr-конформации в BphP из *Pseudomonas aeruginosa* и фитохроме из цианобактерий Cph1 стабилизирует Pfr-форму белков (Song et al., 2011; Toh et al., 2010). Конформация бокового остатка His207 в DrCBD такова, что он не может образовывать контактов, стабилизирующих Pfr-конформацию хромофора. Было показано, что замена Y263F в DrCBD приводит к потере двух водородных связей между атомом азота и кислорода D-пирольного кольца хромофора в Pfr-конформации и гидроксильной группой Tyr263 и поэтому также, вероятно, ингибирует перенос протона в возбужденном состоянии и дестабилизирует Pfr-конформацию хромофора (Auldrige et al., 2012). Более того, было показано, что введение аналогичных мутаций (D216A и Y272F) в BphP3 также приводит к увеличению времени жизни возбужденного состояния и квантового выхода белка.

1.1.5. Узел полипептидной цепи – уникальный структурный элемент бактериальных фитохромов

Долгое время считали, что существование узлов в структуре белков невозможно (Mansfield, 1994). Современные представления о фолдинге белков реализованы в модели энергетической воронки (Onuchic, Wolynes, 2004; Turoverov et al., 2010). Считается, что в процессе эволюции преимущество получают те белковые последовательности, которым соответствует наиболее гладкая энергетическая поверхность с минимальным количеством энергетических ловушек, что приводит к кооперативному и быстрому сворачиванию полипептидной цепи (Watters et al., 2007). В свою очередь, образование узла полипептидной цепью сопряжено с высоким энтропийным барьером, что безусловно будет существенно замедлять фолдинг белка. В таком случае непонятно, почему природа в ходе эволюции должна сохранять белки, содержащие подобный структурный элемент. Впервые предположение о возможности образования полипептидной цепью узла было высказано почти 40 лет назад (Crippen, 1974), тем не менее, долгое время эта гипотеза казалась абсурдной. Возможность образования узлов в структуре белка даже не рассматривалась при анализе рентгеноструктурных данных (Bryant et al., 1974) и при моделировании фолдинга белков. В настоящее время многочисленные рентгеноструктурные данные неоспоримо свидетельствуют о существовании белков с узлами различного типа (Lai et al., 2007; Taylor, 2007; Virnau et al., 2011).

1.1.5.1 Типы узлов в структуре различных белков

Узлы обычно классифицируют по числу самопересечений. Первый обнаруженный в белках узел относился к типу трилистного узла (Рис. 1.5, *a*). Этот простейший нетривиальный узел с тремя самопересечениями был найден в карбоангидразе, ферменте катализирующем обратимую реакцию гидратации двуокиси углерода (Richardson, 1977). Удаление участка из 2 – 3 аминокислот с С-конца в карбоангидразе приводит к исчезновению узла, поэтому этот белок часто не классифицируют как белок, содержащий узел. К белкам, имеющим в своей структуре трилистный узел, относятся S-аденозилметионин синтаза (Takusagawa et al., 1996a; Takusagawa et al., 1996b), представители класса РНК-метилтрансфераз (Michel et al., 2002; Nureki et al., 2002),

белок Rds3p с мотивом цинкового пальца из *S. cerevisiae* (van Roon et al., 2008) и белок из RHH семейства ДНК-связывающих белков (Andreeva, Murzin, 2010; Bolinger et al., 2010).

Узел, принадлежащий к типу «восьмерка» (figure-of-eight) с 4-мя пересечениями полипептидной цепи можно наблюдать в редуктоизомеразе кетоновых кислот, выделенной из растений (Leung, Guddat, 2009). Данный узелковый элемент в редуктоизомеразе является внутренним и обладает чрезвычайной стабильностью, он не разрушается даже при отщеплении 60 аминокислотных остатков с С-конца белка и более 300 аминокислотных остатков с N-концевого участка (Taylor, 2000).

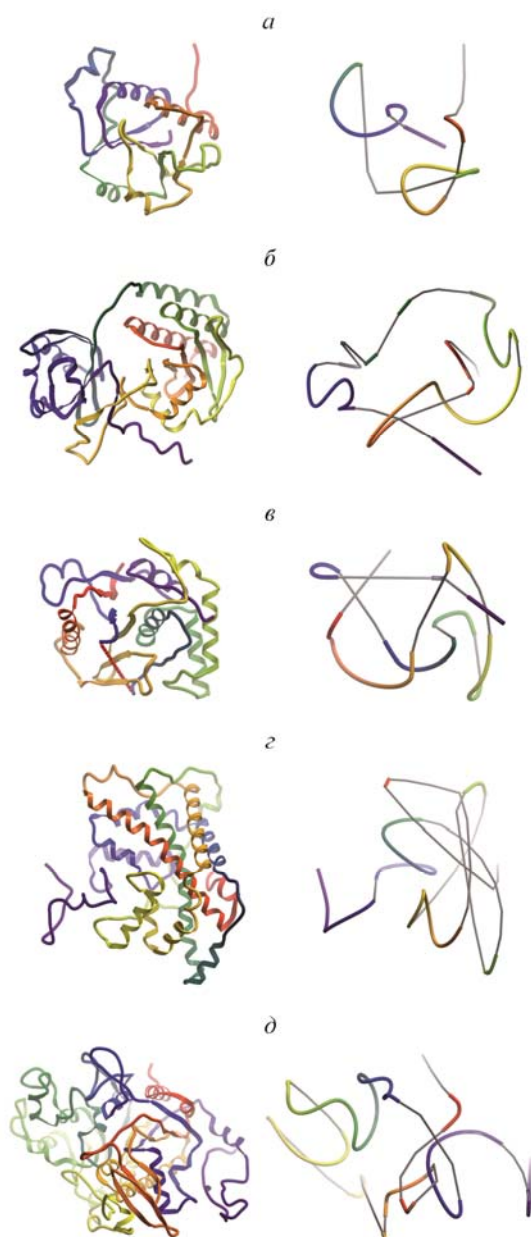


Рис. 1.5 Типы узлов в структуре различных белков.

Пространственная структура белка (слева) и ее упрощенное представление, иллюстрирующее строение узла (справа).

а – трилистный узел в РНК-метилтрансферазе YibK из PDB: код 1mxi (Lim et al., 2003); б – узел типа «восьмерка» в CBD-домене бактериального фитохрома RpBphP2 из *Rhodopseudomonas palustris* (PDB: код 1cmx (Johnston et al., 1999)); г – узел с шестью пересечениями полипептидной цепи в дегалогеназе DepH1 из *Pseudomonas putida* (PDB: код 3bjx (Schmidberger et al., 2008)); д – скользящий узел в щелочной фосфатазе из *Escherichia coli* (PDB: код 1alk (Kim, Wysocki, 1991)). Структуры белков окрашены согласно цветовой схеме, в которой осуществляется градиентный переход от синего цвета в центре полипептидной цепи. Изображение, иллюстрирующее строение узла, окрашено по аналогичной цветовой схеме. В кристаллической структуре убиквитингидролазы (в) отсутствуют данные о пространственном расположении аминокислотных остатков в участке от 63-го по 77-й остаток, поэтому этот участок цепи замкнут отрезком красного цвета. Рисунок построен на основе базы данных PDB (Dutta et al., 2009). При подготовке рисунка использована программа ICM Pro (Abagyan et al., 1994).

Узел типа восьмерки обнаружен также в хромофор-связывающих доменах (chromophore-binding domains, CBD) бактериальных фитохромов (Рис. 1.5, б). N-концевой участок из 35 остатков из PAS домена и участок полипептидной цепи из GAF домена (остатки 225 – 257) образуют узел, который локализован между PAS и GAF доменами. Первоначально структура узла была ошибочно классифицирована как трилистный узел, в котором полипептидная цепь имеет 3 пересечения (Wagner et al., 2005), но рентгеноструктурные данные CBD фитохрома из *D. radiodurans* (DrCBD), полученные с большим разрешением, позволили отнести этот узел к типу «восьмерка» с 4-мя пересечениями полипептидной цепи (Wagner et al., 2007).

Наиболее сложные узлы обнаружены в убиквитин-гидролазах (с 5-ю пересечениями полипептидной цепи (Lua, Grosberg, 2006; Virnau et al., 2006)) и в дегалогеназе DehI из *P. putida* (с 6-ю пересечениями полипептидной цепи (Bolinger et al., 2010; Schmidberger et al., 2008)). Полипептидная цепь убиквитин-гидролаз, состоящих из

230 аминокислотных остатков, формирует узел в виде кренделя (Рис. 1.5, в). Этот узел может быть распутан при отщеплении порядка 10 аминокислотных остатков с N-конца белка. Узел с 6-ю пересечениями в дегалогеназе DehI более стабилен, для его разрушения необходимо отщепление по крайней мере 20 аминокислотных остатков с C-конца и 65 аминокислотных остатков с N-конца белка (рис. 1.5, з). Узелковая структура в мономерном белке DehI образована обогащенной пролинами петлей, формирующей арку между двумя структурно одинаковыми участками из 130 аминокислотных остатков.

Ряд белков содержат так называемые скользящие узлы (Рис. 1.5, д). В этом случае какая-то часть полипептидной цепи образует узел, но потом ход полипептидной цепи происходит в обратном направлении таким образом, что узел распутывается, и полноразмерный белок не содержит узла. Простейшим примером скользящего узла может служить узел, которым мы зашнуровываем ботинки. Скользящие узлы обнаружены в щелочных фосфатазах и синтазах, нескольких семействах трансмембранных транспортных белков прокариот, бактериоцинах, тимидиновых киназах герпесвирусов, нуклеотид пиррофосфатазах, АДФ-рибозил трансферазе кролика и ряде других белков (King et al., 2007; Sulkowska et al., 2012b).

Для обнаружения в белках скользящих узлов оказался полезным подход, основанный на построении матриц или так называемых «отпечатков узлов» (King et al., 2007). В этих матрицах координаты каждой точки обозначают первую и последнюю аминокислоту (x и y, соответственно) анализируемой укороченной полипептидной цепи данного белка. Если данная укороченная цепь образует узел, то точка матрицы будет окрашена (каждый вид узла имеет определенную цветовую кодировку), если укороченная цепь узла не образует, то точка останется неокрашенной. Точка в нижнем левом углу матрицы будет представлять полноразмерный белок. Таким образом, анализируется все множество укороченных цепей белка. Для белков, содержащих узел, нижний левый угол будет окрашен, в то время как для белков, содержащих «скользящий узел» окрашенный участок будет смещен вправо, вверх, либо относительно обоих направлений. Построение таких матриц для целого ряда белков позволило отметить высокую консервативность этих матриц для белков одного семейства или для белков нескольких семейств, выполняющих сходные функции (Rawdon et al., 2013; Sulkowska et al., 2012b). Так, например, одинаковы матрицы узлов убиквитин-гидролаз человека,

дрожжей и малярийного плазмодия, несмотря на низкую аминокислотную гомологию этих белков. Несколько семейств трансмембранных белков прокариот, задействованных в транспорте метаболитов (пермеазы аминокислот, бактериальный аналог Na^+/Cl^- -зависимого транспортера нейротрансмиттеров, Na^+ -зависимые транспортеры сахаров и т.д.), содержащих скользящий узел, также имеют очень похожие матрицы узлов (Sulkowska et al., 2012b). Подобная консервативность матриц узлов в белках позволяет предполагать, что узлы действительно выполняют важные функции.

1.1.5.2 Функции узлов в белках

Функциональное назначение узлов остается неясным. Изначально предполагалось, что подобные элементы в структуре белков должны приводить к увеличению стабильности белка в целом. Однако, на DrCBD было показано, что какой-либо чрезвычайно устойчивости к механической денатурации белку наличие узла не придает (Bornschiogl et al., 2009). Все же считают, что узлы могут стабилизировать отдельные домены белков. Например, скользящие узлы в транспортных белках стабилизируют их трансмембранную часть, которая представляет собой канал, образованный из пучка α -спиралей, скрепленных продетыми в них петлями (Sulkowska et al., 2012b). Стабилизирующее действие приписывается и скользящему узлу, найденному в бактериоцинах. Например, каналобразующий домен колицина E3 скрепляется петлей, пересекающей участок полипептидной цепи и формирующей структуру, похожую на застежку (Sulkowska et al., 2012b).

Другой возможной функцией узелковых элементов считается предотвращение деградации белка в клетке, поскольку подобные структурные элементы в белке являются стерическим препятствием для прохождения внутрь протеасом (Dzubiella, 2009; Huang, Makarov, 2008; Virnau et al., 2006).

В РНК-метилтрансферазах трилистный узел образует сайт-связывания для кофактора S-аденозилметионина, т.е. важен для выполнения ферментативных функций белка (Lim et al., 2003; Nureki et al., 2002). Для карбоангидразы быка также было показано, что «развязывание» С-концевого узла приводит к потере белком ферментативной активности (Alam et al., 2002). Влияние узла на ферментативную активность белков было показано и для транскарбамилаз, ферментов участвующих в бисинтезе аргинина. N-ацетилорнитин транскарбамилаза ряда патогенных

микроорганизмов, содержит трилистный узел, в отличие от гомологичных ему ферментов орнитин транскарбамилаз бактерий, животных и человека. В этом случае, наличие узла меняет субстратную специфичность фермента: N-ацетилорнитин транскарбамилаза способна связывать N-ацетил-L-орнитин, в то время как орнитин транскарбамилазы связывают L-орнитин (Virnau et al., 2006).

В бактериальных фитохромах узелковым участкам приписывают несколько возможных функций: стабилизацию взаимодействия между PAS и GAF доменами; уменьшение нежелательных потерь энергии при изомеризации хромофора в процессе фотоконверсии, которая может быть связана с существенной подвижностью хромофор-связывающего сайта; ограничение подвижности N-концевого участка и, таким образом, достижение правильного позиционирования остатка Cys для эффективного взаимодействия с хромофором (Wagner et al., 2005).

1.1.5.3 Фолдинг белков с узелковыми структурными элементами

Наши представления о процессах сворачивания и разворачивания белков, накопленные за последние десятилетия, касаются в основном фолдинга небольших глобулярных белков. Белки, которые содержат в своей структуре сложные элементы, могут обогатить наши знания о фолдинге белков. Поэтому изучение белков, которые содержат в своей структуре узлы, представляет большой интерес для понимания фолдинга белков в целом.

Большинство теоретических и экспериментальных исследований фолдинга белков, имеющих узелковые элементы, выполнено на представителях класса РНК-метилтрансфераз (YibK и YbeA), которые содержат трилистный узел (Mallam, Jackson, 2005; Mallam, Jackson, 2006; Mallam, Jackson, 2007; Mallam et al., 2008; Noel et al., 2010; Sulkowska et al., 2012a; Sulkowska et al., 2013; Sulkowska et al., 2009; Wallin et al., 2007).

Теоретические исследования сворачивания YibK и YbeA позволили предложить механизм образования узла (Noel et al., 2010; Sulkowska et al., 2012a; Sulkowska et al., 2013; Sulkowska et al., 2009). Согласно этому механизму вначале формируется скрученная петля (twisted loop), через которую продевается короткий конец полипептидной цепи с образованием промежуточного состояния со скользящим узлом. Для образования более сложного узла в белке DehI предложен похожий механизм: на первом этапе полипептидная цепь сворачивается с образованием двух петель, на втором

этапе через меньшую из них продевается С-конец полипептидной цепи также с образованием скользящего узла, на третьем этапе большая петля накидывается на меньшую петлю (Bolinger et al., 2010). Второй и третий этапы могут меняться местами. Во всех случаях зародышем для формирования узла является скрученная петля, образование которого направляется нативными контактами. Согласно другим теоретическим исследованиям, введение при моделировании сворачивания YibK ненативных взаимодействий существенно увеличивает вероятность образования узла (Wallin et al., 2007). Механизм образования узла при этом меняется существенно: вместо образования скользящего узла, конец полипептидной цепи продевается в петлю и протягивается через нее дальше (как нитка в игольное ушко).

Эксперименты *in vitro* для белков YibK и YbeA показали, что денатурация этих белков под действием химических денатурантов полностью обратима (Mallam, Jackson, 2005; Mallam, Jackson, 2006), хотя процесс ренатурации этих белков довольно сложный и включает этапы накопления кинетических промежуточных состояний (Mallam, Jackson, 2007). Показано также, что сворачивание вновь синтезированной полипептидной цепи во внеклеточной трансляционной системе является спонтанным процессом и корректный фолдинг этих сложных белков не требует участия шаперонов (Mallam, Jackson, 2011).

Выполненное нами изучение процессов денатурации – ренатурации под действием химического денатуранта гуанидингидрохлорида бактериального фитохрома iRFP (Степаненко и др, 2015), состоящего из двух доменов PAS и GAF, на стыке которых расположен сложный узел типа «восьмерка», показало, что денатурация iRFP необратима, ренатурация белка осложняется агрегацией частично-свернутых молекул белка. В тоже время, денатурация iRFP в апоформе полностью обратима, т.е. наличие узла не препятствует эффективному фолдингу белка. Таким образом, необратимость денатурации iRFP и агрегация молекул белка связана с наличием хромофора (Stepanenko et al., 2014). Предполагается, что функционально активные участки или сложные структурные элементы в белках создают глубокие ловушки на энергетической поверхности и приводят к гистерезису денатурационных кривых, полученных при денатурации и ренатурации белка (Andrews et al., 2012; Stepanenko et al., 2013). Широко известным примером белка, для которого наблюдается явление гистерезиса денатурационных зависимостей, является зеленый флуоресцентный белок (Andrews et

al., 2009). В этом случае гистерезис обусловлен наличием в структуре белка хромофора и необходимостью при ренатурации белка упаковки белковой глобулы вокруг хромофора, что требует изомеризации хромофора для достижения им необходимой конфигурации. В случае денатурации термофильной РНК-метилтрансферазы 1O6D также наблюдали явление гистерезиса, которое было объяснено необходимостью «завязывания» полипептидной цепи в узел перед сворачиванием белка (Andrews et al., 2012). Поэтому отсутствие гистерезиса при денатурации iRFP в апоформе может свидетельствовать об отсутствии глубоких ловушек на пути сворачивания белка.

Недавно было показано, что мутантные формы YibK и YbeA с введенными в С- и N-конец остатками Cys и подвергнутые окислению в нативном состоянии с образованием дисульфидной связи имеют скорости ренатурации сравнимые со скоростями ренатурации их восстановленных форм (Mallam et al., 2010). Поскольку окисленные формы при денатурации не могут «развязаться», эти данные позволили сделать заключение, что денатурированные состояния YibK и YbeA дикого типа, полученные при инкубации этих белков в мочеvine, могут сохранять узел (Mallam et al., 2010). Недавно, для другой метилтрансферазы из *E. coli*, TrmD, методом безызлучательного переноса энергии от одиночных молекул белка, попарно меченных двумя красителями в разных позициях, также было показано сохранение узла в денатурированном состоянии, полученном при инкубации в высокой концентрации GdnHCl (Wang et al., 2013). Предполагают, что сохранение в химически денатурированных белках узлов объясняет способность этих белков эффективно сворачиваться *in vitro*. Следует заметить, что при денатурации YibK, YbeA и TrmD также не наблюдается гистерезиса (Mallam, Jackson, 2007).

Экспериментальные данные, полученные для белков YibK и YbeA во внеклеточной трансляционной системе, которая, как полагают, наилучшим образом моделирует процессы *in vivo*, свидетельствуют, что образование узла происходит на первых этапах после синтеза полипептидной цепи и этот процесс существенно ускоряется шаперонами (Mallam, Jackson, 2011). Предполагают, что образованное при этом промежуточное состояние, в котором не свернутая цепь завязана в узел, идентично денатурированным состояниям, полученным с помощью химических денатурантов, в которых также сохраняется узел (Mallam et al., 2010). Фолдинг YibK и YbeA происходит после образования узла и не зависит от шаперонов (Mallam, Jackson, 2011). Это позволило

предположить, что образование узла может играть важную роль при фолдинге белков, содержащих узелковые структуры. Действительно, узелковые структуры в еще несвернутой полипептидной цепи могут значительно уменьшать число доступных для нее конформаций. Если мы представим себе энергетическую поверхность, характеризующую сворачивание белка с узлом, то ее основание будет существенно уже, по сравнению с белком без узла. Можно предположить, что это будет ограничивать доступные для несвернутой цепи с узлом пути сворачивания, т.е. увеличивать вероятность пойти по пути сворачивания в нативное состояние и снижать возможность образования неправильно свернутого или агрегированного состояния. Если эти предположения верны, то узлы могут рассматриваться как «внутренние» шапероны, помогающие полипептидной цепи достичь нативного состояния (Mallam, Jackson, 2011).

1.2. Хромофоры бактериальных фитохромов

Биливердин – естественный хромофор бактериальных фитохромов является промежуточным продуктом распада гемоглобина (Рис. 2.1).

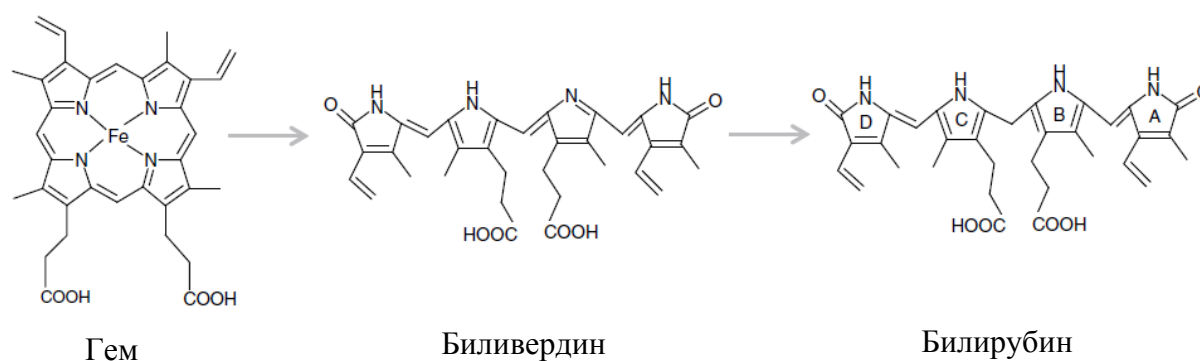


Рис. 2.1 Биливердин – продукт распада гема и предшественник билирубина

Биливердин в бактериальных фитохромах ковалентно присоединен к цистеиновому остатку Cys 15 PAS домена, а локализован в GAF домене, непосредственно в структуре узла, образованного полипептидной цепью белка.

1.3. Флуоресцентные маркеры на основе бактериальных фитохромов

1.3.1 Разработка флуоресцентных маркеров

Многодоменная структура бактериальных фитохромов открывает огромные возможности для манипулирования свойствами белков этого класса и конструирования на их основе не только перманентно флуоресцирующих в ближней и дальней инфракрасной области флуоресцентных белков, но и фотоактивируемых и фотопереключаемых флуоресцентных белков, молекулярных биосенсоров для регистрации различных клеточных состояний. На основании бактериальных фитохромов был создан ряд ближне-ИК флуоресцентных белков (NIR FPs). Первые NIR FPs, названные IRP1.4 и iRFP713 были разработаны в лаборатории Нобелевского лауреата по химии 2008 года, проф. Р. Тсиена (Shu et al., 2009), и в лаборатории проф. В.В.Верхуши (Filonov et al., 2011), соответственно.

1.3.1.1. Биомаркеры серии IFP

Белок IFP1.4 был первым инфракрасным флуоресцентным белком, созданным на основе бактериофитохрома DrBphP из *Deinococcus radiodurans* (Shu et al., 2009). Белок IFP1.4 был сконструирован из укороченной версии фитохрома DrCBD/D207H, содержащей только PAS и GAF домены и замену D207H. Замена D207H была введена поскольку ранее было показано, что замена этой консервативной аспарагиновой кислоты в DrCBD приводит к существенному увеличению квантового выхода флуоресценции (Wagner et al., 2008). Финальная версия IFP1.4 содержит 14 аминокислотных замен, введенных в основном в хромофор-связывающем сайте белка. Молекулярно динамические эксперименты, выполненные для IFP1.4 и его прародителя DrCBD, показали, что высокий квантовый выход IFP1.4 связан с ограниченной подвижностью хромофора и, таким образом, меньшей доступностью конформаций хромофора, благоприятных для переноса протона в возбужденном состоянии (Samma et al., 2010). Предполагается, что замена Ala288 на Val устраняет остаточную фотоконверсию, поскольку две дополнительные метильные группы валина могут ограничивать подвижность D-кольца биливердина. Мономерная форма IFP1.4 была получена при введении заряженной аминокислоты (мутация L311K) в гидрофобную область, обеспечивающей взаимодействие мономеров. В препаратах IFP1.4 все же присутствует некоторая доля олигомеров с молекулярным весом 190 кДа, что может

ограничивать использование этого белка в качестве флуоресцентной метки. Спектры возбуждения и флуоресценции IFP1.4 несколько сдвинуты в коротковолновую область по сравнению с DrCBD/D207H и имеют максимумы при 684 и 708 нм, соответственно. Хотя и было показано, что IFP1.4 может быть использован для получения изображений *in vivo*, все же свойства белка требуют дальнейшей оптимизации (Shu et al., 2009).

1.3.1.2 Биомаркеры серии iRFP

Белок iRFP713 был создан на основе бактериофитохрома RpBphP2 из фотосинтетических бактерий *Rhodopseudomonas palustris* (Filonov et al., 2011). Для создания флуоресцентной формы белок RpBphP2 был укорочен с сохранением лишь двух доменов, PAS и GAF. В полученной укороченной форме RpBphP2-PAS-GAF длиной 316 аминокислотных остатков была введена замена Asp202His. Бактерии, экспрессирующие эту конструкцию RpBphP2-PAS-GAF/D202H и гемоксигеназу (для синтеза биливердина), были слабо флуоресцирующими. Конструкция RpBphP2-PAS-GAF/D202H была подвергнута трем раундам случайного мутагенеза с последующим направленным мутагенезом в выявленных ключевых позициях после каждого раунда. В итоге, полученный белок iRFP713 имеет 13 аминокислотных замен: S13L, A92T, V104I, V114I, E161K, Y193K, F198Y, D202T, I203V, Y258F, A283V, K288T, N290Y. Были проанализированы физико-химические свойства iRFP713. С помощью гельфильтрации показано, что iRFP сохраняет димерную организацию, присущую родительскому фитохрому. iRFP713 имеет максимум возбуждения и флуоресценции при 690 и 713 нм; коэффициент молярной экстинкции при 690 нм составляет $105\,000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и квантовый выход флуоресценции – 5.9%. Яркость белка iRFP713 примерно на 20% выше, чем яркость IFP1.4, сконструированного в группе проф. Тсиена. Белок iRFP713 по сравнению с IFP1.4 имеет более высокую фотостабильность, более высокую яркость и стабильность сигнала в эукариотических клетках (использовались клеточные линии HEK293 и HeLa). Биливердин всегда присутствует в эукариотических клетках, поэтому для получения флуоресцентного сигнала не было необходимости добавлять экзогенный биливердин. Были проведены предварительные эксперименты на модельных мышах, инфицированных частицами аденовируса несущими ген различных флуоресцентных белков. Было показано, что флуоресцентный белок на основе бактериального фитохрома iRFP обеспечивает длительную визуализацию печени с высоким контрастом, в то время

как IFP1.4 и другие протестированные дальне-красные флуоресценцтные белки (mKate2, mNeptune, E2-Crimson, TagRFP657, eqFP670), производные GFP-подобных белков, были лишь слабо флуоресцирующими (Filonov et al., 2011).

Недавно было разработано еще четыре спектрально различных флуоресцентных белка, iRFP670, iRFP682, iRFP702 и iRFP720 (Shcherbakova and Verkhusha, 2013) на основе бактериальных фитохромов из *R. palustris*. Таким образом, максимумы спектров возбуждения NIR FPs серии iRFP перекрывают диапазон от 643 до 702 нм, а максимумы спектров флуоресценции этих белков находятся в области от 670 до 720 нм. Созданные биомаркеры дают возможность для многоцветного мечения и обеспечивают дополнительные ИК-цвета в дополнение к широко используемым флуоресцентным маркерам на основе GFP-подобных белков.

1.3.1.3 Белок iSplit

Недавно был разработан белок iSplit (Filonov and Verkhusha, 2013), предназначенный для изучения взаимодействия белков методом комплементации флуоресценции (BiFC), основанный на мечении двух белков половинками флуоресцентного белка. Взаимодействие между мечеными белками приводит к восстановлению структуры флуоресцентного белка и развитию флуоресцентного сигнала. Белок iSplit был создан на основе iRFP с введением разрыва в петле между доменами PAS и GAF, при этом даже особая структура «трилистного узла», находящаяся в области взаимодействия между доменами, не мешает конструированию iSplit. Для увеличения яркости iSplit в GAF были введены три дополнительные мутации. Белок iSplit сохраняет большинство свойств родительского белка iRFP, а именно iSplit также флуоресцирует в ИК области, имеет несколько меньший коэффициент экстинкции и практически такой же квантовый выход и сравнимую фотостабильность по отношению к iRFP. Было показано, что BiFC контраст для iSplit в клетках млекопитающих составляет порядка 80, что значительно превышает контраст для существующих «расщепленных» маркеров, основанных на GFP-подобных флуоресцентных белках, люциферазах и т.д. Было показано, что iSplit является первым BiFC маркером, который может быть использован для получения изображений *in vivo* в живых животных с высоким контрастом (18-кратное изменение сигнала было показано на модели карциномы, привитой мышам).

1.3.1.4. Фотоактивируемые ближне-инфракрасные флуоресцентные белки

Фотоактивируемые ближне-инфракрасные флуоресцентные белки PAiRFP1 и PAiRFP2 были созданы на основе бактериального фитохрома AtBphP2 из *Agrobacterium tumefaciens* C58. Способность изменять флуоресцентные свойства фотоактивируемых белков с помощью облучения светом с определенной длиной волны позволяет использовать белки этого класса для селективного мечения и отслеживания белков, органелл и живых клеток в пространстве и времени, что невозможно при использовании permanently флуоресцирующих белков.

PAiRFP1 и PAiRFP2 в релаксированном состоянии имеют спектр поглощения, характерный для Pfr-формы фитохромов с максимумом при 750 нм, и остаточную флуоресценцию. Фотоактивация под действием дальне-красного света приводит к многократному увеличению яркости свечения PAiRFPs. При этом, спектр поглощения фотоактивированных PAiRFPs характерен для Pr-формы фитохромов с максимумом при 690 нм, а максимум флуоресценции находится при 715 нм. После фотоактивации PAiRFP1 и PAiRFP2 медленно переходят в основное релаксированное состояние, либо могут быть затухены светом.

Эти белки были протестированы в клеточной культуре HeLa. PAiRFP1 и PAiRFP2 в клетках HeLa не образовывали агрегатов и были равномерно распределены по цитоплазме. Интенсивность флуоресценции для PAiRFP1 и PAiRFP2 составляла 25 и 7% по отношению к permanently флуоресцирующему белку iRFP713, соответственно.

Несмотря на низкую интенсивность флуоресценции PAiRFP1 и PAiRFP2 в клеточных культурах, была продемонстрирована применимость этих белков при наблюдении за развитием опухоли в модельных мышах. Более того, несмотря на меньшую яркость опухоли, меченной PAiRFP2, отношение флуоресцентного сигнала к фоновому свечению клетки было в два раза выше, чем для опухоли, меченной iRFP713.

Таким образом, PAiRFP1 и PAiRFP2 расширяют палитру широко используемых флуоресцентных маркеров, созданных на основе GFP-подобных белков. Более того, эти белки имеют ряд преимуществ, по сравнению с GFP-подобными флуоресцентными белками: возбуждение флуоресценции и сама флуоресценция попадает в оптическое окно прозрачности клеток животных; фотоактивируются также ИК-светом в отличие от УФ-света, применяемого для большинства GFP-подобных флуоресцентных белков; для

фотоактивации PAiRFP1 и PAiRFP2 требуется низкая мощность светового пучка; полная фотоактивация *in vivo* PAiRFP1 и PAiRFP2 происходит за секунды (для PSmOrange это время составляет более получаса).

1.3.2 Использование флуоресцентных маркеров на основе бактериальных фитохромов для прижизненной визуализации клеточных процессов

Биомаркеры нашли широкое применение для исследования клеточных процессов *in vivo*. Белки серии iRFP использовались для визуализации малых опухолей уже на ранних стадиях, для наблюдения за ростом опухоли и возникновением метастазов (Shcherbakova, Verkhusha 2013, Lu et al., 2013). Белок iRFP713 был успешно использован для наблюдения за опухолями глубоко залегающих органов, таких как печень и простата, а так же внутрикостных опухолей, таких как внутрочерепная глиобластома и внутритибальная остеосаркома (Рис 2.1.3а) (Jiguet-Jiglaire et al., 2014). Применение различных схем получения изображений с использованием в качестве маркера iRFP713, позволило осуществить визуализацию роста воспалительной опухоли молочной железы и возникновение метастазов в лимфатических узлах (Agollah et al., 2014); обнаружить очаги метастазирования при меланоме (Jiguet-Jiglaire et al., 2014). iRFP713 также оказался применим для наблюдения за ростом опухоли и возникновением метастазов в ортотопической модели рака простаты. (Lu et al., 2013, Zhu et al., 2013). С помощью iRFP713 удалось обнаружить единичные метастатические клетки, циркулирующие в кровеносных сосудах мыши (Nedosekin et al., 2015). Биомаркеры имеют большой потенциал для доклинических испытаний противораковых препаратов, поскольку они могут быть использованы для визуализации рецидивов опухолей и регрессии, следующей после лечения (Condeelis, Weissleder, 2010).

Возможность получать изображения популяции меченых клеток в целом организме животного означает, что NIR FPs могут быть использованы при исследованиях стволовых клеток. Например, использование биомаркера iRFP713 позволили неинвазивно отслеживать пересаженные сердечные клетки прародителя при ишемии в сердце мыши *in vivo* (Рис 2.1.3 б) (Wang, et al., 2014). Была показана способность пересаженных клеток костного мозга, меченых iRFP713, восстанавливать кроветворную систему облученных мышей. Тем самым было показано, что стволовых

клетках, экспрессирующих iRFP713, восстановительный потенциал не нарушен (Tran et al., 2014).

Все NIR FPs серии iRFP не цитотоксичны и стабильно экспрессируются в различных типах клеток и органов (Shcherbakova, Verkhusha 2013). Недавно были созданы iRFP713 трансгенные мыши (Рис 2.1.3 в) (Tran et al., 2014), которые имели показатели клеток крови и сыворотки соответствующие полностью здоровым особям, а также сохранили способность к воспроизведению здорового потомства. Флуоресценция iRFP713 в трансгенных мышках наблюдалась во всех тканях, включая ткани мозга, сердца, печени, почек, селезенки, легких, поджелудочной железы, костной ткани, семенников, тимуса и жировой ткани.

Улучшенные биомаркеры находят применение в неврологии для визуализации нервных клеток и регистрации их метаболических процессов. Например, биомаркер iRFP713 был экспрессирован в первичной культуре нейронов гиппокампа (Рис 2.1.3 з) и в нейронах сетчатки мышей (Fyk-Kolodziej et al., 2014). Использование биомаркеров особенно удобно для исследования нейронов сетчатки, поскольку ближне-инфракрасное излучение биомаркеров не повреждает ткань сетчатки, в отличие от видимого света при применении GFP-подобных белков. Биомаркер IFP2.0 был успешно использован для визуализации нейронов дрозофилы (Yu et al., 2014). Существенное увеличение эффективности мечения нейронов достигалось локализацией белка IFP2.0 в плазматической мембране. С этой целью были созданы линии клеток, экспрессирующие белок слияния трансмембранного домена белка CD4 человека и IFP2.0 и гемоксигеназу (HO1). В этой конструкции гемоксигеназа введена для восполнения недостатка эндогенного BV в нейронах. Генетическая конструкция для синтеза CD4-IFP2.0 и HO1, содержала также саморасщепляемый пептид между IFP2.0 и HO1.

То обстоятельство, что NIR FRs используют в качестве хромофора биливердин (BV), который также присутствует в простейших паразитах, позволяет тестировать с помощью NIR FRs новые лекарственные противопаразитарные препараты в преклинических исследованиях *ex vivo* и *in vivo*. Недавно на паразитах рода *Leishmania*, экспрессирующих iRFP713, был выполнен скрининг препаратов против инфекции, вызываемой этими паразитами. Более того, использование паразитов, флуоресцирующих в ближне-инфракрасной области спектра, позволило наблюдать за

развитием инфекции *in vivo* в зараженной мыши в течение 20 недель (Calvo-Alvarez et al., 2015).

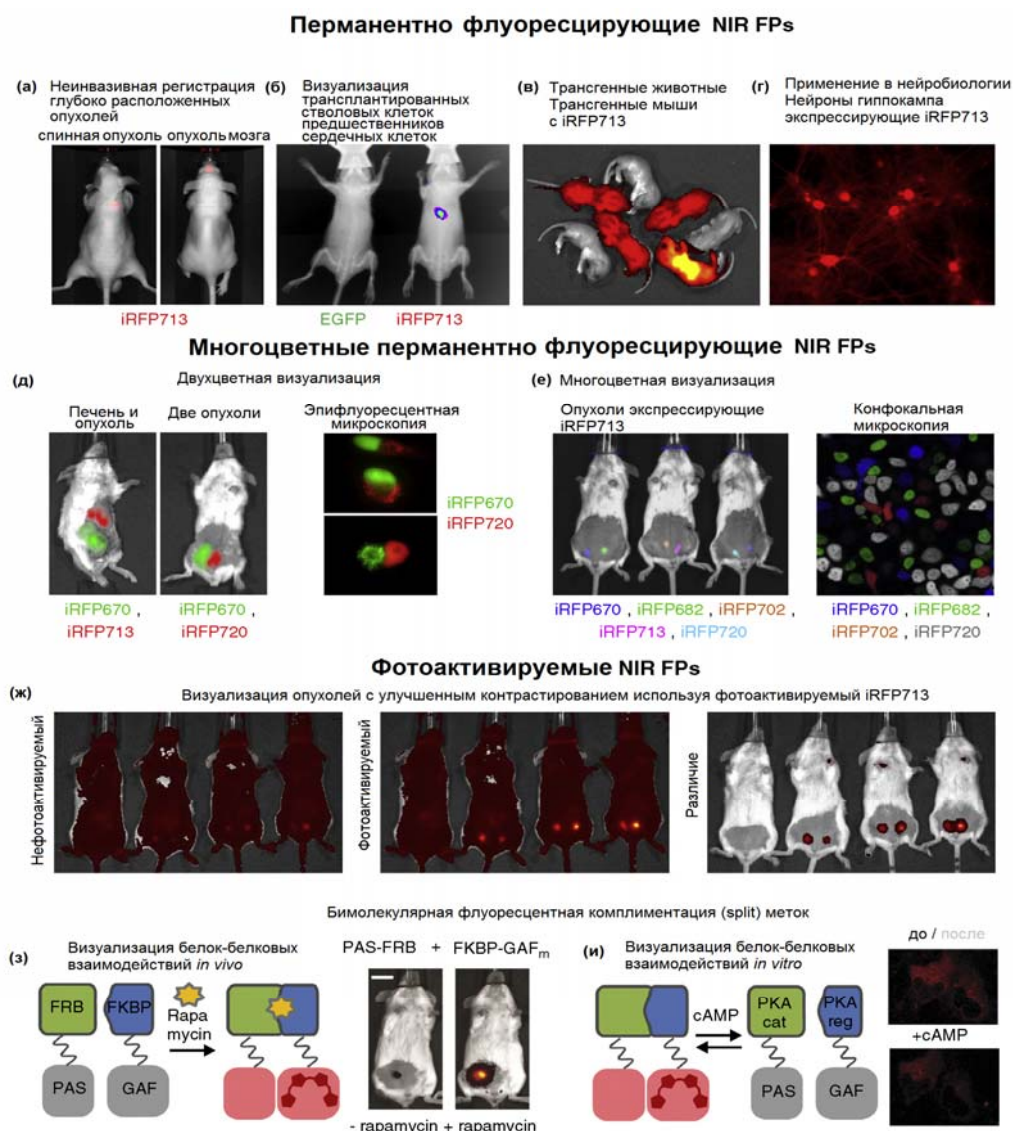


Рис. 2.1.3 Применение NIR FPs в качестве зондов для флуоресцентной микроскопии и визуализации тканей и органов. (Shcherbakova et al., 2015)

Спектрально различные биомаркеры позволяют одновременно визуализировать разные тканей и органы *in vivo*. Флуоресценция биомаркера iRFP670 с наиболее коротковолновым спектром флуоресценции и флуоресценция биомаркеров iRFP713 или iRFP720 с длинноволновыми спектрами флуоресценции достоверно регистрируются с помощью двух наборов фильтров при эпифлуоресцентной микроскопии или

визуализации всего организма (Рис 2.1.3 д) (Shcherbakova, Verkhusha, 2013). Было показано, что с использованием двух биомаркеров из серии iRFP возможно одновременно визуализировать печень и опухоль или две близко расположенные опухоли в живой мыши. Число NIRFRs, используемых одновременно может быть расширено до пяти с использованием линейных спектральных алгоритмов разложения, доступных в современной конфокальной микроскопии или платформах визуализации всего тела (Рис 2.1.3 е)

Фотоактивируемые биомаркеры серии PAiRFP позволяют увеличить точность визуализации в условиях высокой автофлуоресценции, при этом учет сигнала автофлуоресценции достигается путем сравнения изображений, сделанных до и после фотоактивации (Рис 2.1.3 ж). PAiRFPs также могут быть использованы для селективного фотомечения и краткосрочной неинвазивной визуализации в животных (Piatckevich et al., 2013). Биомаркер iSplit может быть использован для изучения белок-белкового взаимодействия в культивируемых клетках и животных (Рис. 2.1.3 з).

1.3.3 Использование ближне-инфракрасные флуоресцентные белки в передовых технологиях получения изображений.

Использование NIR FRs позволяет осуществлять визуализацию *in vivo* различными способами, от простых методов, пригодных при высоко пропусном рабочем процессе, до передовых методов реконструкции 3-х мерных изображений, с высоким пространственным разрешением и точной количественной оценкой данных.

Наиболее широко используемым методом с применением NIRFRs является построение плоского флуоресцентного изображения, ввиду его технической просты и дешевизны. Основное ограничение этого метода заключается в том, что изображение на основе флуоресценции измеренной по поверхности не может быть однозначно сопоставлено с 3D распределением флуоресцентных объектов внутри образца.

В отличие от визуализации в плоскости, используя томографию можно получить данные для построения 3D изображения. Во флуоресцентной молекулярной томографии (FTM) последовательно сканируются фокальные источники света (Stuker et al., 2011, James, Gambhir, 2012). Визуализируя различные пары источник-детектор, и учитывая модель распространения света в тканях, возможно восстановление 3D изображения.

Измерение времени жизни флуоресценции или поглощения, предоставляет дополнительные данные для восстановления изображения. Флуоресцентная визуализация на основе времени жизни флуоресценции позволяет обнаружить и отделить сигнал автофлуоресценции тканей от основных флуоресцентных времен жизни.

1.3.4 Использование бактериальных фитохромов в оптогенетике

Предполагается, что конструкции на основе бактериальных фитохромов могут найти применение в оптогенетике, т.е. для контролирования посредством облучения клетки светом различных клеточных процессов, например, экспрессии генов, активности ферментов, открытия и закрытия ионных каналов и т.д. (Shcherbakova et al, 2015) Использование оптогенетики оказалось полезным для изучения процессов передачи сигнала в живых биологических системах, изучения нейронной активности в нейробиологии (Zhang, Cui, 2015).

В оптогенетике используют различные светочувствительные белки, включая фитохромы растений. В случае использования бактериальных фитохромов их несомненным преимуществом будет активация нефототоксичным для живой клетки NIR-светом. Поскольку в бактериальных фитохромах наблюдается некоторая вариабельность эффекторного домена, это свидетельствует, что этот домен в принципе может быть заменен любым другим ферментом, белком, входящим в состав ионных каналов, или ДНК-связывающим белком.

Первая оптогенетическая конструкция с использованием BphP была создана на основе неканонического фитохрома BphG1 (Shcherbakova et al, 2015). Для этого в BphG1, его эффекторный домен был заменен на аденилатциклазный домен белка CyaB1 из *Nostoc sp.*, полученная конструкция была оптимизирована. Химерный белок BphG1-CyaB1 был назван инфракрасной свето-активируемой аденилатциклазой, PaC. Белок PaC был использован в нейронах червя *C. elegans*. Было показано, что фотоиндуцируемый свет с длиной волны 700 нм синтез цАМФ, с последующим освобождением ацетилхолина, запускает активацию мышечных клеток, что приводит к увеличению подвижности червя при его облучении.

Другая оптогенетическая конструкция, названная свет-активируемой фосфодиэстеразой (LAPD), создана на основе канонического BphP, DrBphP, в котором гистидиновая киназа была заменена на фосфодиэстеразу 2A человека (Shcherbakova et

el, 2015). В результате фотоактивации такой конструкции происходит деградация вторичных мессенджеров, цАМФ и цГМФ. Эта конструкция была успешно протестирована на культуре клеток млекопитающих и на эмбрионах рыбы вида Данио-рерио (zebrafish)

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Биливердин гидрохлорид (Frontier Scientific, США) использовали без дополнительной очистки. Концентрацию BV определяли спектрофотометрически. При этом коэффициент молярной экстинкции ϵ_{376} принимали равным $45500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (McDonagh, Palma 1980). Для исследования процессов денатурации – ренатурации белков использовали химический денатурант гуанидингидрохлорид (GdnHCl) производства Nacalai Tesque, (Япония) без дополнительной очистки. Концентрацию раствора GdnHCl определяли рефрактометрически с использованием рефрактометра Аббе (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия).

2.2. Методы

2.2.1. Анализ пространственной структуры белков

Свойства микроокружения и особенности локализации аминокислотных остатков в белках iRFP713 и iRFP682 (файл 4E04.pdb из Международного банка белковых структур PDB (Berman et al., 2003)) анализировали с использованием данных о координатах атомов пространственной структуры CBD-домена бактериального фитохрома RpBphP2, с учетом аминокислотных замен, введенных при конструировании флуоресцентных белков. Микроокружение аминокислотных остатков определяли как совокупность атомов, расположенных на расстоянии менее r_0 от геометрического центра остатка; r_0 было принято равным $7 \text{ \AA}$ (Turoverov et al., 1985). Плотность упаковки атомов в микроокружении определяли как число атомов, входящих в микроокружение, или как отношение объема, занимаемого атомами микроокружения, к общему объему сферы с радиусом $7 \text{ \AA}$ ($d = \sum V_i / V_0$). Объем, занимаемый атомами, определяли на

основании известных Ван-дер-ваальсовых радиусов атомов (Полинг, Полинг, 1978), причем учитывали лишь ту часть объема, которая входит в сферу радиуса 7 Å, т.е. входит в состав микроокружения. Реальный объем, занимаемый атомами, несколько меньше, так как атомы участвуют в образовании химических связей. Тем не менее для целей данного анализа это не имеет существенного значения.

2.2.2. Флуоресцентные измерения

Флуоресцентные измерения проводили с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, Австралия). Измерение анизотропии флуоресценции и времени жизни возбужденного состояния выполнены с использованием спектрофлуориметрических установок собственного изготовления (Туроверов и др. 1998) со стационарным и импульсным возбуждением в микрокуветах (101.016-QS 5 × 5 мм; Hellma, Германия).

Собственную УФ флуоресценцию измеряли при возбуждении светом с длинами волн 280, 295 нм. Для характеристики положения и формы спектров триптофановой флуоресценции использовали параметр $A = I_{320}/I_{365}$ (I_{320} и I_{365} – интенсивность флуоресценции, измеренная при длинах волн 320 и 365 нм, соответственно). Анизотропию флуоресценции (Лакович, 1986; Jablonski, 1957) определяли используя соотношение:

$$r = (I_V^V - GI_H^V)/(I_V^V + 2GI_H^V), \quad (2.1)$$

где I_V^V и I_H^V – вертикальная и горизонтальная компоненты интенсивности флуоресценции, возбуждаемой вертикально поляризованным светом, G – коэффициент, характеризующий различие чувствительности установки к вертикально и горизонтально поляризованному свету ($G = I_V^H / I_H^H$).

Спектры флуоресценции и параметр A корректировали на спектральную чувствительность установки.

Флуоресценцию BV в растворах возбуждали при длинах волн 395 и 680 нм. Флуоресценцию хромофора в NIR FPs возбуждали в максимуме полосы поглощения в видимой области соответствующего белка.

2.2.3. Регистрация и анализ кривых затухания флуоресценции

Измерение кривых затухания флуоресценции проводили с использованием импульсной спектрофлуориметрической установки ИНЦ РАН (Туроверов и др., 1998).

Кривые затухания флуоресценции анализировали в мультиэкспоненциальном приближении:

$$I(t) = \sum_i \alpha_i \exp(-t / \tau_i), \quad (2.2)$$

где α_i и τ_i – амплитуда и время жизни i -ой компоненты, $\sum \alpha_i = 1$. Величины α_i и τ_i определяли из уравнения свертки $I(t)$ с кривой затухания импульса от лампы или образца. Расчет проводили по методу наименьших квадратов с использованием алгоритма минимизации Маркуардта (Marquardt, 1963). В качестве эталона использовали растворы p -терфенила в этиловом спирте или водный раствор N -ацетилтриптофанамида (Zuker et al., 1985). Вклад i -той компоненты в суммарное излучение определяли как:

$$S_i = \frac{\alpha_i \int_0^{\infty} \exp(-t / \tau_i) dt}{\sum_i \alpha_i \int_0^{\infty} \exp(-t / \tau_i) dt} = \frac{\alpha_i \tau_i}{\sum_i \alpha_i \tau_i}. \quad (2.3)$$

Среднеквадратичную величину времени жизни флуоресценции $\langle \tau \rangle$ для мультиэкспоненциального затухания определяли из соотношения:

$$\langle \tau \rangle = \frac{\sum_i \alpha_i \tau_i^2}{\sum_i \alpha_i \tau_i} = \sum_i S_i \tau_i. \quad (2.4)$$

2.2.4. Измерение спектров кругового дихроизма

Измерение спектров КД проводили с использованием спектрополяриметра J-810 (Jasco, Япония). Для измерения спектров КД в дальней УФ-области

использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 мм, измерение проводили в области 260 – 190 нм с шагом 0.1 нм. Для измерения спектров КД в ближней УФ-области растворов NIR FPs использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см, измерение проводили в области 320 – 250 нм с шагом 0.5 нм. При измерении спектров КД в видимой области растворов NIR FPs использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 см, измерение проводили в области 850 – 320 нм с шагом 1 нм. Для улучшения соотношения сигнал/шум каждый спектр регистрировали 3 – 5 раз и полученные данные усредняли. Спектры КД белков построены с учетом КД соответствующего буферного раствора.

Молярная эллиптичность на аминокислотный остаток была рассчитана исходя из экспериментально полученных значений эллиптичности θ в соответствии с формулой:

$$[\theta]_{\lambda} = \frac{\theta_{\lambda} M}{10 d c N}, \quad (2.5)$$

где θ – эллиптичность в миллиградусах, c – концентрация в мг/мл, d – длина оптического пути в см, M – молярная масса полимера в г/моль, N – число остатков в полимере.

2.2.5. Выделение и очистка белков.

Плазмиды, кодирующие гены iRFP713, iRFP682 и iRFP670 и их мутантных форм с polyHis-tag были предоставлены проф. В.В. Верхушей (Университет им. А. Эйнштейна, США) или получены на коммерческой основе от компании Евроген (Россия). Белки экспрессировали в штаммах бактерий *E.coli* LMG 194 согласно методике, описанной ранее (Filonov et al., 2011).

Для получения холоформы NIR FPs клетки LMG 194 были ко-трансфецированы плазмидой pWA21h, кодирующей ген гемоксигеназы (HO), необходимой для синтеза BV. Клеточную культуру инкубировали в RM среде, содержащей ампицилин, канамицин и 0.02% рамнозы в течение 5-6 часов. Индукция синтеза целевого белка NIR FP осуществлялась путем добавления

0.002% арабинозы с последующей инкубацией при 37°C в течение 6 часов и при 18°C в течение 24 часов. Рекомбинантный белок в холо-форме был очищен с помощью никель-агарозы His-GraviTrap (GE Healthcare, Швеция). При элюции белка вместо буфера, содержащего имидазол, использовали буфер с 100 мМ ЭДТА. Дальнейшая очистка была выполнена методом ион-обменной хроматографии на колонке MonoQ (GE HealthCare). Для получения апо-форм NIR FPs использовали клетки LMG 194, несущие только плазмиды, кодирующие ген целевого белка и не содержащие плазмиду pWA21h. Протокол выделения и очистки белка был незначительно изменен. Клеточную культуру инкубировали в RM среде, содержащей ампицилин в течение 3-4 часов. Индукция экспрессии целевого NIR FP и последующие этапы получения белка осуществлялись так же, как и для холо-формы. Чистота белка контролировалась методом электрофореза в SDS/PAGE с использованием 15% полиакриламидного геля (Laemmli, 1970). Белок был сконцентрирован и хранился в 20 мМ TrisHCl буфере, pH 8.0.

Методика выделения и очистки инфракрасного флуоресцентного белка на основе бактериального фитохрома iRFP

Вектор, кодирующий ген iRFP:	pBAD/His-B
Вектор, кодирующий ген НО:	pWA21h
Штамм-продуцент:	<i>E.coli</i> LMG194 (<i>E.coli</i> F' Δ lacX74 galE galK thi rpsL Δ phoA Δ ara714 leu::Tn10)
Устойчивость к антибиотикам:	канамицин 35 мкг/мл (pBAD/His-B) ампицилин 50 мкг/мл (pWA21h)
Индукция:	арабиноза 0.002% (pBAD/His-B) рамноза 0.02% (pPL-BV)
Температура инкубации	37 °C/ 18 °C
Среда:	LB / RM среды

Культивирование клеток.

1. Клетки штамма-продуцента iRFP из глицеринового стока, хранящегося при -70 °C, необходимо предварительно оттаять на льду и высеять штрихом на чашки Петри с селективной средой (LB-агар, Km 50 мкг/мл, Amp 100 мкг/мл), содержащей 1% глюкозы (для репрессии синтеза генов HO и iRFP). Чашки инкубировать при 37 °C в течение 12 – 16ч.
2. Отобрать с чашки по индивидуальной колонии и поместить в 2.5 – 3 мл среды (LB, Km 35 мкг/мл, Amp 50 мкг/мл, 0.5% глюкозы) в 50-мл пробирках. Культуру наращивать при 37 °C и интенсивном встряхивании (250 rpm) в течение ночи.
3. На следующее утро осадить клетки центрифугированием при 4 °C, 5000 rpm в течение 20 мин. Надосадочную жидкость необходимо слить, осажденные клетки ресуспензировать в 400 мл RM среды (RM, Km 35 мкг/мл, Amp 50 мкг/мл, без глюкозы). Для культивирования следует использовать колбы объемом не менее 1000 мл для надлежащей аэрации.
4. Инкубировать при 37 °C и интенсивном встряхивании (250 rpm) 2-3 часа до достижения $OD_{600}=0.6 - 0.8$.
5. Добавить в колбу с культурой индуктор гемоксигеназы – 400 мкл 20% рамнозы (до конечной концентрации 0.02%). Культуру клеток рекомендуется инкубировать при 37 °C и интенсивном встряхивании (250 rpm) в течении 5-6 часов.
6. Добавить в колбу с культурой индуктор iRFP – 40 мкл 20% арабинозы (до конечной концентрации 0.002%). Культуру клеток рекомендуется инкубировать при 37 °C и интенсивном встряхивании (250 rpm) в течении 6 часов. Еще 22-24 часа инкубировать культуру при 18 °C. Этот шаг требуется для полного созревания флуоресцентного белка. Клеточная культура на этом этапе приобретает изумрудный оттенок.
7. Перенести колбы с ночной культурой на 4 °C на 15 мин для того, чтобы остановить клеточный рост.
8. Осадить клетки центрифугированием при 4 °C, 5000 rpm в течение 20 мин.

Надосадочную жидкость необходимо слить, осажденные клетки можно хранить при -20 °C.

Процедура выделения рекомбинантного белка.

Для лизиса клеток используется процедура ультразвукового разрушения клеток. Все манипуляции выполняются при 4°C или на льду.

1. Осадок ресуспензировать в 10 мл раствора Loading Buffer, предварительно охлажденного на льду.
2. Добавить в раствор лизоцим до концентрации 0,5 мг/мл. Инкубировать на льду в течение 30 минут периодически перемешивая раствор.
3. Затем раствор озвучить в течении 15 минут при частоте 30 кГц. Используйте импульсный режим (0.8 сек. в режиме озвучивания/0.2 сек. в режиме покоя) для предотвращения нагревания раствора. Помимо этого, рекомендуется озвучиваемый раствор во время процедуры держать на льду. После озвучивания раствор должен стать более прозрачным.
4. Центрифугировать раствор при 4°C в течении 30 минут и скорости 15300 об/мин.
5. Отобрать надосадочную жидкость.
6. Отобранную надосадочную жидкость профильтровать через фильтровальную бумагу (для удаления примесей липидов, которые адсорбируются на бумаге) и через фильтр 0.2 мкм (для удаления неразрушенных бактерий).

Процедура очистки рекомбинантного белка.

На первом этапе для очистки белковых препаратов используется аффинная хроматография на колонках Ni⁺⁺-сефарозы (например, Ni Sepharose 6 Fast Flow). Дополнительная очистка iRFP достигается с помощью ионнообменной хроматографии на колонке MonoQ 5/50GL. Все процедуры выполняются при 4 °C, все растворы предварительно охлаждаются на льду.

Аффинная хроматография на колонках Ni⁺⁺-агарозы

1. Мы используем промышленно-упакованные колонки (His GraviTrap, GE Healthcare) объемом 1 мл. Емкость колонки составляет около 40 мг меченного

His₆ белка. Поэтому необходимо предварительно определить концентрацию белка в неочищенном препарате. В случае необходимости разделить препарат на несколько порций.

2. Перед использованием необходимо отмыть колонку от 20% этанола, в котором она хранится. Для этого промыть колонку 10 мл дистиллированной воды.
3. Уравновесить колонку 10 объемами Loading Buffer.
4. Нанести на колонку раствор неочищенного белка. Собрать раствор, прошедший через колонку.
5. Промыть колонку 2 раза 5 мл Loading Buffer. Собрать раствор, прошедший через колонку.
6. Промыть колонку 5 мл Washing buffer. Собрать раствор, прошедший через колонку.
7. Промыть колонку 5 мл Loading Buffer. Собрать раствор, прошедший через колонку.
8. Элюировать целевой белок 5 мл Elution buffer. Отбирать фракции по 0.5 мл в 1.5 мл пробирки типа эппендорф.
9. Отобранные фракции и растворы, собранные в пп. 4-8, необходимо проверить методом SDS-электрофореза (Laemmli, 1970). Отобрать фракции, содержащие препарат белка (молекулярная масса iRFP составляет 35425,27 Да).
10. Собрать отобранные фракции вместе и перевести в 20 mM Tris HCl буфер, 150 mM NaCl, pH 8.0 с помощью диализа. Диализ проводить в течение 24 часов, рекомендуется несколько смен буфера.
11. Раствор белка снять с диализа и осадить белковые преципитаты центрифугированием при 4 °C , 15300 rpm в течение 30 мин. Отобрать надосадочную жидкость.
12. Раствор белка нанести на колонку MonoQ 5/50GL (V=1 мл), уравновешенную в 20 mM Tris HCl буфере, pH 8.0, содержащем 150 mM NaCl. Элюцию белка осуществлять с помощью 0-50% градиента буфера 20 mM Tris HCl, 1M NaCl, pH 8.0. Отбирать фракции по 0.5 мл в 1.5 мл пробирки типа эппендорф. Проанализировать чистоту фракций методом SDS-электрофореза, отобрать

фракции с высокой степенью чистоты.

13. Перевести отобранные фракции в 20 mM Tris HCl буфер, pH 8.0 с помощью диализа с многократной сменой буфера.

14. Количество белка оценивается исходя из величины OD₂₈₀. Коэффициент молярной экстинкции для iRFP, рассчитанный на основании содержания остатков триптофана, тирозина и цистеина, составляет $\epsilon_{280} = 25350 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Gill, von Hippel, 1989).

Чистота и нативность полученных препаратов.

Чистоту полученных препаратов проверяли при помощи SDS-электрофореза в денатурирующих условиях (Рис. 2.2.5.).

Нативность iRFP проверяли методом собственной УФ-флуоресценции белков и КД в дальней УФ-области.

РАСТВОРЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК И ОЧИСТКИ БЕЛКОВ

RM среда (1 л)

1x M9 соли, 2% казаминовые кислоты, 1 mM MgCl₂.

Смешать 20 гр. Казаминовых кислот и 890 мл деионизованной воды.

Автоклавировать 20 мин. Охладить и в стерильных условиях добавить 100 мл 10x M9 соли (раствор стерилизовать автоклавированием) и 1 мл 1 M MgCl₂, (фильтровать через 0.2 мкм фильтр). Хранить в течение месяца при 4 °C.

Loading Buffer 100 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1mM PMSF, pH 8.0 довести 2M NaOH

Washing Buffer 100 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 15 mM имидазола, 0.5 mM PMSF, pH 8.0 довести 2M NaOH

Elution Buffer 100 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 100 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, pH 8.0 довести 2M NaOH. Важно: не использовать имидазол для элюции iRFP, поскольку он эффективно конкурирует с биливердином за сайт связывания.

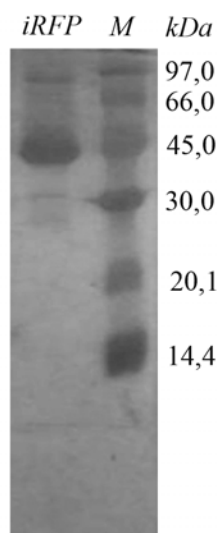


Рис. 2.2.5

Электрофорез в 15% полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (Laemmli, 1970) препаратов iRFP. Дорожка М – маркеры молекулярных масс (указаны слева от рисунка).

2.2.6. Проведение микродиализа

Метод равновесного микродиализа был использован для приготовления раствора образца и раствора сравнения при изучение взаимодействия NIR FPs с BV. Равновесный микродиализ был выполнен с использованием микродиализных камер (Harvard Apparatus/Amika device, Holliston, MA, USA), состоящих из двух микродиализных ячеек, соединенных проницаемой для низкомолекулярных веществ мембраной (MWCO 10 кДа). В ячейку №1 помещают раствор NIR FP, в ячейку №2 – биливердин. Поскольку биливердин может свободно диффундировать через мембрану, концентрация свободного биливердина в обеих ячейках микродиализной камеры будет стремиться выровняться. Время уравнивания было определено в тестовых экспериментах, в которых в одну ячейку помещали BV, а в другую ячейку – буферный раствор. Оно составило 5 суток при 4 °C.

После достижения равновесия, концентрация BV в 1-ой ячейке будет превосходить концентрацию BV в 2-ой ячейке (C_f) на количество BV (C_b), связанного с NIR FP. Эта величина определяется по формуле $C_b = C_0 - 2C_f$, где C_0 – начальная концентрация лиганда в ячейке №2. Начальную и конечную концентрации, C_0 и C_f , BV в ячейке 1 определяли спектрофотометрически, используя значение коэффициента экстинкции BV при 376 нм, равное $45500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

2.2.7. Анализ процессов денатурации – ренатурации NIR FPs.

Денатурацию (ренатурацию) белка индуцировали при помощи ручного смешивания 50 мкл раствора нативного белка (денатурированного в 4М GdnHCl) с 500 мкл раствора, содержащего необходимую концентрацию GdnHCl. Зависимости оптической плотности, интенсивности флуоресценции триптофановых остатков и хромофора, эллиптичности при 222 нм от концентрации GdnHCl для NIR FPs были измерены после инкубации в течение 24 часов. Дальнейшее увеличение времени инкубации не приводило к значительному изменению измеряемых характеристик.

Значение интенсивности флуоресценции хромофора было скорректировано на оптическую плотность раствора при длине волны возбуждения (D_Σ). Корректировочный коэффициент определялся согласно формуле (Kuznetsova et al., 2012, Fonin et al., 2014):

$$W = (1 - 10^{-D_\Sigma}) / D_\Sigma$$

2.2.8. Анализ денатурационных зависимостей.

Аппроксимация квазиравновесных зависимостей эллиптичности при 222 нм от концентрации GdnHCl, измеренных при денатурации NIR FPs, была выполнена в рамках модели одностайдного перехода согласно формуле:

$$S = \frac{S_N + S_U K_{N-U}}{1 + K_{N-U}}, \quad (1)$$

$$K_{N-U} = \exp\left(\frac{-\Delta G_{N-U}^0 + m_{N-U}[D]}{RT}\right), \quad (2)$$

$$K_{N-U} = F_U / F_N = (1 - F_N) / F_N, \quad (3)$$

при этом, начальный и конечный участки денатурационных зависимостей аппроксимировали линейными зависимостями:

$$S_N = a_N + b_N[D], \quad (4)$$

$$S_U = a_U + b_U[D], \quad (5)$$

где S – значение измеряемой величины при текущей концентрации GdnHCl; $[D]$ – концентрация GdnHCl; m – величина наклона ΔG_{N-U} от концентрации денатуранта; ΔG_{N-U}^0 – стабильность белка в отсутствие денатуранта; F_N и F_U – доли белка в нативном и денатурированном состояниях, соответственно; и S_N и S_U – значение измеряемой величины для нативного и денатурированного белка; a_N , b_N , a_U и b_U – константы. Аппроксимация была выполнена методом нелинейной регрессии с помощью программы Sigma Plot (Wass, 2009).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Изучение физико-химических и спектральных свойств ближне-инфракрасного флуоресцентного белка iRFP713, полученного на основе бактериального фитохрома, и его отдельных доменов

Белок iRFP713 в холоформе в буферном растворе имеет полосу поглощения с максимумом при 280 нм, соответствующую поглощению ароматических остатков, и полосы поглощения с максимумами при 390 и 690 нм, соответствующие поглощению связанного биливердина (Рис. 3.1 А). Пик поглощения связанного BV с максимумом при 690 нм примерно в два раза более интенсивный по сравнению с полосой поглощения с максимумом при 390 нм, кроме того, дальне-красная полоса поглощения BV в белке имеет плечо при 640 нм. На рис. 3.1 А для сравнения представлен спектр поглощения свободного BV в буферном растворе, который имеет две полосы поглощения с максимумами при 376 нм и 680 нм, причем более выражен пик поглощения с максимумом при 376 нм. Возбуждение флуоресценции белка iRFP713 в холоформе при длине волны 690 нм приводит к появлению характерной флуоресценции с максимумом при 713 нм. Спектр возбуждения холобелка при регистрации в максимуме флуоресценции хромофора имеет полосы при длине волны 280, 390 и 690 нм, совпадающие с полосами в спектре поглощения белка (Рис. 3.2).

Белок iRFP713 в холоформе имеет выраженный спектр КД в дальней УФ-области, форма которого характерна для белка со смешанным α/β типом вторичной структуры (Рис. 3.1Б). Холобелок имеет выраженный спектр КД в ближней УФ- области (Рис. 3.1Д). Форма спектра КД в видимой области iRFP713 в холо форме характерна для фитохромов с BV в Pr-состоянии (Рис. 3.1Е).

Спектр триптофановой флуоресценции iRFP713 в холоформе имеет относительно коротковолновое положение с максимумом при 331 нм (Рис. 3.1В). Холобелок характеризуется высокой степенью анизотропии

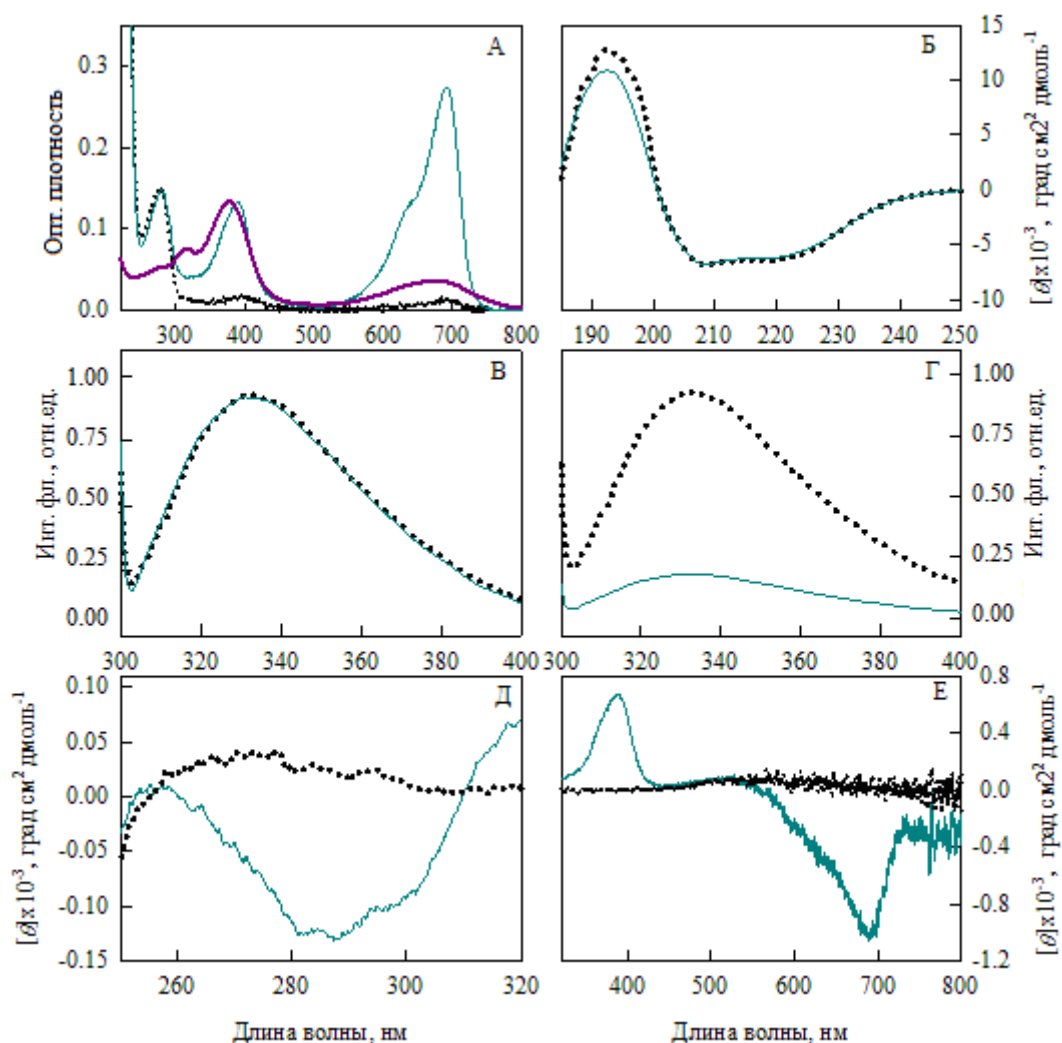


Рис. 3.1. Спектральные свойства iRFP713 в холоформе (сплошные кривые темно-голубого цвета) и в апоформе (кривые черного цвета, точки).

(А) Спектры поглощения, для сравнения приведен спектр поглощения свободного BV (сплошная кривая бордового цвета); (Б) спектры КД в дальней УФ-области; (В) спектры триптофановой флуоресценции ($\lambda_{\text{ex}}=295$ нм), приведенные по форме; (Г) Спектры триптофановой флуоресценции ($\lambda_{\text{ex}}=295$ нм), за единицу приняты интенсивности флуоресценции холобелка при длине волны, отвечающей максимуму спектра флуоресценции; (Д, Е) Спектры КД в ближней УФ- и в видимой области.

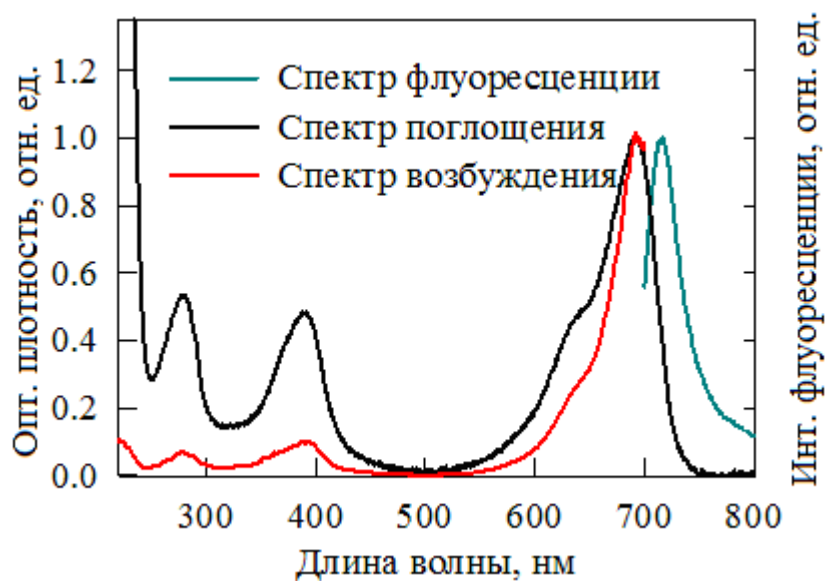


Рис. 3.2. Спектр поглощения и флуоресценции iRFP713 в холоформе.

Спектры поглощения (кривая черного цвета), флуоресценции, при $\lambda_{\text{возб}}=690$ нм (кривая темно-голубого цвета) и возбуждения флуоресценции, при $\lambda_{\text{рег}}=715$ нм (кривая красного цвета) iRFP713 в холоформе.

триптофановой флуоресценции ($r=0.15$; $\lambda_{\text{возб}}=297$ нм, $\lambda_{\text{рег}}=365$ нм) и небольшим временем жизни триптофановых остатков в возбужденном состоянии (1.2 нс). Вероятно, что триптофановая флуоресценция в iRFP713 в холоформе в нативном состоянии затухает. Мы провели анализ микроокружения триптофановых остатков iRFP713 на основе рентгеноструктурных данных CBD-домена бактериофитохрома RpVphP2 (файл 4E04 (Bellini and Papiz, 2012)). Белок iRFP713 содержит три триптофановых остатка: Trp109, Trp281, Trp311. Все три триптофановые остатки вносят вклад в флуоресценцию белка, поскольку не содержат в своем микроокружении возможных тушителей флуоресценции. Все триптофановые остатки имеют плотное микроокружение: в состав микроокружения Trp109, Trp281, Trp311 входит 72, 75 и 78 атомов, соответственно. Для сравнения, триптофановый остаток Trp 48 азурина, который имеет самое коротковолновое положение спектра флуоресценции с максимумом при 308 нм, имеет в своем микроокружении 69 атомов (Turoverov et al., 1985). Высокая степень анизотропии флуоресценции триптофановых остатков iRFP713 также свидетельствует о жесткости микроокружения триптофановых остатков. Остаток Trp109 расположен во внутренних областях белка и недоступен растворителю. Остатки Trp281 и Trp311 находятся ближе к периферии молекулы белка и частично доступны растворителю, оба остатка содержат в своем микроокружении по 5 молекул воды. Остаток Trp311 находится в области взаимодействия мономеров в димере iRFP713 и в его микроокружение входит Trp311 из другого мономера. Все триптофановые остатки имеют в своем микроокружении по несколько полярных групп. В состав микроокружения Trp109 входят полярные группы остатка Arg111 и молекула связанной воды. В микроокружении Trp281 присутствуют полярные группы остатков Arg174, Arg276 и Glu317. В состав микроокружения Trp311 входят полярные группы остатков Gln145 и Gln312. Обычно, коротковолновое положение спектра флуоресценции характерно для триптофановых остатков, чье микроокружение сформировано, главным образом, гидрофобными аминокислотами, например, как в случае единственного триптофанового остатка Trp 48 азурина (Turoverov et al.,

1985). Однако, спектр флуоресценции триптофанового остатка, в состав микроокружения которого входят полярные остатки, также может быть коротковолновым при условии жесткости микроокружения (Kuznetsova, Turoverov, 1998; Kuznetsova et al., 1999). Проведенный анализ свидетельствует, что коротковолновая флуоресценция iRFP713 объясняется жестким, хотя и полярным, микроокружением триптофановых остатков белка.

Квазиравновесные зависимости белка iRFP713 в холоформе интенсивности триптофановой флуоресценции при длине волны регистрации при 320 и 365 нм, параметра A , анизотропии триптофановой флуоресценции, флуоресценции хромофора, измеренной при длине волны 715 нм и эллиптичности при длине волны 222 нм от концентрации GdnHCl представлены на Рис. 3.3. Квазиравновесные зависимости характеристик белка от концентрации денатуранта, полученные при денатурации и ренатурации белка, были измерены через 24 ч после приготовления растворов. Дальнейшее увеличение времени уравнивания не приводило к изменению значений регистрируемых характеристик. Поскольку полоса поглощения iRFP713 в холоформе в дальне-красной области спектра существенно изменяется при денатурации белка (Рис. 3.3А и Рис. 3.3Б, вставка), зависимости интенсивности флуоресценции биливердина были скорректированы с учетом изменения оптической плотности при длине волны возбуждения согласно ранее разработанной в нашей лаборатории процедуре (Kuznetsova et al., 2012; Sulatskaya et al., 2011; Sulatskaya et al., 2012).

Полученные результаты свидетельствуют, что денатурация iRFP713 в холоформе под действием GdnHCl необратима. Действительно, перевод

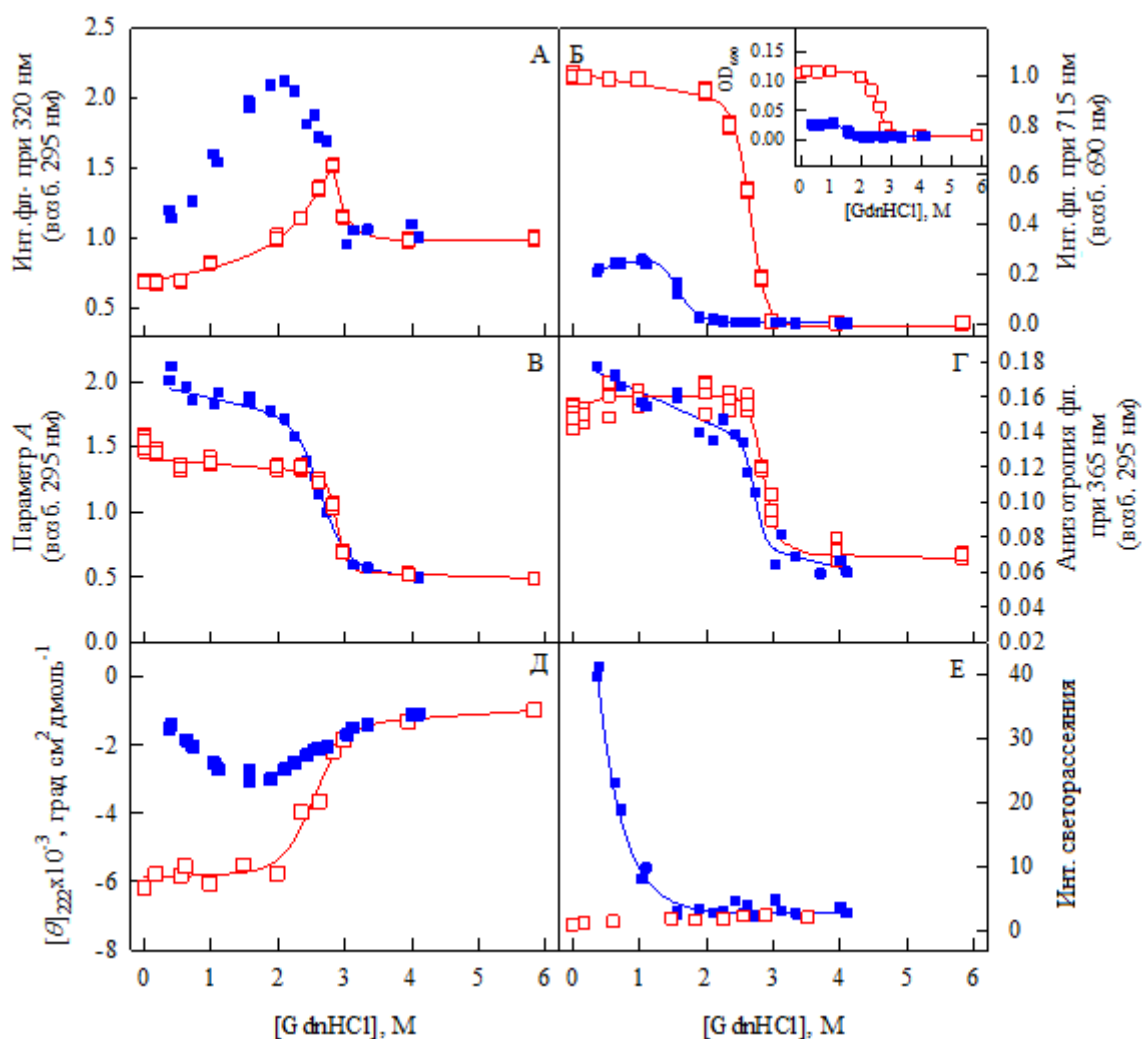


Рис. 3.3. Денатурационные кривые разворачивания – сворачивания iRFP713 в холоформе под действием GdnHCl

(А) Изменение интенсивности флуоресценции триптофановых остатков iRFP713 при $\lambda_{\text{возб}}=295$ нм и $\lambda_{\text{рег}}=320$ нм. Интенсивность флуоресценции белка в развернутом состоянии принята за единицу. (Б) Изменение интенсивности флуоресценции хромофора. Оптическая плотность раствора при длине волны возбуждения флуоресценции BV значительно изменяется (вставка), поэтому значения интенсивности флуоресценции хромофора были исправлены с учетом изменения оптической плотности. Изменение параметра $A=I_{320}/I_{365}$ (В), анизотропии флуоресценции (Г), эллиптичности при длине волны 222 нм (Д) и светорассеяния (Е). Денатурации белка соответствуют открытые символы красного цвета, ренатурации – закрытые символы синего цвета.

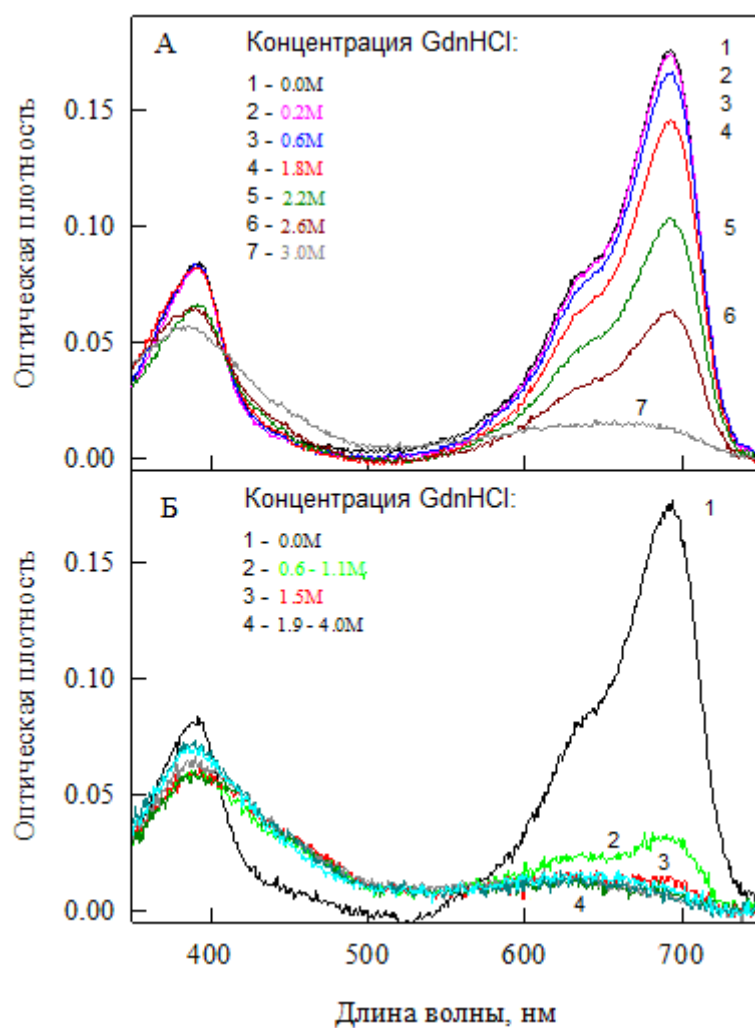


Рис. 3.4

Изменение спектров поглощения iRFP713 в холоформе под действием GdnHCl при денатурации (панель А) и ренатурации белка (панель Б). Цифры на кривых – концентрация GdnHCl. Кривые черного цвета на панели Б – спектр поглощения iRFP713 в холоформе в буферном растворе.

денатурированного белка (для этого iRFP713 в холоформе инкубировали в 4М GdnHCl в течение 8 ч) в раствор, содержащий меньшую концентрацию химического денатуранта, не приводит к восстановлению регистрируемых характеристик белка (Рис. 3.3 и 3.4). При ренатурации iRFP713 в холоформе наблюдается образование частично-свернутого состояния, популярного при концентрациях GdnHCl около 2 М. Это состояние характеризуется менее выраженной по сравнению с нативным состоянием вторичной структурой, не сформированной структурой вокруг хромофора и образованной структурой вокруг триптофановых остатков (Рис. 3.3 и 3.4). Дальнейшее уменьшение концентрации GdnHCl приводит к агрегации молекул в этом частично-свернутом состоянии, о чем свидетельствует существенно увеличение интенсивности светорассеяния при концентрации GdnHCl менее 1.5 М (Рис. 3.3Е). Действительно, ранее было показано, что при определенных условиях GdnHCl может вызывать агрегацию макромолекул белка в частично-свернутом состоянии (Povarova et al., 2010). Уменьшение сигнала КД в дальней УФ-области при концентрации GdnHCl менее 1.5 М (Рис. 3.3Д), вероятно, также обусловлено агрегацией белка, т.к. светорассеяние может искажать спектры КД (Tinoco et al., 1980). Возникает вопрос, что приводит к образованию частично-свернутого состояния молекул iRFP713 и необратимости процесса ренатурации белка, наличие ли в структуре белка хромофора или сложного элемента узла. Чтобы ответить на этот вопрос, мы получили iRFP713 в апоформе, т.е. в форме, не содержащей хромофор.

Мы сравнили свойства белка iRFP713 в апоформе со свойствами холобелка (Рис. 3.1). Спектр поглощения iRFP713 в апоформе содержит доминантный пик поглощения с максимумом при 280 нм, соответствующий поглощению ароматических остатков, и минорные пики с максимумами при 390 и 690 нм, соответствующие поглощению связанного биливердина. Последнее свидетельствует о небольшой примеси в препаратах апоформы холоформы белка. Спектры триптофановой флуоресценции iRFP713 в апо- и холоформах совпадают по форме и положению с максимумом флуоресценции (Рис 3.1В). Другие

характеристики триптофановой флуоресценции (анизотропия, параметр A) также совпадают для двух форм белка. При этом триптофановая флуоресценция в холобелке сильно затухает (Рис. 3.1Г). Более того, время жизни триптофановых остатков в возбужденном состоянии в апобелке в три раза выше по сравнению с временем жизни триптофановых остатков в возбужденном состоянии в холобелке (составляет 3.7 и 1.2 нс, соответственно). Мы предполагаем, что тушение триптофановой флуоресценции в холобелке происходит из-за безызлучательного переноса энергии от триптофановых остатков к хромофору белка. Вторичная структура белка iRFP713 в апо- и в холоформах также одинакова, что подтверждает совпадение спектров КД в дальней УФ-области. Как и ожидалось, iRFP713 в апоформе не имеет выраженного КД в видимой области, поскольку он определяется поглощением хромофора. Более того, iRFP713 в апоформе также не имеет выраженного КД в ближней УФ-области. Вероятно, выраженный спектр КД холобелка в этой области обусловлен поглощением хромофора, который имеет помимо доминантных пиков с максимумами в видимой области (при 390 и 690 нм в связанном состоянии) имеет минорные пики поглощения в УФ-области. Таким образом, совпадение спектров триптофановой флуоресценции и спектров КД в дальней УФ-области для iRFP713 в апо- и холоформах свидетельствует о том, что iRFP713 в апоформе сохраняет вторичную и третичную структуру, присущую нативному белку.

Равновесные зависимости различных характеристик триптофановой флуоресценции и эллиптичности при длине волны 222 нм, полученные при денатурации-ренатурации флуоресцентного белка iRFP713 в апоформе под действием GdnHCl, представлены на Рис. 3.5. Сравнение равновесных зависимостей интенсивности триптофановой флуоресценции, параметра A и эллиптичности при длине волны 222 нм, полученных при денатурации, для iRFP713 в апо- и холоформах представлено на рис. 3.6. Эти данные свидетельствуют о том, что несмотря на одинаковую вторичную и третичную

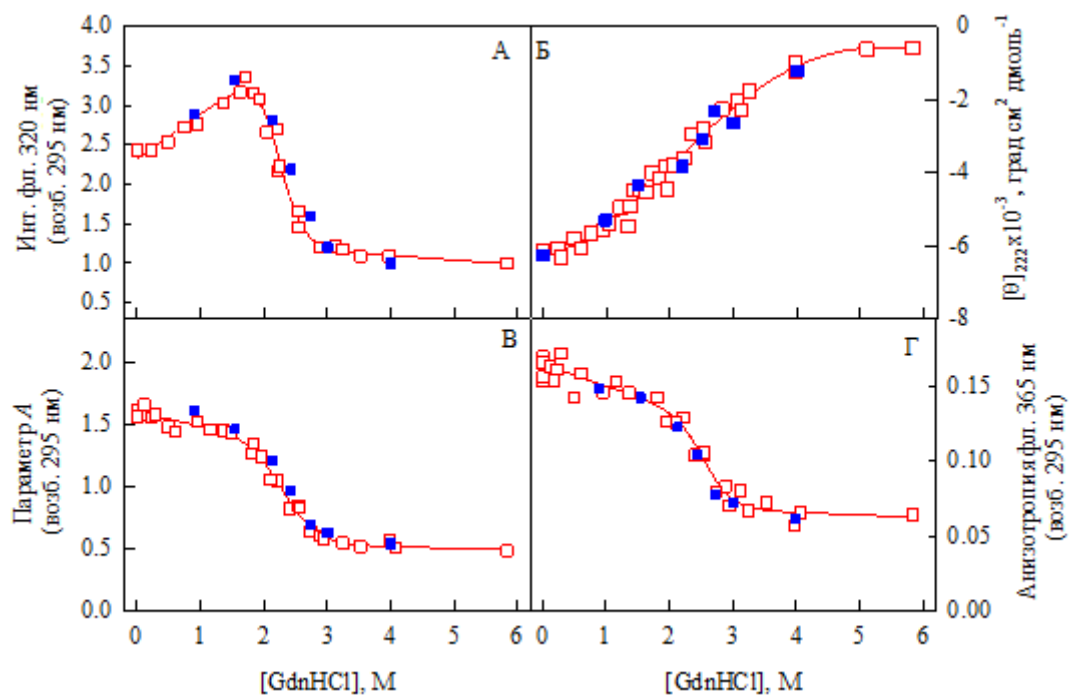


Рис. 3.5. Денатурационные кривые разворачивания – сворачивания iRFP713 в апоформе под действием GdnHCl

(А) Изменение интенсивности флуоресценции триптофановых остатков iRFP713 при длине волны возбуждения 295 нм и длине волны регистрации 320 нм. Интенсивность флуоресценции белка в развернутом состоянии принята за единицу. (Б) Изменение эллиптичности при длине волны 222 нм iRFP713 под действием GdnHCl. Изменение параметра $A = I_{320}/I_{365}$ (панель В) и анизотропии флуоресценции (панель Г). Денатurationи белка соответствуют открытые символы красного цвета, ренатurationи – закрытые символы синего цвета.

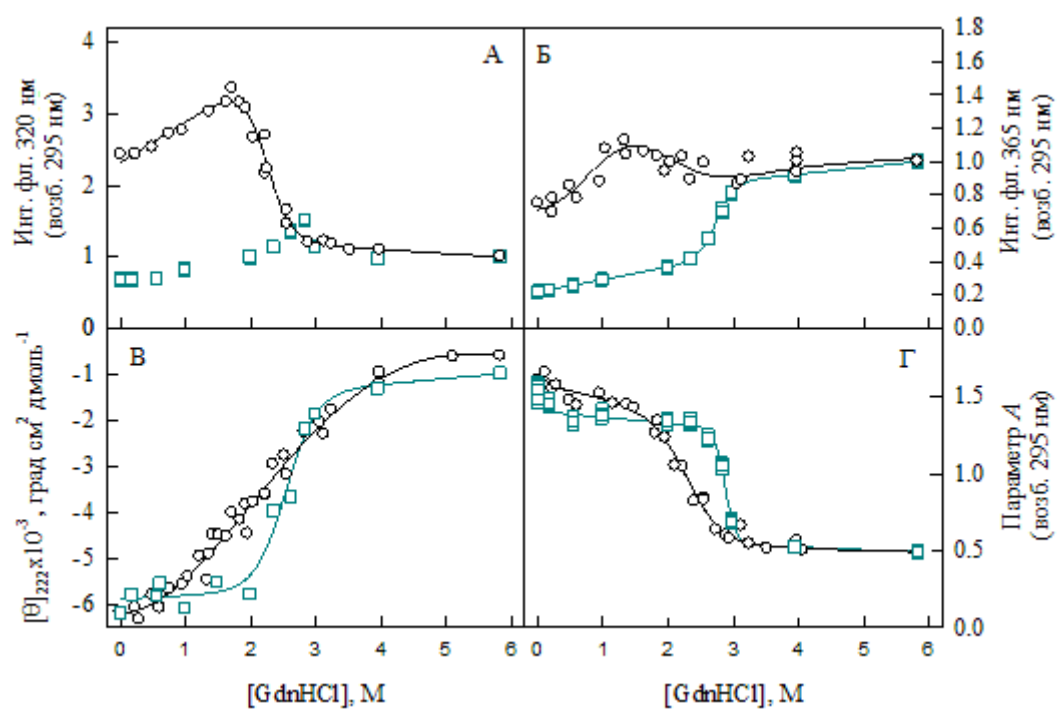


Рис. 3.6. Сравнение устойчивости iRFP713 в апоформе (кружки) и холоформе (квадраты) к действию GdnHCl.

структуру апо- и холобелка, хромофор существенно стабилизирует iRFP713 и делает денатурационный переход более кооперативным. Следует заметить, что значения интенсивности флуоресценции при длине волны 320 и 365 нм для iRFP713 апо- и холоформах было нормировано на значение этих параметров для полностью развернутого белка в соответствующей форме. Мы исходили из предположения, что в развернутом белке уже нет условий для переноса энергии от триптофановых остатков к хромофору и нормированные таким образом зависимости триптофановой интенсивности для белка в апо- и холоформах можно сравнивать (Рис. 3.6А, Б). Действительно, на рис. 3.6А и 3.6В очевидно, что флуоресценция холобелка в нативном состоянии затухает и увеличение флуоресценции холобелка происходит при разрушении структуры белка при высоких концентрациях денатуранта.

Денатурация iRFP713 в апоформе, в отличие от денатурации холобелка, полностью обратима. Таким образом, наличие узла не препятствует эффективному фолдингу белка. Наши данные показывают, что необратимость денатурации iRFP713 и агрегация молекул белка связана с наличием хромофора и необходимостью его упаковки в белковую глобулу.

Было проведено изучение тепловой денатурации iRFP713 в апо- и холоформах (рис. 3.7). Были измерены зависимости от температуры различных характеристик флуоресценции триптофановых остатков белка (интенсивность флуоресценции при 330 нм при возбуждении при 295 нм, параметр $A=I_{320}/I_{365}$). Для холоформы iRFP713 также были зарегистрированы зависимости интенсивности флуоресценции хромофора при тепловой денатурации. Зависимости, измеренные для апобелка, свидетельствуют о наличии перехода в области температур между 50 и 60 °С. При этом полной денатурации белка не происходит, поскольку параметр A не достигает значения, характерного для полностью развернутого состояния. Возможно, это связано с наличием необычной структуры узла типа «восьмерка» стабилизирующей область взаимодействия между PAS и GAF доменами.

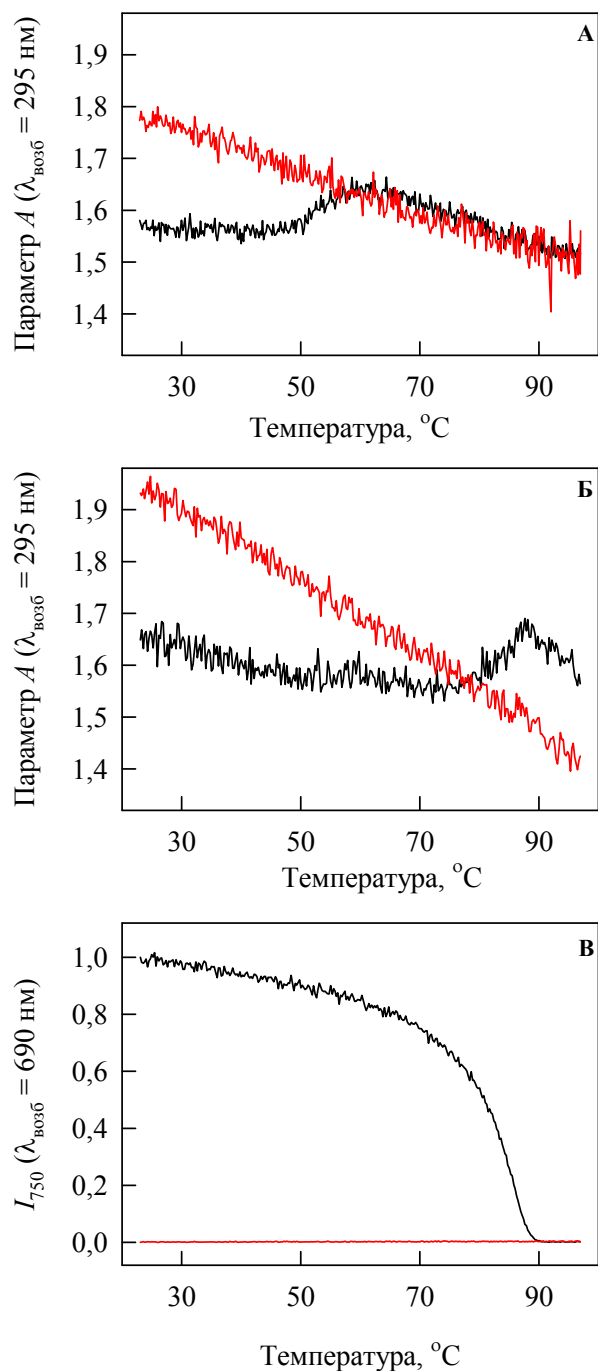


Рис. 3.7. Тепловая денатурация iRFP713 в апоформе (А) и холоформе (Б и В) к действию GdnHCl.

Для белка в апоформе было измерено изменение параметра A при тепловой денатурации. Для белка в холоформе было измерено изменение параметра A (панель Б) и флуоресценции хромофора (панель В) при тепловой денатурации. Раствор белка после первого прогрева (кривые черного цвета) было охлажден до 23 °C и повторно прогрет (кривые красного цвета).

Кривые плавления холоформы iRFP713 свидетельствуют о наличии двух переходов: в области температур между 50 и 60 °C и в области температур более 80 °C. При этом холобелок iRFP713 сохраняет флуоресценцию биливердина в диапазоне температур до 80 °C, после чего наблюдается ее резкое тушение. Таким образом, очевидно, что BV в холобелке значительно стабилизирует GAF-домен, в результате чего он плавиться лишь при температуре более 80 °C, в то время как PAS домен гораздо менее стабилен и плавиться при температуре между 50 и 60 °C. Тепловая денатурация iRFP713 в апо- и холоформах необратима, о чем свидетельствует несовпадение зависимостей регистрируемых характеристик, полученных при повторном прогреве белка, с характеристиками, измеренными при первом прогреве белка. Вероятно, это связано с агрегацией частично-свернутых молекул белка, накапливающихся при инкубации белка при высокой температуре.

3.2. Изучение спектральных свойств биливердина, его производных и аналогов в растворителях с различной полярностью и вязкостью. Изучение влияния температуры на фотофизические свойства биливердина

Биливердин – естественный хромофор бактериальных фитохромов является промежуточным продуктом распада гемоглобина. Были приготовлены растворы биливердина в 100 мМ Tris-HCl буфере с pH (8.6 ± 0.1) и 100 мМ двухосновном карбонатном буфере с pH (10.8 ± 0.1). Оказалось, что после 48 часов хранения в двухосновном карбонатном буфере с pH (10.8 ± 0.1) биливердин значительно выцветает. Поэтому все спектральные исследования биливердина в водных и водно-глицериновых смесях были выполнены при pH 8.6 (100 мМ Tris-HCl буфер).

Спектр поглощения как свободного, так и связанного с белком биливердина имеет сложный характер. В спектре наблюдается два пика с максимумами в области 395 нм и 690 нм. Если для биливердина в составе белка коэффициент молярной экстинкции в области этих пиков приблизительно одинаков, то для свободного биливердина поглощение в области длинноволнового пика значительно меньше, чем поглощение в области коротковолнового пика. Спектр поглощения биливердина в составе белка сдвинут на 13 нм в длинноволновую сторону по сравнению со спектром свободного биливердина (Рис. 3.8).

Показано, что спектральные свойства BV слабо изменяются с увеличением вязкости растворителя, которое мы моделировали за счет увеличения содержания глицерина и понижения температуры. (Рис. 3.9). Интенсивность флуоресценции биливердина при возбуждении в области коротковолнового пика ($\lambda_{\text{возб}} = 395$ нм) значительно меньше интенсивности флуоресценции при возбуждении в области длинноволнового пика ($\lambda_{\text{возб}} = 680$ нм). Интенсивность флуоресценции слабо зависит от температуры и

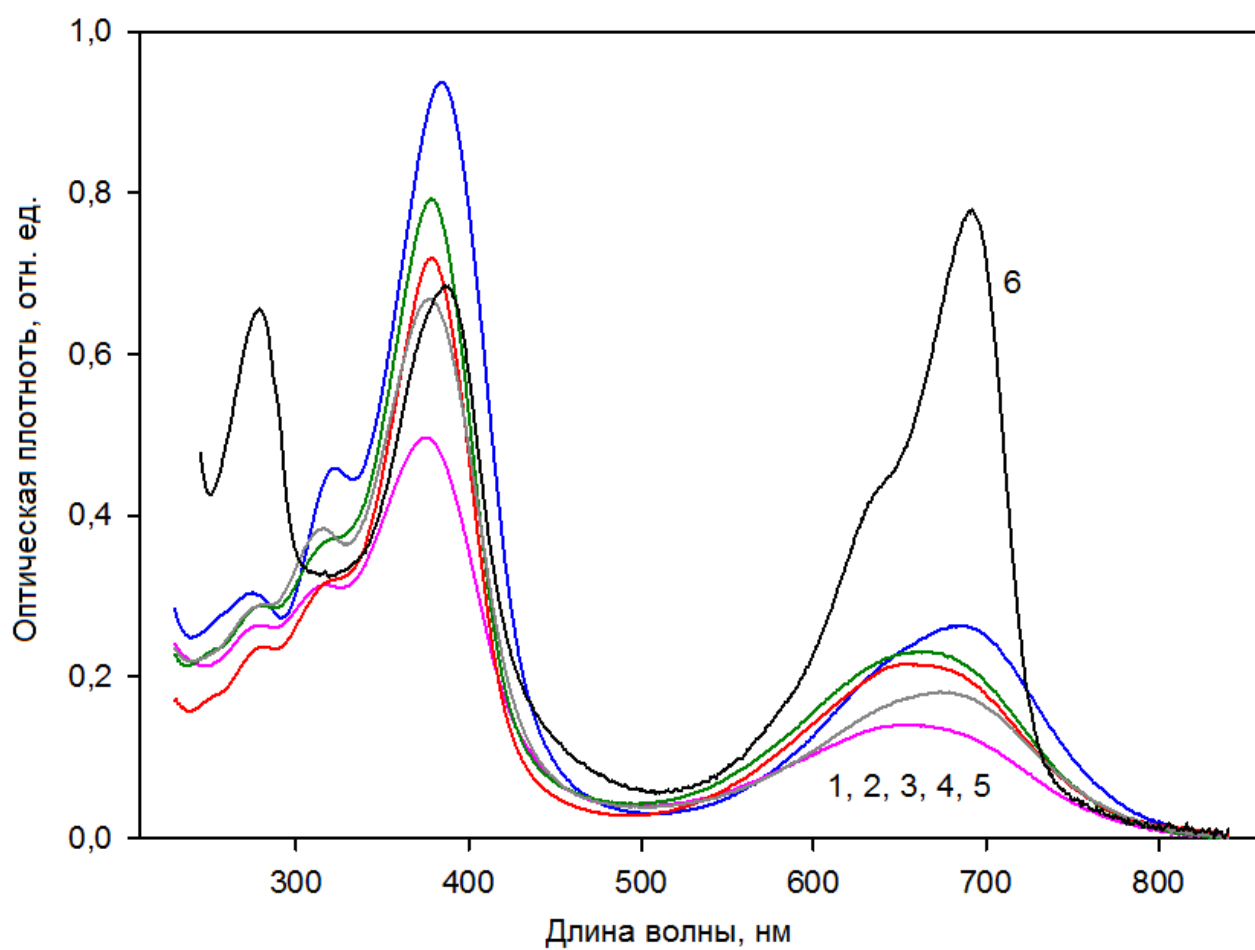


Рис. 3.8. Спектры поглощения биливердина в различных растворителях: (1) изобутиловом спирте, (2) этиловом спирте, (3) 91% глицерине, (4) воде pH 7.0, (5) 100 mM Tris-HCl буфере pH 8.6, (6) в белке iRFP713 представлены красным, зеленым, синим, малиновым, серыми цветом и черным цветами соответственно.

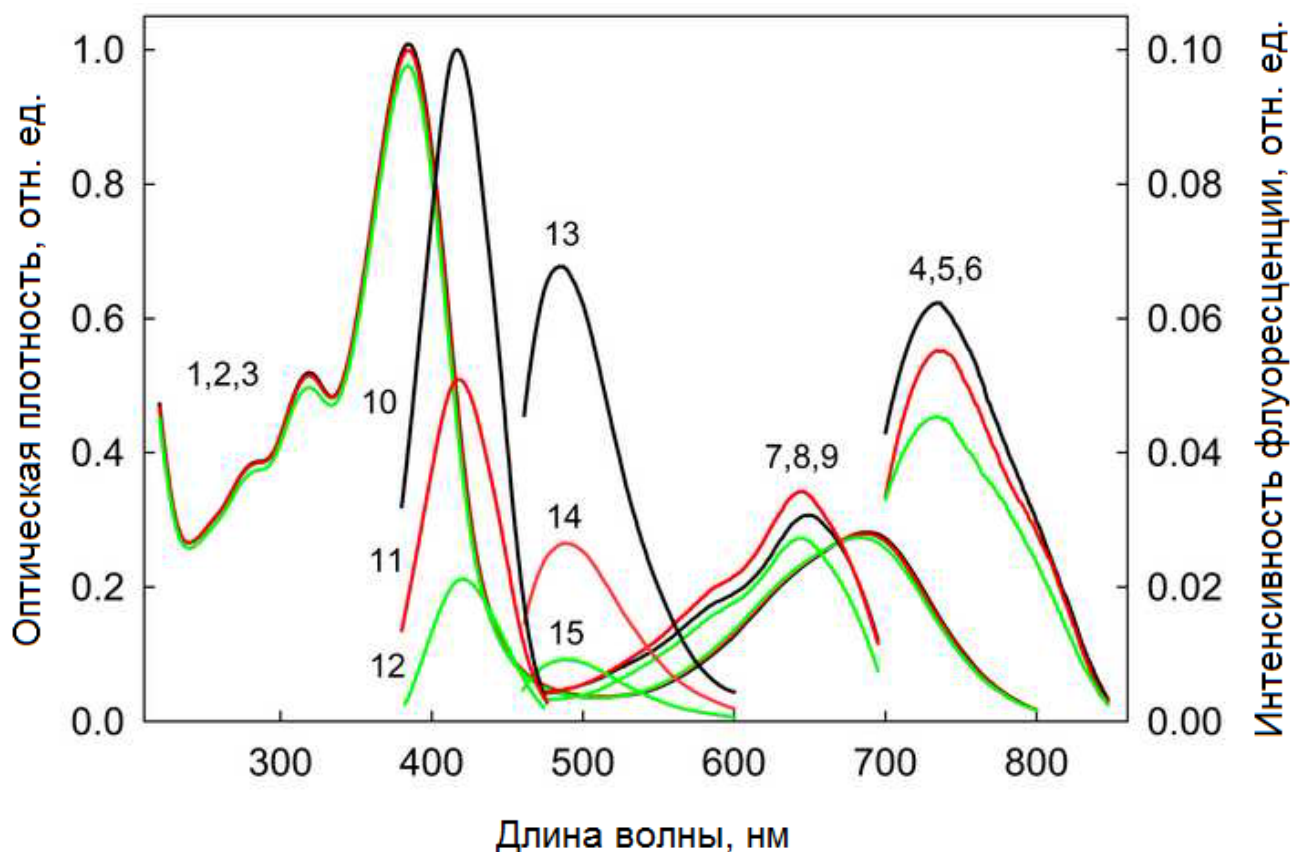


Рис. 3.9. Влияние вязкости и температуры растворителя на свойства биливердина

Спектры поглощения (кривые 1, 2, 3), флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 680\text{нм}$) (кривые 4, 5, 6), возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 715\text{нм}$) - (кривые 7, 8, 9) биливердина в 91% растворе глицерина при температурах 5, 23 и 50°C представлены черным, красным и зеленым цветом, соответственно. Спектры флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 395\text{нм}$) - (кривая 10, 11, 12), возбуждения флуоресценции ($\lambda_{\text{рег}} = 510\text{нм}$) - (кривая 13, 14, 15), биливердина в 91% растворе глицерина при температуре 5, 23 и 50°C представлены черным, красным и зеленым цветом, соответственно.

вязкости растворителя. Обращает на себя внимание тот факт, что спектры возбуждения флуоресценции не совпадают с соответствующими пиками спектра поглощения, причем спектр возбуждения флуоресценции коротковолновой полосы сдвинут относительно полосы поглощения в длинноволновую область, а спектр возбуждения флуоресценции длинноволновой полосы – в коротковолновую область относительно длинноволновой полосы поглощения. Это свидетельствует о сложном характере полос поглощения биливердина.

Биливердин не растворим в неполярных растворителях, таких как толуол и гексан, однако растворим в спиртах. Были измерены спектры поглощения, флуоресценции и возбуждения флуоресценции биливердина в этаноле и бутаноле. Спектр поглощения биливердина в спиртах имеет тот же характер, что и водных растворах (Рис. 3.10). Полученные данные свидетельствуют о том, что диэлектрические свойства растворителя имеют существенное влияние на спектральные свойства биливердина. Наиболее интенсивная флуоресценция при возбуждении в коротковолновой полосе поглощения наблюдается для биливердина в Tris-HCl буфере, pH 8.6 (Рис. 3.10), в то время как при возбуждении в длинноволновой области максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается для биливердина в бутаноле. Это, по-видимому, обусловлено значительно большим коэффициентом молярной экстинкции биливердина в этом растворителе (Рис. 3.11).

Обращает на себя внимание тот факт, что спектры флуоресценции свободного биливердина в спиртах (особенно в бутаноле) существенно (на 15 нм) сдвинуты в длинноволновую область спектра по сравнению со спектром биливердина встроенного в белок. Это наблюдение свидетельствует о том, что, в принципе, возможно получение мутантных форм белков с более длинноволновой флуоресценцией, по сравнению со спектром флуоресценцией биливердина в iRFP713.

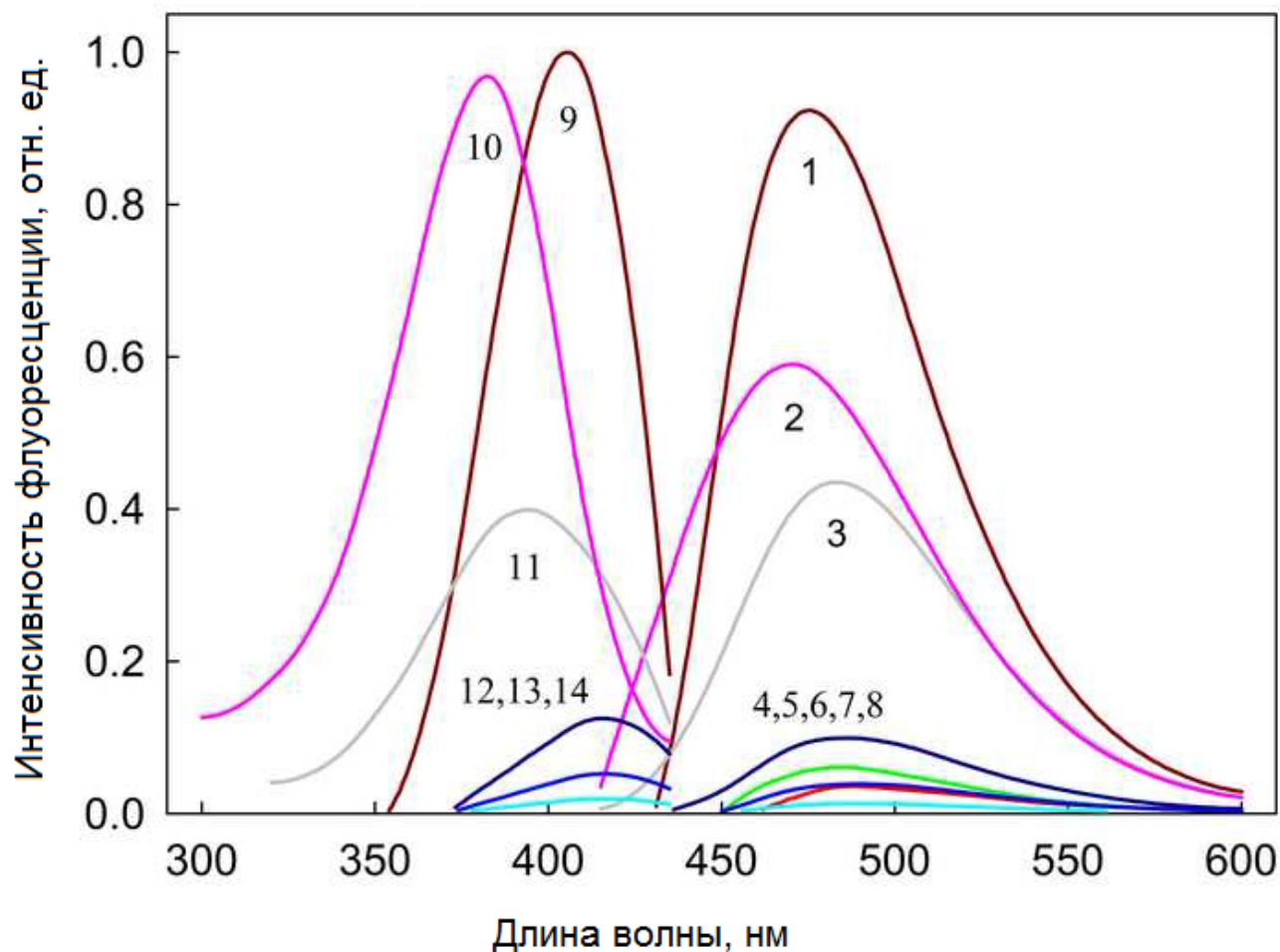


Рис. 3.10. Спектральные свойства BV в неполярных растворителях.

Спектры флуоресценции (кривые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8) при $\lambda_{\text{возб}} = 395$ нм, возбуждения флуоресценции $\lambda_{\text{возб}} = 455$ нм (кривые 9, 10, 11, 12, 13, 14) биливердина в различных растворителях: DMSO, изобутиловом спирте, этиловом спирте, 91% глицерине при температуре 5, 23 и 50°C, воде pH 7.0, 100 mM Tris-HCl буфер, pH 8.6 представлены коричневым, красным, зеленым, темно синим, синим, бирюзовым, малиновым и серыми цветом, соответственно.

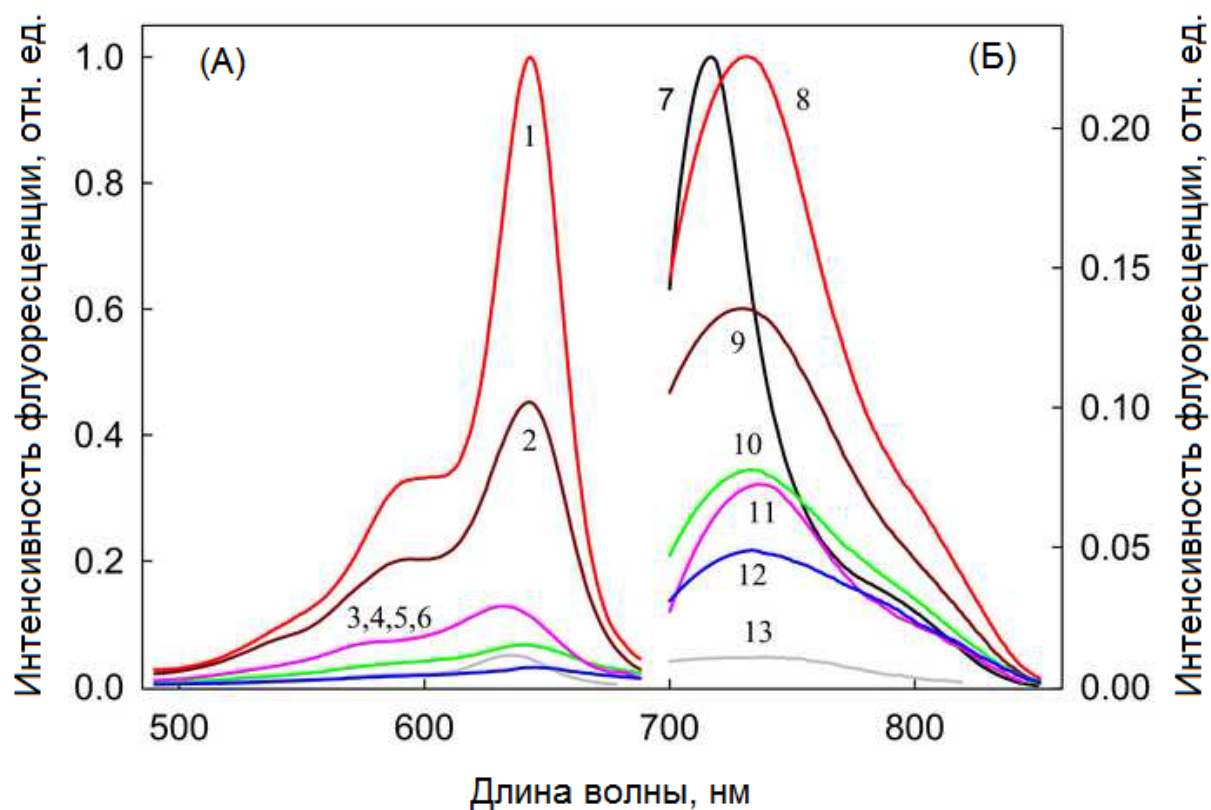


Рис. 3.11. Спектральные свойства BV в неполярных растворителях.

(А) Спектры возбуждения флуоресценции (кривые 1, 2, 3, 4, 5 и 6) $\lambda_{\text{рег}} = 715\text{ нм}$ биливердина в различных растворителях: изобутиловом спирте, DMSO, этиловом спирте, воде pH 7.0, 91% глицерине, 100 mM Tris-HCl буфере pH 8.6 представлены красным, коричневым, зеленым, малиновым, синим и серыми цветами соответственно. Спектры нормированы на интенсивность флуоресценции биливердина в изобутиловом спирте (левая ось ординат).

(В) Спектры флуоресценции биливердина (кривые 8, 9, 10, 11, 12 и 13) $\lambda_{\text{возб}} = 680\text{ нм}$ в различных растворителях: изобутиловом спирте, этиловом спирте, 91% глицерин, воде pH 7.0, 100 mM Tris-HCl буфере, pH 8.6 представлены красным, зеленым, синим, малиновым и серым цветом, соответственно. Спектры нормированы на интенсивность флуоресценции биливердина в изобутиловом спирте (правая ось ординат). Спектр флуоресценции биливердина в составе белка iRFP713 (кривая 7) представлен черным цветом. Спектры нормированы на интенсивность флуоресценции биливердина в составе iRFP713 белка (левая ось ординат).

3.3. Определение параметров равновесного связывания ближне-инфракрасного флуоресцентного белка на основе бактериального фитохрома с биливердином

Эксперименты по изучению взаимодействия iRFP713 в апоформе с BV проводили методом равновесного микродиализа (Рис. 3.12). Метод равновесного микродиализа основан на использовании микродиализных камер, состоящих из двух микродиализных ячеек, соединенных проницаемой для низкомолекулярных веществ мембраной. В ячейку №1 помещают раствор рецептора, в ячейку №2 – низкомолекулярный лиганд этого рецептора. Поскольку низкомолекулярный лиганд может свободно диффундировать через мембрану, концентрация свободного лиганда в обеих ячейках микродиализной камеры будет стремиться выровняться. По достижении равновесия, концентрация лиганда в 1-ой ячейке будет превосходить концентрацию лиганда в 2-ой ячейке (C_f) на количество связанного с рецептором лиганда (C_b). Эта величина определяется по формуле $C_b = C_0 - 2C_f$, где C_0 – начальная концентрация лиганда в ячейке №2.

В наших экспериментах, мы в одну диализную ячейку помещали раствор iRFP713 в апоформе, концентрация которого составляла около 8 мкМ. В другую диализную ячейку помещали буферный раствор BV в избыточной по сравнению с белком концентрации, от 25 до 70 мкМ. Микродиализные камеры инкубировали в течение 5 суток при 4°C, для того чтобы концентрация свободно диффундирующего BV в обеих диализных ячейках выровнялась. Время уравнивания было определено в тестовых экспериментах, в которых в одну ячейку помещали BV, а в другую ячейку – буферный раствор.

Поскольку связывание BV с iRFP713 включает стадию ковалентной модификации, этот процесс является необратимым и неравновесным. Это значит, что расчет константы связывания BV с iRFP713 некорректен. Тем не менее, эти эксперименты позволяют определить завершенность реакции взаимодействия хромофора с белком. Было показано, что BV

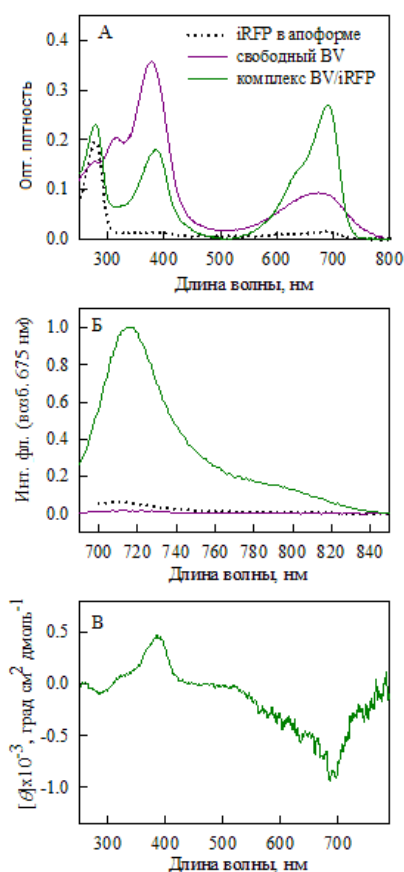


Рис. 3.12. Взаимодействие iRFP713 в апоформе с BV.

Спектры поглощения (А), флуоресценции, $\lambda_{\text{возб}}=690$ нм (Б) и КД в видимой области (В) для комплекса iRFP713 в апоформе с BV (сплошная кривая зеленого цвета). Растворы комплекса iRFP713 с BV были получены методом микродиализа. Согласно полученным данным концентрация связанного BV составляла около 8 мкМ. Концентрация iRFP713 в апоформе также составляла около 8 мкМ. Приведены спектры поглощения и флуоресценции свободного BV (кривая бордового цвета) в концентрации, эквивалентной концентрации связанного хромофора, и iRFP713 в апоформе (кривая черного цвета, точки).

взаимодействует с iRFP713 в апоформе в соотношении 1 к 1, т.е. достигается полное насыщение белка BV, что, вероятно, свидетельствует об отсутствии неправильно-свернутых молекул белка. Также наблюдается характерное изменение спектров поглощения в видимой области, появление флуоресценции и выраженного КД в видимой области спектра. Эти данные свидетельствуют о том,

что апобелок способен связывать биливердин и конформация и микроокружение хромофора, вероятно, такие же, как в нативном iRFP713.

Мы существенно расширили границы применения метода равновесного микродиализа показав, что он может быть использован также в случае необратимой реакции связывания лиганда с рецептором. В этом случае применение метода равновесного микродиализа позволяет определить степень завершенности реакции связывания и охарактеризовать свойства комплекса лиганда с рецептором, поскольку вклад в измеряемый сигнал находящегося в растворе свободного лиганда может быть корректно учтен.

3.4. Изучение кинетики взаимодействия флуоресцентного белка на основе бактериального фитохрома с биливердином и изменения структуры его холоформы при изменении внешних условий (например, кислотности, ионов металлов, окислительно-восстановительного потенциала)

Были проведены эксперименты по изучению кинетики взаимодействия флуоресцентного белка iRFP713 в апоформе с его лигандом биливердином. Эксперименты проводили в 100 mM TrisHCl буфере, pH 8.6. Концентрация белка составляла 2 мкМ. Концентрация добавленного биливердина составляла 45 мкМ. В качестве регистрируемой характеристики при изучении взаимодействия биливердина с апобелком была выбрана интенсивность флуоресценции при длине волны регистрации 720 нм и длине волны возбуждения 690 нм. Свободный биливердин и белок iRFP713 в апоформе в этой области спектра практически не флуоресцируют. Результаты представлены на рисунке 3.13. Показано, что для эффективного взаимодействия белка iRFP713 в апоформе с биливердином требуется добавление восстанавливающего агента ТСЕР, вероятно, для активации цистеинового остатка, находящегося в N-конце PAS-домена белка. Полученные данные показывают, что белок iRFP713 в апоформе способен связывать свой лиганд.

Следует учитывать, что интенсивность флуоресценции связанного лиганда пропорциональна не его концентрации (или оптической плотности), а доли света, поглощенного раствором. В нашей лаборатории разработан способ нормировки данных флуоресценции с приведением к значениям, пропорциональным оптической плотности. В нашем случае подобная нормировка требует знания изменения во времени оптической плотности связанного с белком лиганда. Поскольку свободный лиганд также поглощает в видимой области, вычленив зависимость изменения оптической плотности связанного лиганда от времени не представляется возможным. Это значит, что кинетические зависимости изменения интенсивности

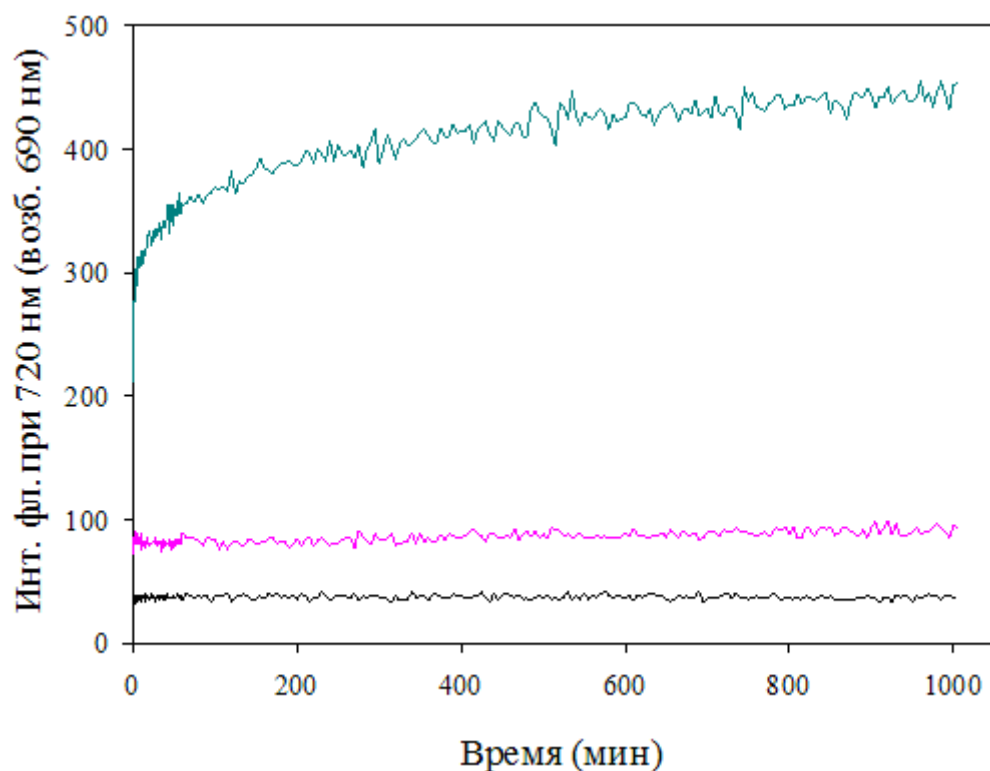


Рис. 3.13. Взаимодействие апобелка iRFP713 с биливердином.

Измерения были выполнены в присутствии ТСЕР в конечной концентрации 1 мкМ (кривая зеленого цвета), и в отсутствие восстанавливающего агента (кривая розового цвета). Для сравнения приведены данные для раствора апобелка iRFP713, в который не был добавлен биливердин (кривая черного цвета).

флуоресценции, полученные при взаимодействии биливердина с белком, не могут быть скорректированы, поэтому их теоретический анализ будет некорректен.

Были изучены свойства холоформы флуоресцентного белка iRFP713 при изменении внешних условий (Рис. 3.14). В наших экспериментах была изменена кислотность среды, белок был растворен в буферных растворах с pH 8.0 и 8.6. Были измерены спектры поглощения белка и флуоресценции его триптофановых остатков (длина волны возбуждения 295 нм) и хромофора (длина волны возбуждения 675 нм). Было показано, что защелачивание раствора белка не приводит к значительному изменению регистрируемых спектров. Параметры триптофановой флуоресценции, такие как параметр A и анизотропия флуоресценции, также не менялись. Эти данные свидетельствуют о сохранении структуры белка в холоформе в умеренно щелочных условиях.

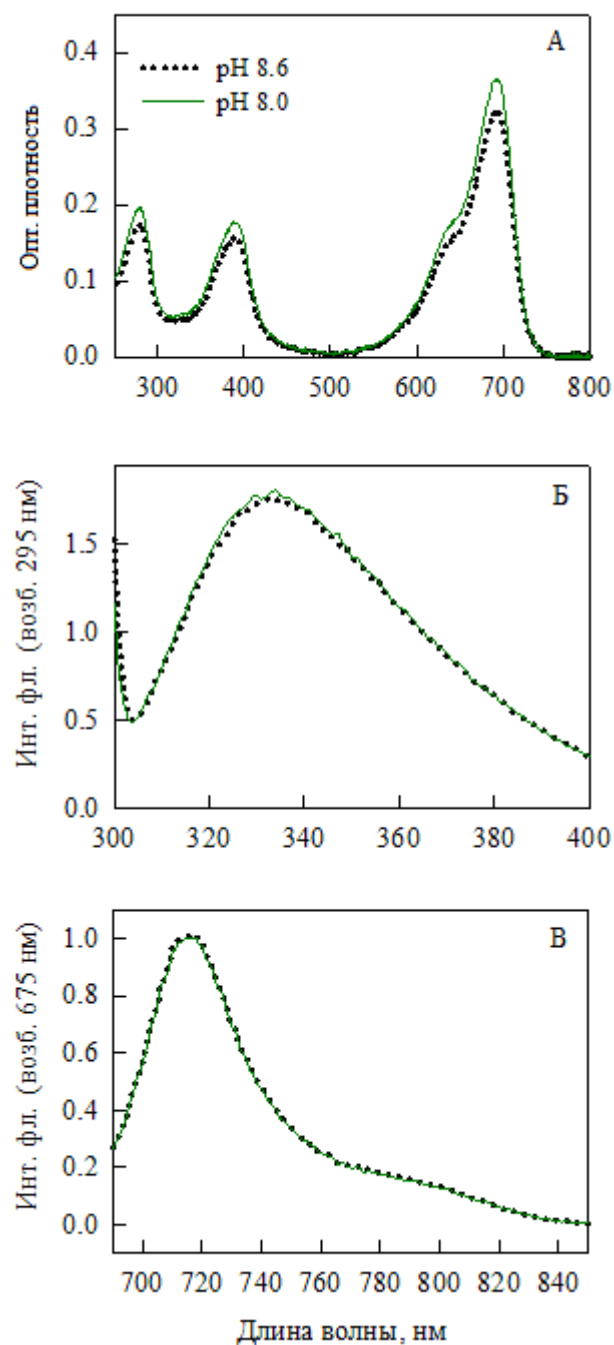


Рис. 3.14. Характеристики холобелка iRFP713 при изменении внешних условий среды.

(А) Спектр поглощения; (Б, В) Спектры флуоресценции триптофановых остатков белка и хромофора, соответственно. Спектры были измерены для белка в растворе с рН 8.0 (кривые зеленого цвета) и в растворах с рН 8.6 (кривые черного цвета, точки).

3.5. Ковалентное и нековалентное связывание BV с мутантными формами iRFP713, iRFP682 и iRFP670

Ближне-инфракрасный димерный FP белок iRFP713 имеет длинноволновые спектры поглощения и флуоресценции, в то время как спектры поглощения и флуоресценции iRFP682 и iRFP670 сдвинуты в коротковолновую область приблизительно на ~30-50 нм. Основной отличительной особенностью iRFP682 и iRFP670 является наличие Cys256 в GAF домене, в дополнение к каноническому Cys15 в PAS домене каждого мономера белка (Рис. 3.15). Мы создали мутантные варианты димерных флуоресцентных белков iRFP670, iRFP682 и iRFP713, имеющие цистеиновые остатки Cys15 только в PAS доменах (iRFP670/C256S, iRFP682/C256S и iRFP713), имеющие цистеиновые остатки Cys256 только в GAF доменах (iRFP670/C15S, iRFP682/C15S и iRFP713/C15S/V256C), имеющие цистеиновые остатки как в PAS так и GAF доменах (iRFP670, iRFP682 и iRFP713/V256C), и не имеющие этих цистеиновых остатков (iRFP670/C15S/C256S, iRFP682/C15S/C256S и iRFP713/C15S). Бактерии, экспрессирующие любой из этих вариантов NIR FPs, были окрашены, что свидетельствует о том, что все исследуемые формы NIR FPs способны эффективно связывать BV. Чтобы определить, какие из исследуемых вариантов связывают BV ковалентно, а в каких из них BV лишь встраивается в карман GAF доменов, мы использовали метод цинкового окрашивания. Варианты NIR FPs, содержащие только канонические для BphPs остатки Cys15 в PAS доменах, как и ожидалось, связывают BV ковалентно, а варианты NIR FPs, не содержащие цистеиновых остатков Cys15 и Cys256, не окрашиваются цинком, т.е. не способны связывать хромофор ковалентно. Окрашивание цинком показало, что в белках, имеющих цистеиновые остатки и в PAS и в GAF доменах, BV связан ковалентно (Рис. 3.16). Довольно неожиданный результат получен для вариантов NIR FPs, имеющих цистеиновые остатки Cys256 только в GAF доменах. Для них цинковое окрашивание также подтвердило ковалентное связывание красителя. Таким

<i>RpBphP2</i> (4E04)	1 MTEGSVARQP	20 DLSTCDDEPI	30 HIPGAIQPHG	40 LLLALAADMT	50 IV-AGSDNLP	60 ELTGLAIGAL
<i>RpBphP2</i>	MTEGSVARQP	DLSTCDDEPI	HIPGAIQPHG	LLLALAADMT	IV-AGSDNLP	ELTGLAIGAL
<i>iRFP713</i>	MAEGSVARQP	DLSTCDDEPI	HIPGAIQPHG	LLLALAADMT	IV-AGSDNLP	ELTGLAIGAL
<i>iRFP682</i>	MAEGSVARQP	DLSTCDDEPI	HIPGAIQPHG	LLLALAADMT	IV-AGSDNLP	ELTGLAIGAL
<i>RpBphP6</i>	MPRK-----V	DLTSCDREPI	HIPGSIQPCG	CLLACDAQAV	RITRISENAG	AFFGRETPRV
<i>iRFP670</i>	MARK-----V	DLTSCDREPI	HIPGSIQPCG	CLLACDAQAV	RITRITENAG	AFFGRETPRV
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	PAS					
<i>RpBphP2</i> (4E04)	70 IGRSAADVFD	80 SETHNRLTIA	90 LAEPGAAVGA	100 PIAVGFTMPD	110 GERAFFNGSWH	120 RHDQLVFLEL
<i>RpBphP2</i>	IGRSAADVFD	SETHNRLTIA	LAEPGAAVGA	PIAVGFTMRK	DAGFV-GSWH	RHDQLVFLEL
<i>iRFP713</i>	IGRSAADVFD	SETHNRLTIA	LAEPGAAVGA	PITVGFTMRK	DAGFI-GSWH	RHDQLIFLEL
<i>iRFP682</i>	IGRSAADVFD	SETHNRLTIA	LAEPGAAVGA	PITVGFTMRK	DAGFI-GSWH	RHDQLIFLEL
<i>RpBphP6</i>	GELLADYFGE	TEAHALRNAL	AQSSDPKRPA	LIFGWRDGLT	GRTFD-ISLH	RHDGTSIVEF
<i>iRFP670</i>	GELLADYFGE	TEAHALRNAL	AQSSDPKRPA	LIFGWRDGLT	GRTFD-ISLH	RHDGTSIIEF
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	PAS					
<i>RpBphP2</i> (4E04)	130 EPPQRDVRYP	140 QAFFRSVRSR	150 IRRLQAAETL	160 ESACAAAQAE	170 VREITGFDRV	180 MIYRFASDFS
<i>RpBphP2</i>	EPPQRDVAEP	QAFFRRTNSA	IRRLQAAETL	ESACAAAQAE	VREITGFDRV	MIYRFASDFS
<i>iRFP713</i>	EPPQRDVAEP	QAFFRRTNSA	IRRLQAAETL	ESACAAAQAE	VRKITGFDRV	MIYRFASDFS
<i>iRFP682</i>	EPPQRDVAEP	QAFFRRTNSA	IRRLQAAETL	ESACAAAQAE	VRKITGFDRV	MIYRFASDFS
<i>RpBphP6</i>	EPAAADQADN	PL--RLTRQI	IARTKELKSL	EEMAARVPRY	LQAMLGYHRV	MMYRFADDGS
<i>iRFP670</i>	EPAAAEQADN	PL--RLTRQI	IARTKELKSL	EEMAARVPRY	LQAMLGYHRV	MLYRFADDGS
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	PAS	GAF				
<i>RpBphP2</i> (4E04)	190 GEVIAEDRCA	200 EVESYLGLHF	210 PASDIPAQAR	220 RLYTINPVRI	230 IPDINYPVP	240 VTPDLNPRTG
<i>RpBphP2</i>	GEVIAEDRCA	EVESYLGLHF	PASDIPAQAR	RLYTINPVRI	IPDINYPVP	VTPDLNPVTG
<i>iRFP713</i>	GEVIAEDRCA	EVESKLGLHY	PASTVPAQAR	RLYTINPVRI	IPDINYPVP	VTPDLNPVTG
<i>iRFP682</i>	GVVIAEDRCA	EVESKLGLHY	PASAVPAQAR	RLYTINPVRI	IPDINYPVP	VTPDLNPVTG
<i>RpBphP6</i>	GKVIGEAKRS	DLESFLGQHF	PASDIPQQAR	LLYLKNAIRV	ISDSRGISSR	IVPERDAS-G
<i>iRFP670</i>	GMVIGEAKRS	DLESFLGQHF	PASLVPQQAR	LLYLKNAIRV	VSDSRGISSR	IVPEHDAS-G
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	GAF					
<i>RpBphP2</i> (4E04)	250 RPIDLSFAIL	260 RSVSPVHLEY	270 MRNIGMHGTM	280 SISILRGERL	290 WGLIACHHRK	300 PNYVDLEVRQ
<i>RpBphP2</i>	RPIDLSFAIL	RSVSPVHLEY	MRNIGMHGTM	SISILRGERL	WGLIACHHRK	PNYVDLDGRQ
<i>iRFP713</i>	RPIDLSFAIL	RSVSPVHLEF	MRNIGMHGTM	SISILRGERL	WGLIVCHHRT	PYYVDLDGRQ
<i>iRFP682</i>	RPIDLSFAIL	RSVSPCHLEF	MRNIGMHGTM	SISILRGERL	WGLIVCHHRT	PYYVDLDGRQ
<i>RpBphP6</i>	AALDLSFAHL	RSVSPIHLEY	LRNMGVSASM	SLSIIIDGTL	WGLIACHHYE	PRAVPMAQRV
<i>iRFP670</i>	AALDLSFAHL	RSISPCHLEF	LRNMGVSASM	SLSIIIDGTL	WGLIICHHYE	PRAVPMAQRV
	-----	-----	-----	-----	-----	-----
	GAF					
<i>RpBphP2</i> (4E04)	310 ACELVAQVLA	320 WQIGVMEEQA				
<i>RpBphP2</i>	ACELVAQVLA	WQIGVMEE				
<i>iRFP713</i>	ACELVAQVLA	WQIGVMEE				
<i>iRFP682</i>	ACELVAQVLA	WQIGVMEE				
<i>RpBphP6</i>	AAEMFADFFS	LHFTAANNQR				
<i>iRFP670</i>	AAEMFADFLS	LHFTAANNQR				
	-----	-----				
	GAF					

Рис. 3.15. Аминокислотная последовательность флуоресцентных белков iRFP682, iRFP670, iRFP713 и RpBphP6-PAS-GAF and RpBphP2-PAS-GAF, бактериальных фитохромов, на основании которых они сконструированы.

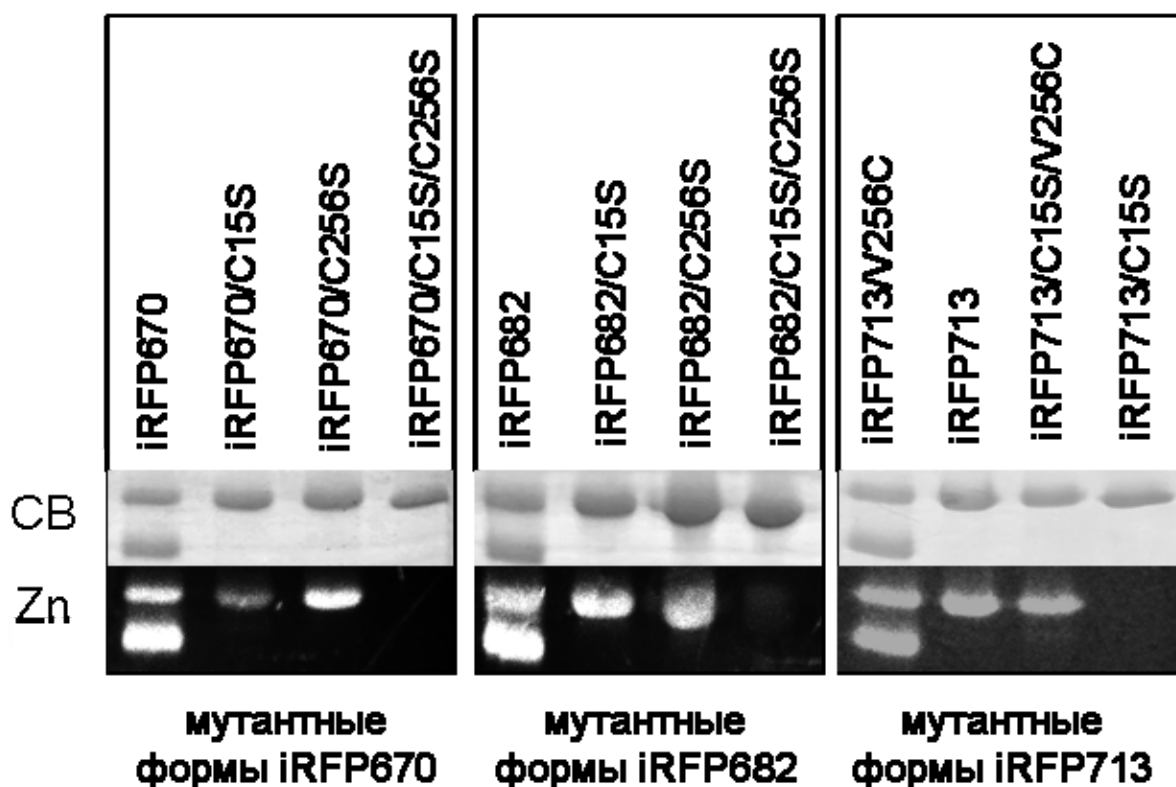


Рис. 3.16. Электорофореграмма мутантных форм белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670, которые использовались в спектроскопических исследованиях. Окрашивание с помощью Кумасси голубого (CB) и ZnCl₂ (Zn).

образом, BV способен ковалентно взаимодействовать не только с каноническим Cys15 BphPs, но и с Cys256 в GAF доменах белков.

3.6. Структура и собственная УФ-флуоресценция NIR FPs и их мутантных вариантов с различным содержанием и локализацией цистеиновых остатков.

Для всех мутантных форм iRFP682 и iRFP670 были измерены различные характеристики триптофановой флуоресценции (параметр A , анизотропия флуоресценции, спектры флуоресценции) (рис. 3.17, табл. 1). Спектры триптофановой флуоресценции и значения параметра A мутантных форм iRFP682

совпадают с этими характеристиками для белка iRFP713. Это свидетельствует о том, что микроокружение триптофановых остатков в мутантных формах белка iRFP682 существенно не меняется по сравнению с микроокружением триптофановых остатков белка iRFP713. Это ожидаемый результат, поскольку iRFP713 и iRFP682 сконструированы на основании одного и того же бактериального фитохрома RpVphP2. iRFP713 и iRFP682 высокоомологичны и последовательность iRFP682 отличается от последовательности iRFP713 лишь тремя аминокислотными заменами, ни одна из которых не изменяет микроокружение триптофановых остатков: Glu182Val, Thr204Ala, Val256Cys (здесь нумерация дана согласно рис. 3.15).

Спектры триптофановой флуоресценции мутантных форм iRFP670 сдвинуты в более коротковолновую область на 3 нм по сравнению со спектрами белка iRFP713. Мутантные формы iRFP670 также имеют более высокое значение параметра *A*. Провести анализ микроокружения триптофановых остатков белка iRFP670 и его мутантных форм невозможно, поскольку отсутствуют данные рентгеноструктурного анализа этих белков и их прародителя RpVphP6. Однако, зная аминокислотную последовательность этих белков и сравнивая ее с аминокислотной последовательностью iRFP713, возможно сделать некоторые предположения о характеристиках

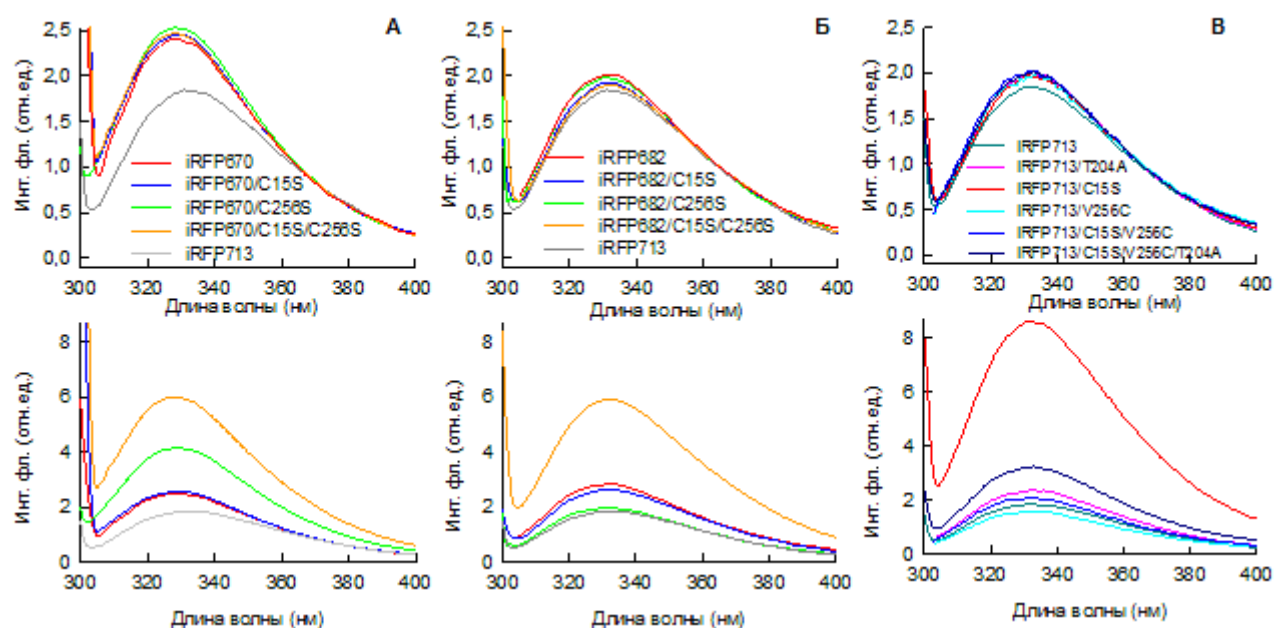


Рис. 3.17. Спектры типтофановой флуоресценции мутантных форм iRFP670 (А), iRFP682 (Б) и iRFP713 (В), имеющих различную локализацию цистеиновых остатков.

Верхняя панель - сравнение спектров по форме, спектры белков нормированы на свое значение I_{365} ;

Нижняя панель - сравнение по интенсивности флуоресценции, спектры белков нормированы на значение I_{365} для iRFP713.

Таблица 1: Характеристики триптофановой флуоресценции мутантных форм iRFP682, iRFP670 и iRFP713, имеющих различную локализацию цистеиновых остатков

	Максимум спектра триптофановой флуоресценции (нм)	A_{295}	Анизотропия (возб. 297 нм, рег. 365 нм)
iRFP713/V256C	333	1.65	0.15
iRFP713/C15S/V256C	333	1.7	0.15
iRFP713/C15S/V256C/T204A	333	1.7	0.15
iRFP713	331	1.7	0.15
iRFP713/T204A	333	1.65	0.15
iRFP713/C15S	331	1.6	0.14
iRFP670	329	2.25	0.13
iRFP670/C15S	328	2.3	0.15
iRFP670/C256S	329	2.3	0.16
iRFP670/C15A/C256S	328	2.3	0.16
iRFP682	333	1.7	0.12
iRFP682/C15S	331	1.65	0.16
iRFP682/C256S	331	1.7	0.15
iRFP682/15S/C256S	332	1.6	0.15

микроокружения триптофановых остатков в iRFP670. Этот анализ показал, что iRFP670 содержит не 3 триптофана, как в iRFP713 (TRP311, TRP281 и TRP109), а только 2 (TRP281 и TRP95). Таким образом, у iRFP670 и его мутантных форм отсутствует TRP311 (у iRFP713 он находится в области взаимодействия мономеров, в альфа-спирали GAF домена). Микроокружение TRP281 в iRFP670 существенно отличается от микроокружения этого остатка в iRFP713. В iRFP670 в микроокружении TRP281 находится лишь один полярный остаток Arg174 (у TRP281 iRFP713 их три Arg174, Arg276 и Glu318). В iRFP670 в микроокружении TRP281 находится 4 ароматических остатка Phe175, Phe 313, Tyr173 и His317. В противоположность, микроокружение TRP281 белка iRFP713 содержит только Phe175 и Tyr173. Вероятно, что микроокружение TRP281 в iRFP670 менее полярное и более жесткое по сравнению с микроокружением TRP281 в iRFP713, что может приводить к формированию более коротковолнового положения спектров триптофановой флуоресценции у мутантов iRFP670.

Вклад в суммарную флуоресценцию белка iRFP670 и его мутантных форм остатка TRP95 и характеристики микроокружения этого остатка оценить пока невозможно. Интересно, что расстояние между W95 и хромофором в iRFP670 существенно больше расстояния между W109 и хромофором в iRFP682 (рис. 3.18). Это, безусловно, может влиять на эффективность безызлучательного переноса энергии от триптофановых остатков к хромофору в белке iRFP670 и его мутантных формах. Конформация хромофора может различается в мутантных формах белков iRFP670 и iRFP682, содержащих цистеиновые остатки в разных положениях, что также будет влиять на эффективность безызлучательного переноса энергии в этих белках. Таким образом, поскольку iRFP670 и iRFP682 имеют разное количество триптофановых остатков в различающемся положении относительно хромофора, эффективность переноса энергии в мутантных формах iRFP670 и iRFP682 может быть неодинакова, что может объяснять вид спектров триптофановой флуоресценции мутантных вариантов iRFP670

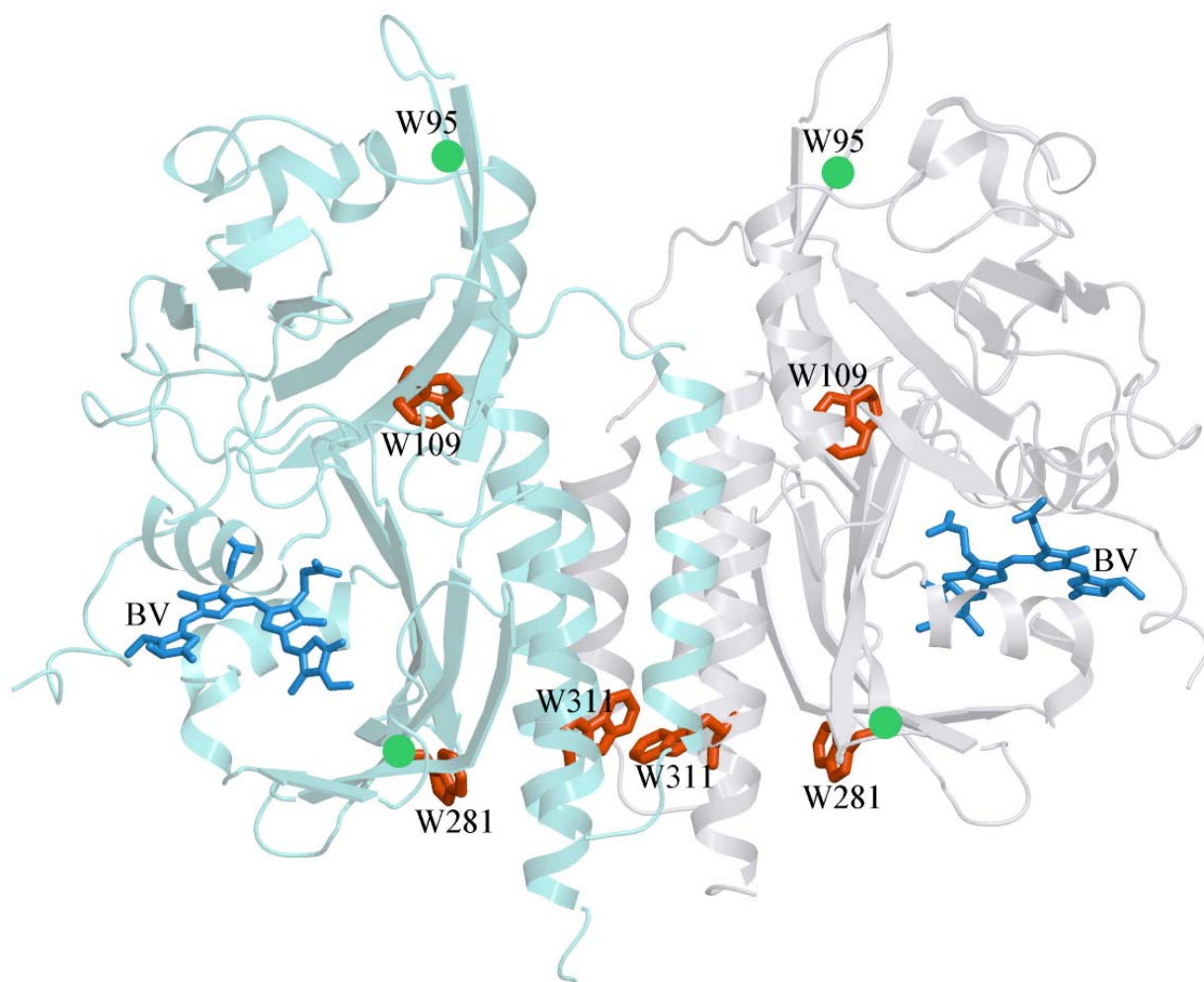


Рис. 3.18. Локализация триптофановых остатков в структуре белков iRFP682, iRFP670 и iRFP713.

RpBphP6-PAS-GAF, iRFP670 и его мутантные формы содержат два триптофановых остатка, W95 и W281 (обозначены зелеными кружками). RpBphP2-PAS-GAF, iRFP682 и его мутантные формы содержат три триптофановых остатка, W109, W281 и W311 (показаны красным). BV показан синим. Рис. сделан на основании рентгеноструктурных данных для RpBphP2-PAS-GAF (4E04 file in PDB).

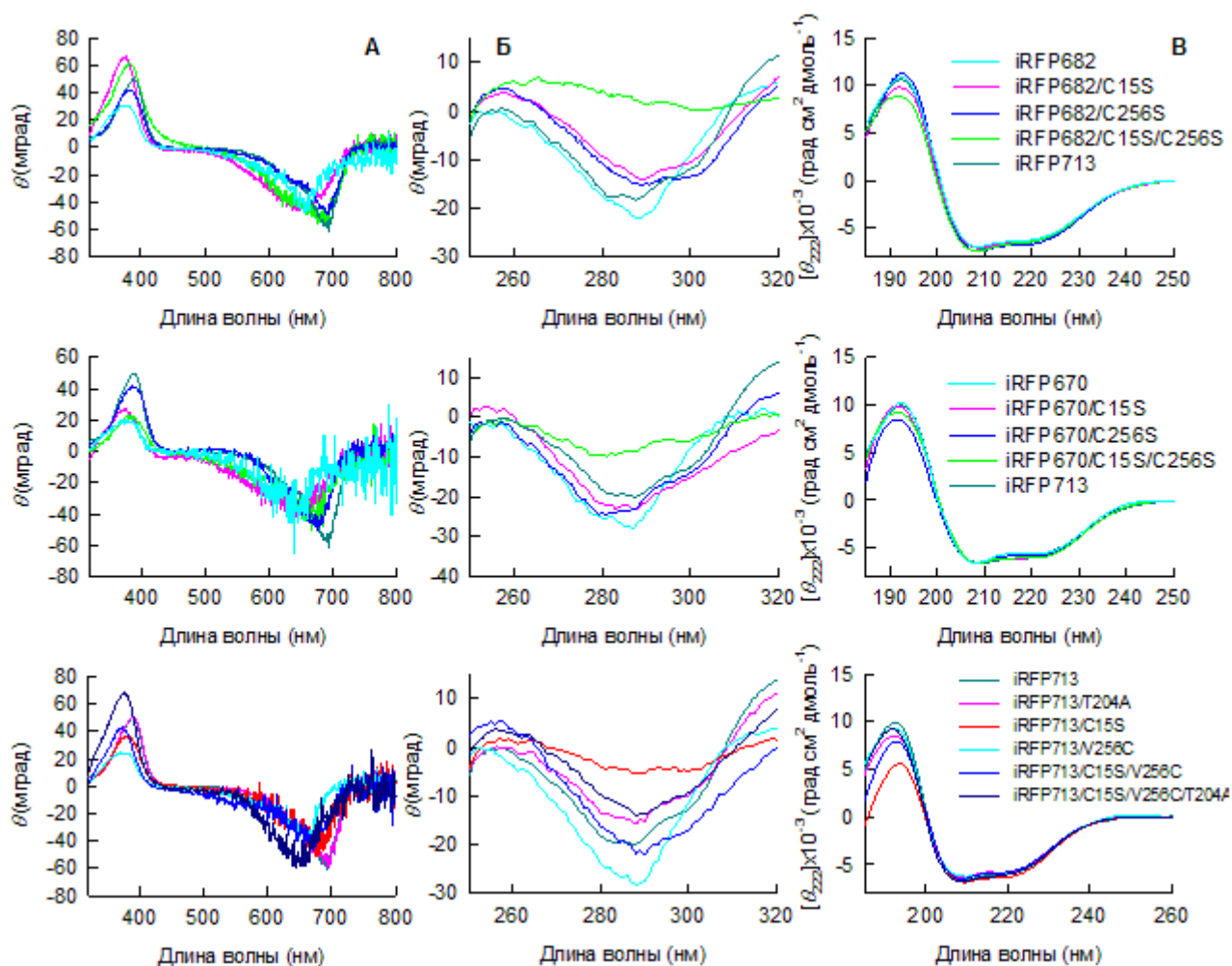


Рис. 3.19. Спектры КД в видимой (А), ближней (Б) и дальней УФ-областях (В) для мутантных форм iRFP682 (верхняя панель), iRFP670 (средняя панель) и iRFP713 (нижняя панель), имеющих различную локализацию цистеиновых остатков.

и iRFP682, представленных таким образом, чтобы выявить разницу в интенсивности флуоресценции в мутантных белках (рис. 3.17, нижняя панель).

В целом, измерение спектров триптофановой флуоресценции (рис. 3.17) и КД (рис. 3.19) свидетельствует о том, что несмотря на существенное различие спектральных характеристик в видимой области, мутантные формы iRFP682 и iRFP670 сохраняют пространственную структуру, сходную со структурой iRFP713.

3.7. Спектральные свойства NIR FPs и их мутантных вариантов с различным содержанием и локализацией цистеиновых остатков.

Были измерены спектры поглощения и флуоресценции полученных нами мутантных форм iRFP713, iRFP682 и iRFP670 с различной локализацией цистеиновых остатков, с которыми может взаимодействовать BV (Рис. 3.20).

Было показано, что спектральные свойства и прочность связывания хромофора (ковалентное или нековалентное связывание BV с белком) определяется не столько принадлежностью к разным FPs, сколько наличием и локализацией цистеиновых остатков в их PAS и/или в GAF доменах. По спектральным свойствам и способности образовывать ковалентную связь между BV и остатками цистеина каждого из мономеров FPs или только с одним из мономеров в димере FPs мутантные варианты всех исследованных здесь FPs можно разделить на четыре класса (Табл. 2, Рис. 3.21 и Рис. 3.22): мутантные варианты флуоресцентных белков, содержащие остатки Cys только в PAS доменах (Cys15) или только в GAF доменах (Cys256), содержащие одновременно остатки Cys15 и Cys256 в PAS и GAF доменах, либо без остатков Cys, способных связывать BV.

Было показано, что мутантные формы, содержащие цистеиновые остатки (Cys15) только в PAS домене (iRFP713 и iRFP713/T204A; iRFP682/C256S; iRFP670/C256S), имеют наиболее длинноволновые спектры

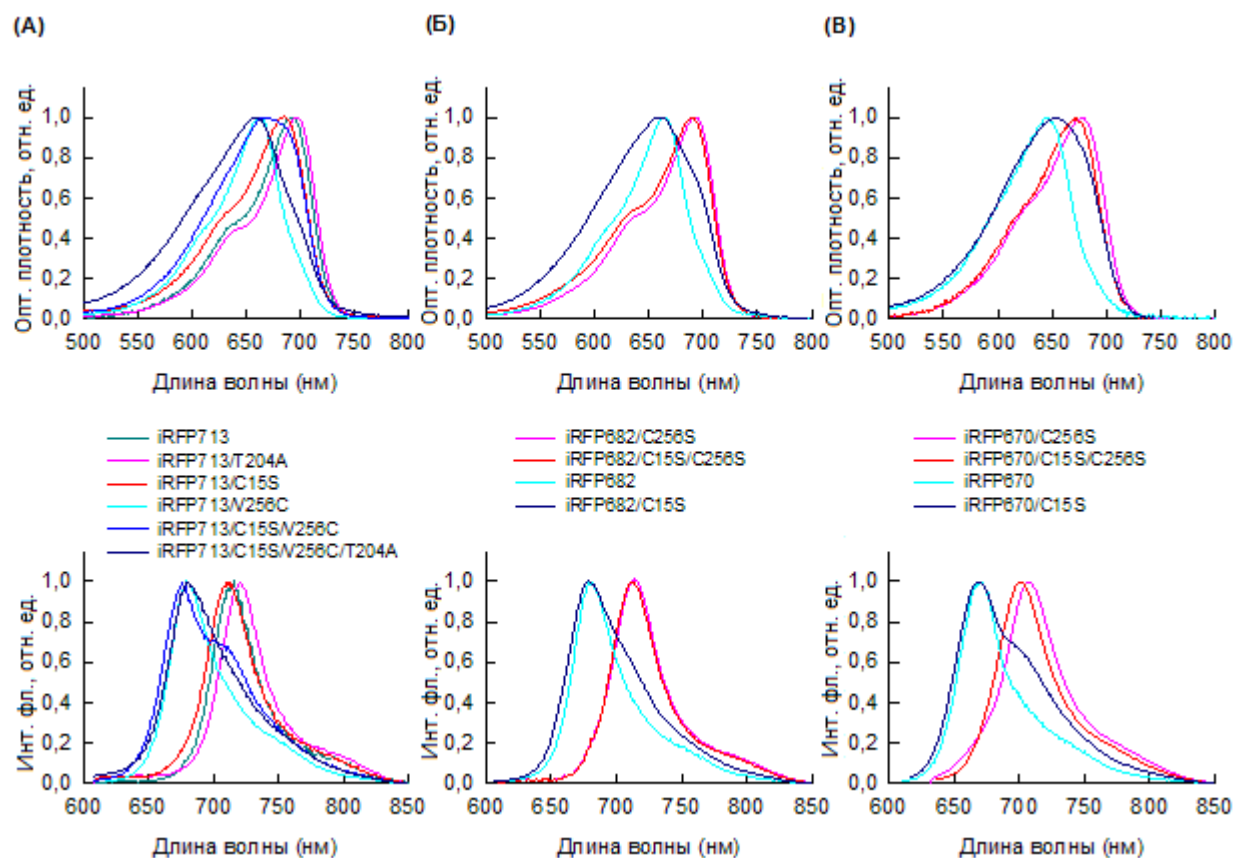
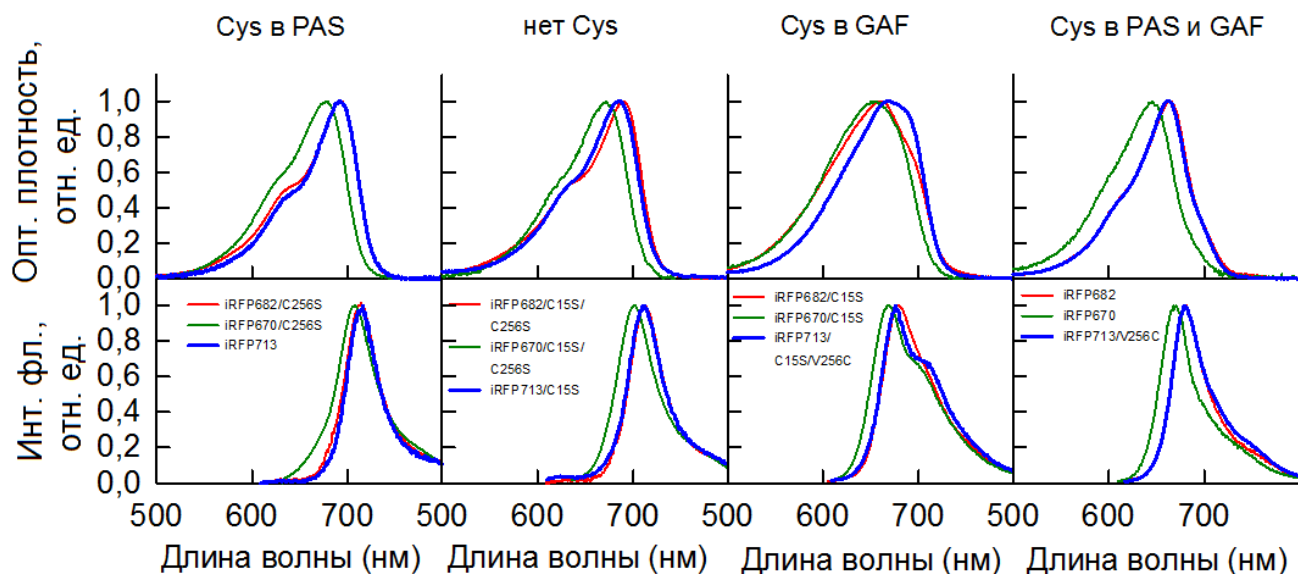


Рис.3.20. Спектральные свойства мутантных форм iRFP713, iRFP682, iRFP670 с различной локализацией остатков цистеина.

Спектры поглощения (верхняя панель) и флуоресценции (нижняя панель) мутантных форм iRFP713 (А), iRFP682 (Б) и iRFP670 (В).



17

Рис. 3.21. Спектры поглощения (верхняя панель) и флуоресценции (нижняя панель) флуоресцентных биомаркеров имеющих различную локализацию цистеиновых остатков в PAS и в GAF доменах: в PAS и в GAF доменах (Cys15 и Cys256) – iRFP670, iRFP682, iRFP713/V256C; только в PAS доменах - iRFP670/C256S, iRFP682/C256S, iRFP713; только в GAF доменах - iRFP670/C15S, iRFP682/C15S, iRFP713/C15S/V256C и не имеющие Cys15 и Cys256 вовсе - iRFP670/C15S/C256S, iRFP682/C15S/C256S, iRFP713/C15S. Спектры вариантов iRFP670 представлены красным цветом, iRFP682 – зеленым цветом и iRFP713 – синим цветом.

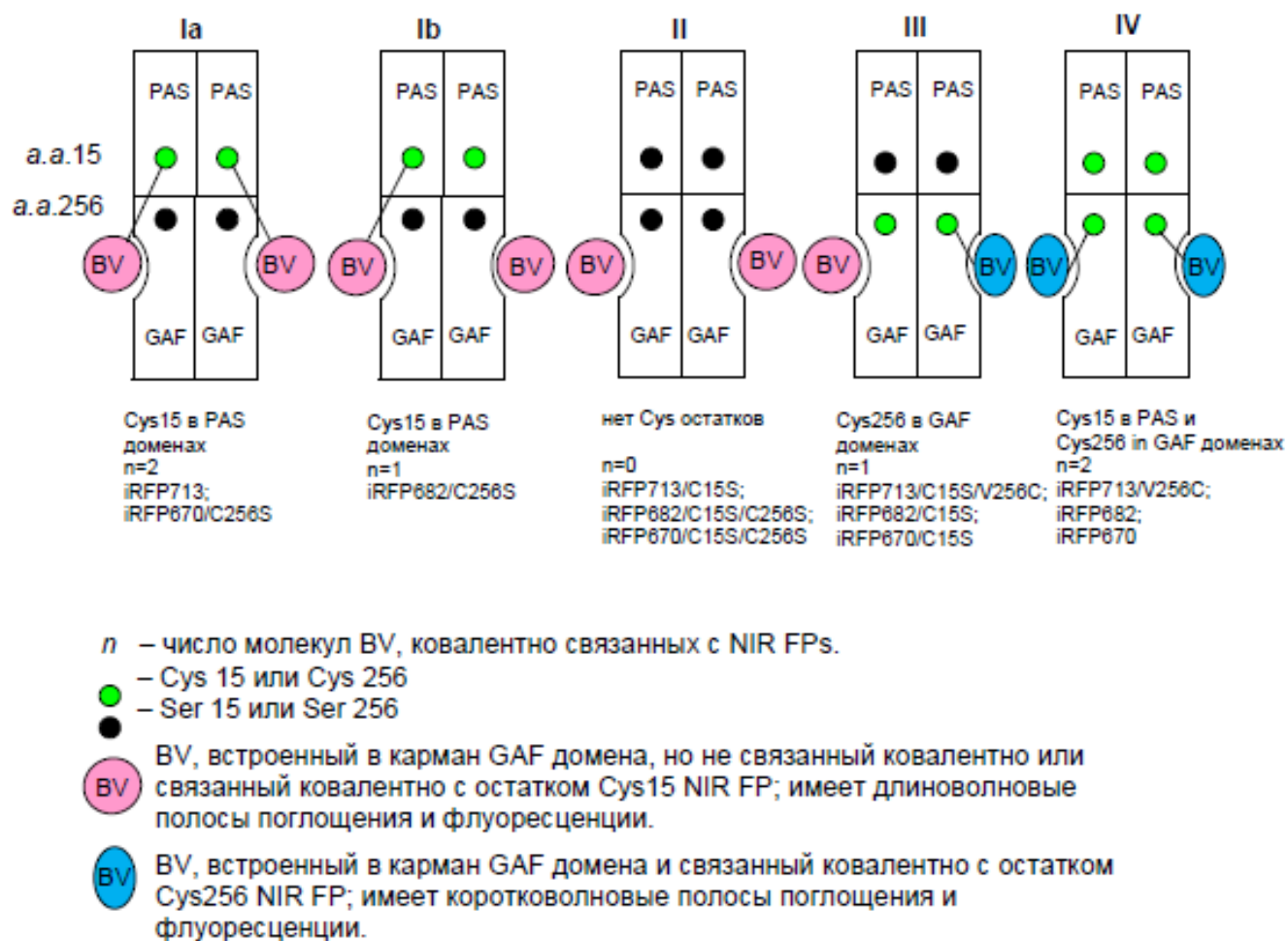


Рис. 3.22. Схема взаимодействия BV с двумя мономерами димерных NIR FPs с различной локализацией цистеиновых остатков, способных связывать BV.

Таблица 2. Фотофизические свойства NIR FPs с различной локализацией цистеиновых остатков, способных связывать BV

Локализация остатков Cys, способных связывать BV	NIR FP	Максимум поглощения (нм)	FWHM спектра поглощения (нм)	Максимум флуоресценции (нм)	FWHM спектра флуоресценции (нм)	Коэффициент экстинкции ($M^{-1}cm^{-1}$)	Квантовый выход флуоресценции (%)	Молекулярная яркость vs. iRFP713 (%)	Эффективная яркость в клетках млекопитающих vs. iRFP713 (%)
Cys15 PAS (группа I)	iRFP713	692	66	713	38	98,000	6.3	100	100
	iRFP682/C256S	694	77	713	42	89,500	3.2	46	88
	iRFP670/C256S	675	82	702	48	92,900	5.7	86	103
нет обонх Cys (группа II)	iRFP713/C15S	685	80	710	42	68,000	5.5	61	n.d.
	iRFP682/C15S/C256S	689	83	712	42	45,400	2.2	16	0.4
	iRFP670/C15S/C256S	671	81	699	48	76,300	4.6	57	0.3
Cys256 GAF (группа III)	iRFP713/C15S/V256C	665	97	676	67	66,000	7.2	77	n.d.
	iRFP682/C15S	659	111	683	60	53,800	5.0	44	27
	iRFP670/C15S	641	103	669	69	85,400	10.3	143	34
Cys15 PAS Cys256 GAF (группа IV)	iRFP713/V256C	662	66	680	46	94,000	14.5	221	150
	iRFP682	663	69	682	42	90,000	11.1	162	105
	iRFP670	644	78	670	42	110,000	12.2	217	119

Примечание: эффективная яркость iRFP713 в клетках млекопитающих принята за 100%.

поглощения и флуоресценции (Рис. 3.21, Табл.2). Спектры поглощения и флуоресценции белков, не содержащих цистеиновых остатков, способных связывать BV (iRFP713/C15S; iRFP682/C15S/C256S; iRFP670/C15S/C256S), сходны по форме со спектрами белков, содержащих цистеиновые остатки только в PAS домене, хотя и сдвинуты в коротковолновую область на 4-7 и 1-3 нм, соответственно (Рис. 3.21, Табл.2). Эти данные свидетельствуют о том, что в формировании спектральных свойств различных мутантных форм NIR FPs могут участвовать молекулы BV, инкорпорированные в карман GAF домена, как ковалентно связанные, так и не связанные химически с цистеиновыми остатками (Рис. 3.21). При этом, система сопряженных связей хромофора, встроенного в GAF домен NIR FPs, но химически не связанного ни с каким цистеиновым остатком, сходна с системой π -связей хромофора, ковалентно присоединенного к остаткам Cys15 в PAS доменах, о чем свидетельствует практически одинаковое положение спектров поглощения и флуоресценции мутантных вариантов, не содержащих остатков Cys15 и Cys256, и содержащие Cys только в PAS доменах.

Все мутантные формы, содержащие Cys256 вне зависимости от того, имеется ли в PAS домене Cys15 (iRFP713/V256C; iRFP682; iRFP670) или белки содержат цистеиновые остатки только в GAF доменах (iRFP713/C15S/V256C и iRFP713/C15S/V256C/T204A; iRFP682/C15S; iRFP670/C15S), имеют существенно более коротковолновые спектры поглощения и флуоресценции (Рис. 3.20, 3.21, Табл.2). Таким образом, спектральные характеристики этих вариантов NIR FPs определяются главным образом BV ковалентно связанным с остатками Cys256 в GAF доменах белков. Коротковолновый сдвиг спектров поглощения и флуоресценции хромофора, ковалентно связанного с Cys256 вероятно вызван изменением системы сопряженных π -связей хромофора после его встраивания в карман GAF домена и ковалентного присоединения.

Естественно было бы предположить, что мутантные формы флуоресцентных белков, имеющие только Cys256 в GAF доменах, будут иметь более узкий спектр поглощения и флуоресценции по сравнению со спектрами белков, имеющих в своем составе два цистеиновых остатка Cys256 и Cys15. В последнем случае, при

наличии двух потенциальных мест связывания BV, можно было бы ожидать реализации обеих форм хромофора, характеризующихся длиноволновыми и коротковолновыми спектрами поглощения и флуоресценции, что привело бы к уширению спектров мутантных форм, имеющих в своем составе два цистеиновых остатка Cys256 и Cys15. Однако, экспериментальные данные свидетельствуют об обратном. Наиболее узкие спектры поглощения и флуоресценции имеют белки, содержащие цистеиновые остатки Cys15 и Cys256, в том же случае, когда белок, содержит только остатки Cys256 в GAF доменах, в спектрах поглощения и флуоресценции присутствует явно выраженное длинноволновое плечо (Рис. 3.20, Рис. 3.21, Табл. 2). Таким образом, при наличии в белке остатков Cys15 и Cys256 в GAF в PAS доменах, т.е. при потенциальной возможности образования химической связи между BV и разными остатками цистеина, BV преимущественно связывается с Cys256. Поскольку ковалентное присоединение BV к остатку Cys является необратимым процессом, вероятно, что преимущественное связывание хромофора с Cys256 в NIR FPs, содержащих оба остатка Cys, как в GAF, так и в PAS доменах, определяется кинетикой взаимодействия: скорость связывания BV с Cys256 существенно превышает скорость связывания BV с Cys15.

Наши данные показывают, что в белках, содержащих только остатки Cys256 в GAF доменах, присутствует наряду с формой хромофора, присоединенного ковалентно к остатку Cys256 в GAF домене, характеризующейся коротковолновыми спектрами поглощения и флуоресценции, еще некоторая форма хромофора, имеющая длинноволновые спектры поглощения и флуоресценции.

Полученные спектральные данные мы объяснили следующим образом: связывание BV с одним из мономеров в димере флуоресцентного белка, имеющего только Cys256, аллостерически препятствует связыванию BV с Cys256 второго мономера, поэтому в кармане второго мономера оказывается BV, не связанный химически с цистеиновыми остатками белка, который, как было показано ранее, имеет длинноволновые спектры поглощения и флуоресценции.

Схема взаимодействия бактериальных фитохромов с BV представлена на рис. 3.22.

3.8. Структура хромофора, ковалентно связанного с остатком Cys256 в GAF домене BphPs

Спектральные данные и окрашивание цинком свидетельствуют о том, что в NIR FPs на основе BphPs хромофор BV может ковалентно связываться не только с каноническим Cys15, но и с Cys256 в GAF доменах белков. Мы провели анализ расстояния между Cys256 и хромофором, встроенным в GAF домен. Анализ был выполнен с использованием рентгеноструктурных данных CBD домена фитохрома *RpBphP2*, на основании которого были сконструированы iRFP682 и iRFP713, в предположении, что при введении в положение 256 остатка Cys SG атом этого остатка будет расположен таким же образом, как атом CG1 остатка Val256 (Рис. 3.23). Этот анализ показал, что расстояние между SG атом Cys256 и атомами C3¹ и C3² боковой цепи кольца А хромофора, через которые может потенциально образовываться ковалентная связь, составляет 3.4 и 4.6 Å, соответственно. Это подтверждает возможность образования ковалентной связи между Cys256 и BV.

Было показано, что в фитохроме цианобактерий Cph1 образованию ковалентной связи между его хромофором и остатком Cys259 предшествует связывание хромофора в кармене GAF домена (Borucki et al., 2003). Мы предполагаем, что аналогичный механизм действует и в случае NIR FPs, изучаемых в настоящей работе. Действительно, наши экспериментальные данные свидетельствуют о том, что мутантные формы NIR FPs, не содержащих остатков Cys15 и Cys256, способны образовывать с BV флуоресцирующие комплексы. Система сопряженных π -связей свободного

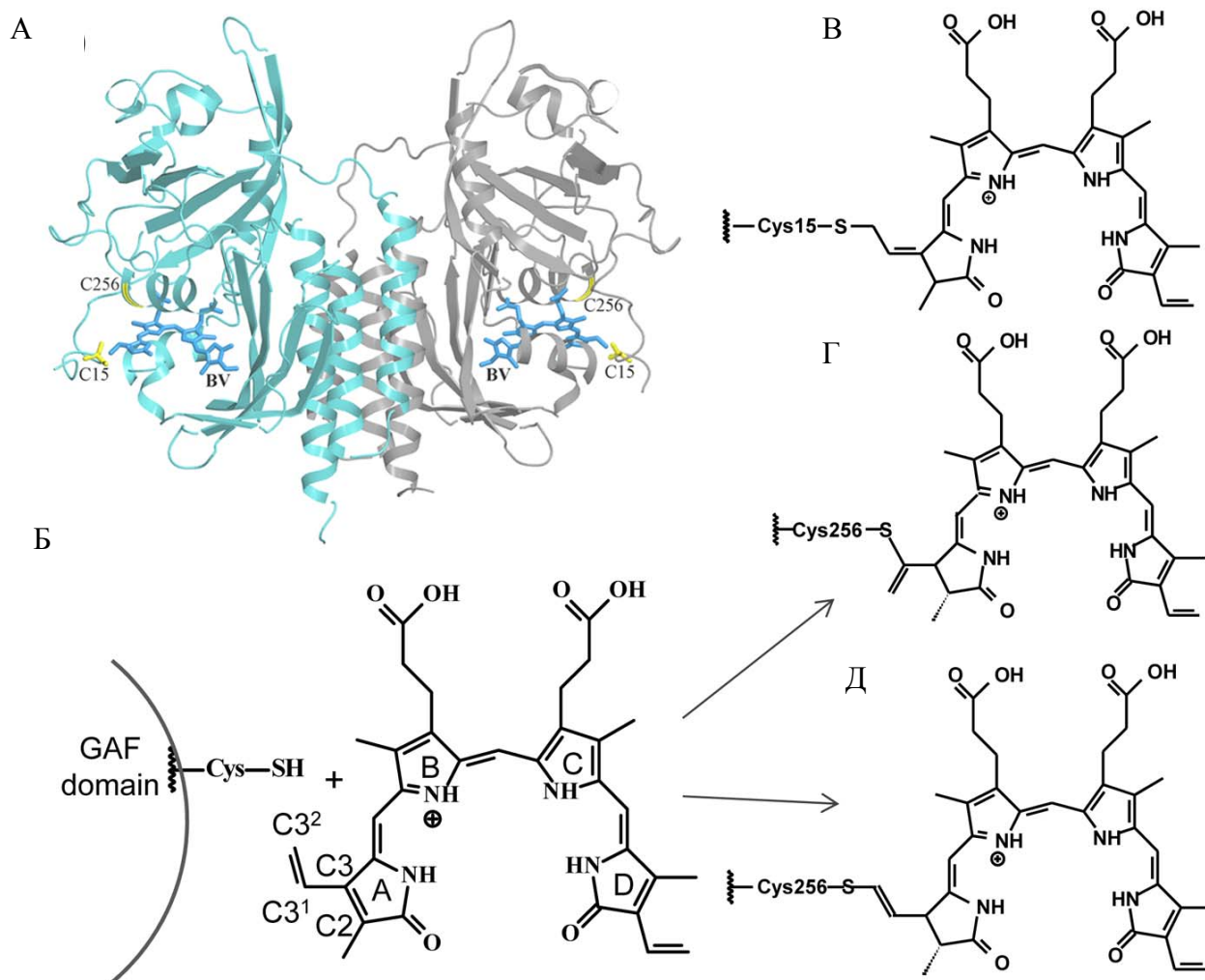


Рис. 3.23. Структура BV в NIR FPs, имеющих различную локализацию цистеиновых остатков.

(А) Локализация остатков Cys15 и Cys256 (показаны желтым цветом) в структуре белка RpVphP2-PAS-GAF (4E04 файл PDB). Структура свободного BV (Б), BV, ковалентно связанного с Cys15 (В), и две формы хромофора, ковалентно связанного с Cys256 (Г и Д).

BV не идентична системе сопряженных π -связей хромофора, ковалентно связанного с остатком Cys15 (рис. 3.23), хотя степень сопряженности π -электронов в обоих случаях близка. Поэтому, варианты, не содержащие остатков Cys, способных ковалентно связывать BV, и NIR FPs, содержащие остатки Cys только в PAS доменах, имеют сходные спектральные свойства.

Мы предполагаем, что BV, связанный в кармане GAF домена, обладает некоторой конформационной подвижностью. В результате флуктуаций боковой цепи кольца A BV, атомы этой боковой цепи могут оказаться вблизи атомов остатков в положении 15 и 256. В NIR FPs, содержащих оба остатка Cys15 и Cys256, формируется главным образом ковалентная связь между BV и Cys256, потому что образование этого продукта кинетически более выгодно, по сравнению с образованием BV, ковалентно связанного с Cys15. Существенный коротковолновый сдвиг спектров поглощения и флуоресценции, наблюдаемый для BV, ковалентно связанного с Cys256, показывает, что химическая структура этого продукта отличается от структуры BV, ковалентно связанного с Cys15. Очевидно, что степень сопряжения π -электронов существенно меньше в BV, ковалентно связанном с Cys256. Мы предполагаем, что это может быть достигнуто с помощью изменения положения двойной связи кольца A хромофора таким образом, чтобы вывести ее из сопряжения с остальным хромофором (рис. 3.23), при этом общее число двойных связей в хромофоре не изменяется. Сходный механизм изомеризации тетропиррольных хромофоров был предложен для ряда фитохромов цианобактерий (Narikawa et al., 2013, Hauck et al., 2014). Предложенная структура BV, ковалентно связанного с Cys256, была недавно подтверждена с помощью рентгеноструктурного анализа мономерного белка BphP1-FP/C20S, сконструированного на основе RpBphP1 из *Rhodospseudomonas palustris*, который имеет остаток Cys только в GAF домене (Shcherbakova et al., 2015). Было показано, что ковалентное связывание BV с остатком Cys256 в BphP1-FP/C20S может осуществляться через атом C3² или атом C3¹ боковой цепи кольца A хромофора, тем самым проводя к образованию двух форм хромофора.

3.9. Стабильность NIR FPs и их мутантных форм

Представленная на рисунке 3.22 модель связывания BV с мономерами димерных NIR FPs была подтверждена при помощи изучения спектральных свойств iRFP713, iRFP682 и iRFP670 в присутствии GdnHCl. Наименее прочно BV связан с мутантными формами, не содержащими цистеиновых остатков, способных связывать BV ковалентно (iRFP713/C15S; iRFP682/C15S/C256S; iRFP670/C15S/C256S) (рис. 3.24, 3.25, 3.26). Диссоциация хромофора в этих белках происходит уже при малых концентрациях денатуранта, когда структура белка еще сохраняется. Эти же белки имеют наименьший квантовый выход флуоресценции (Таблица 2). Интересно, что и структура белков, не имеющих цистеиновых остатков, способных связывать BV ковалентно (рис. 3.22), отличается наименьшей стабильностью (рис. 3.24, 3.25, 3.26).

Гораздо большей стабильностью структуры обладают формы iRFP713, содержащие остатки Cys15 только в PAS домене (iRFP713, iRFP713/T204A), оба мономера которых связывают хромофор ковалентно (рис. 3.22), диссоциация хромофора в этих белках происходит при значительно больших концентрациях GdnHCl и осуществляется синхронно с разрушением структуры белка (рис. 3.24, 3.27). В мутантной форме iRFP670, содержащей остатки Cys15 только в PAS домене (iRFP670/C256S), ковалентное связывание хромофора также приводит к увеличению прочности взаимодействия между белком и хромофором, однако диссоциация хромофора происходит при меньших концентрациях GdnHCl, чем денатурация белка (рис. 3.26). При этом, стабильность структуры всех вариантов iRFP670 практически одинакова и сравнима со стабильностью апоформы белка (рис. 3.26, 3.28), т.е. введение ковалентной связи между остатками цистеина и BV практически не стабилизирует сам белок. Это, вероятно, свидетельствует о более слабом взаимодействии между

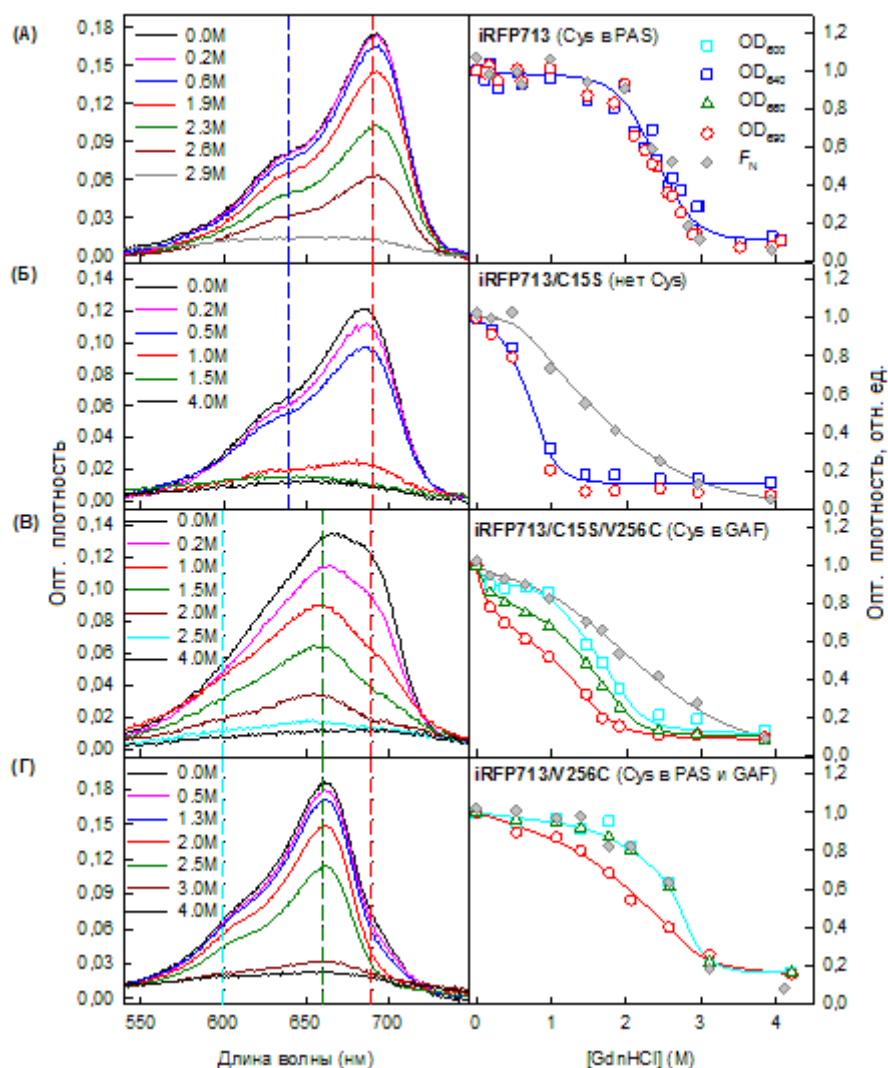


Рис. 3.24. Изменение спектров поглощения в видимой области мутантных форм iRFP713 в присутствии GdnHCl.

Спектры поглощения белков при разных концентрациях GdnHCl показаны на левых панелях. Числа на кривых – концентрации GdnHCl. Цветные вертикальные линии обозначают длины волн, выбранные для анализа. На правых панелях показаны зависимости оптической плотности при 640 и 690 нм, или при 600, 660 и 690 нм от концентрации GdnHCl. Данные нормированы на значение оптической плотности при соответствующей длине волны для белка в буферном растворе. Стабильность структуры белка против денатурации под действием GdnHCl определена как изменение доли белка в нативном состоянии F_N (серые символы). Значение F_N было определено на основании эллиптичности при 222 нм.

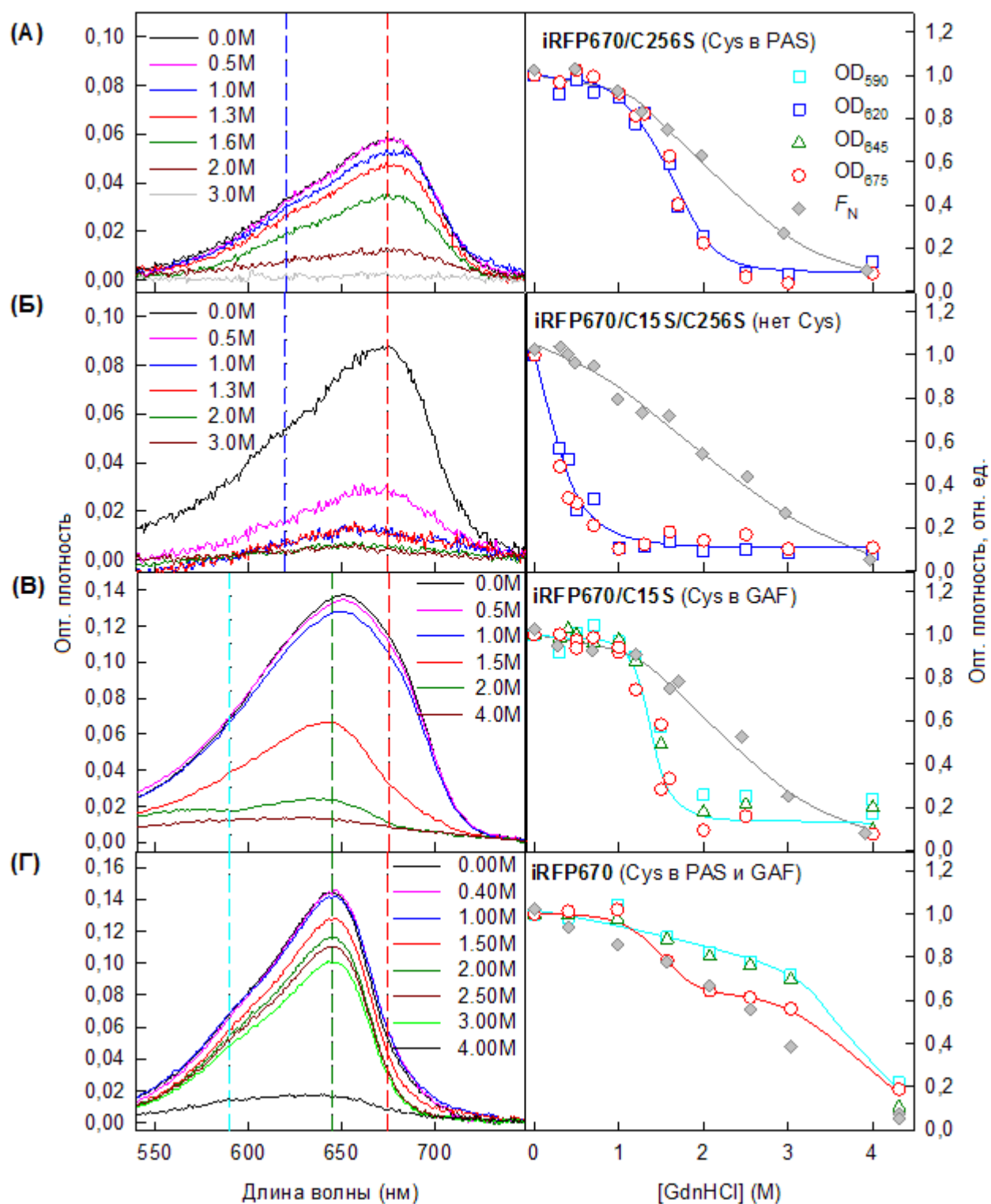


Рис. 3.25. Изменение спектров поглощения в видимой области мутантных форм iRFP682 в присутствии GdnHCl.

Обозначения как на Рис. 3.24.

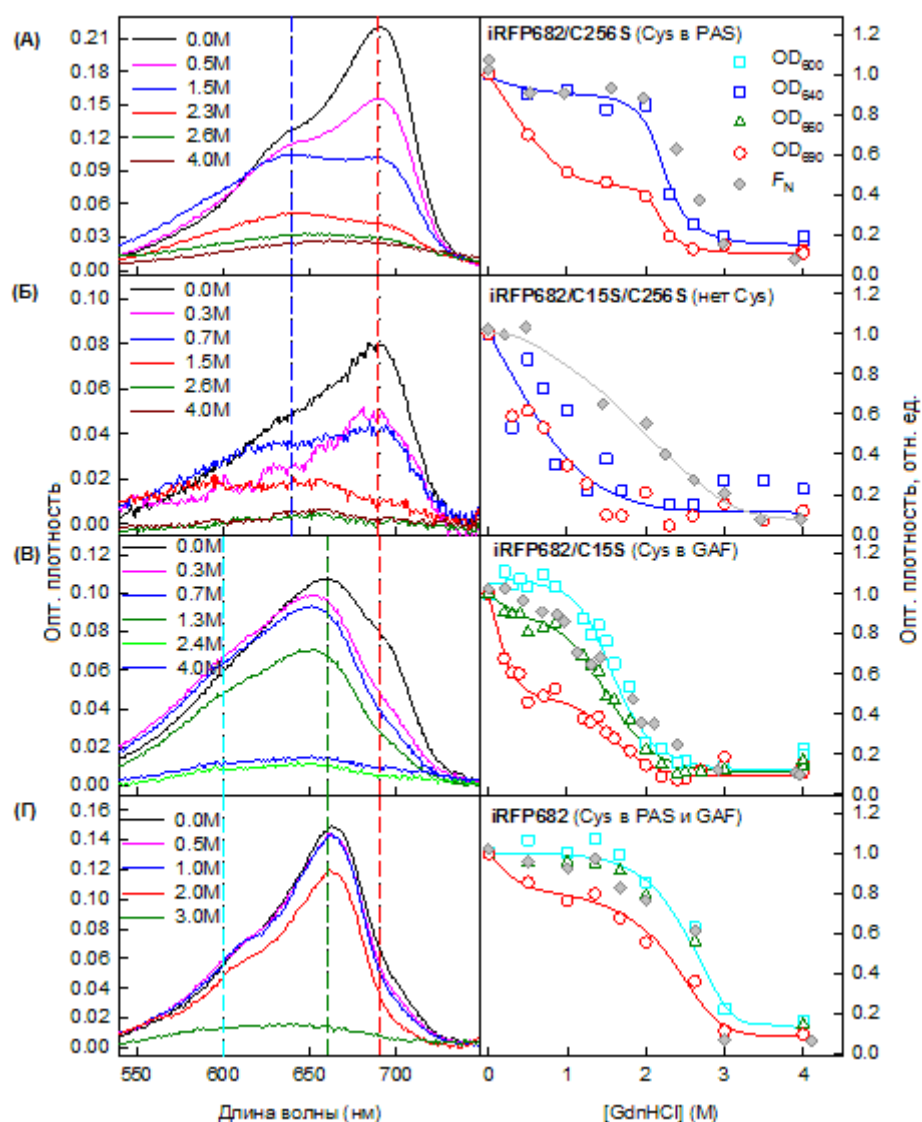


Рис. 3.26. Изменение спектров поглощения в видимой области мутантных форм iRFP670 в присутствии GdnHCl.

Спектры поглощения белков при разных концентрациях GdnHCl показаны на левых панелях. Числа на кривых – концентрации GdnHCl. Цветные вертикальные линии обозначают длины волн, выбранные для анализа. На правых панелях показаны зависимости оптической плотности при 620 и 675, или при 590, 645 и 675 от концентрации GdnHCl. Данные нормированы на значение оптической плотности при соответствующей длине волн для белка в буферном растворе. Стабильность структуры белка против денатурации под действием GdnHCl определена как изменение доли белка в нативном состоянии F_N (серые символы). Значение F_N было определено на основании эллиптичности при 222 нм.

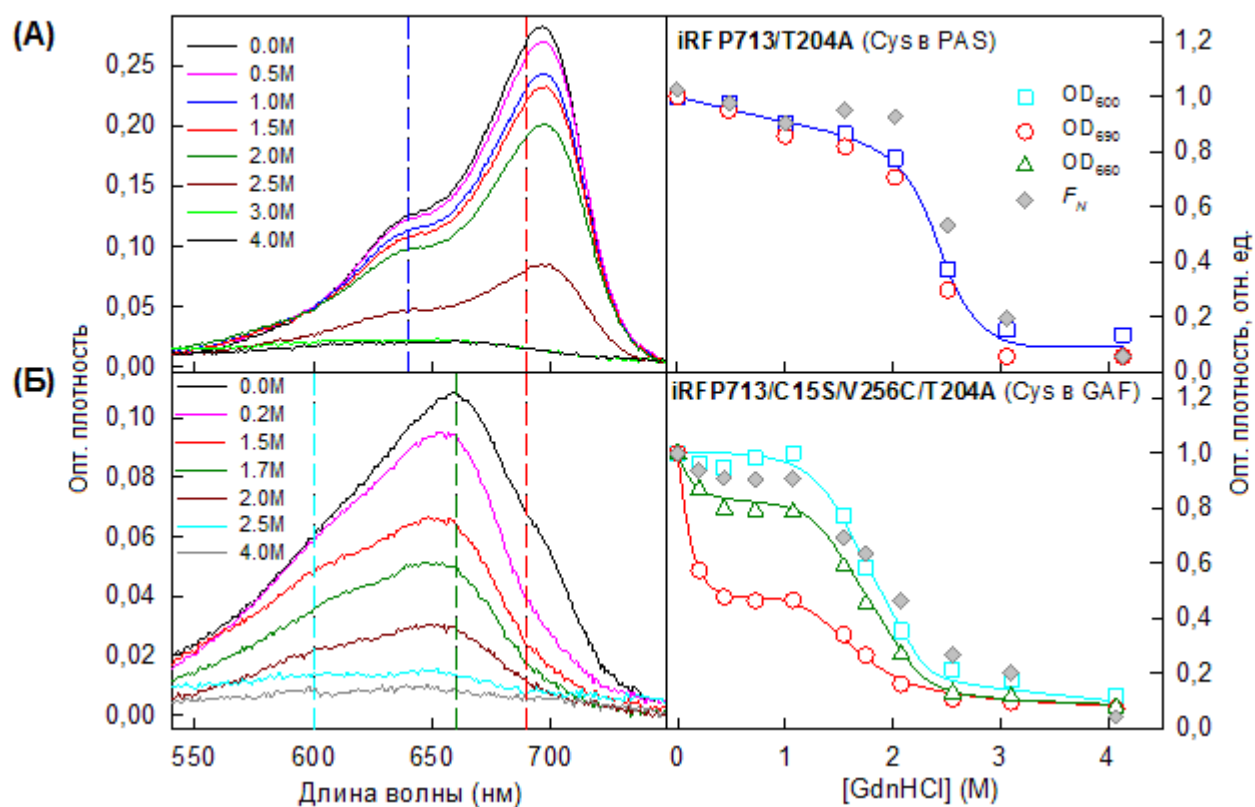


Рис. 3.27. Изменение спектров поглощения в видимой области мутантных форм iRFP713 в присутствии GdnHCl.

Обозначения как на Рис. 3.24.

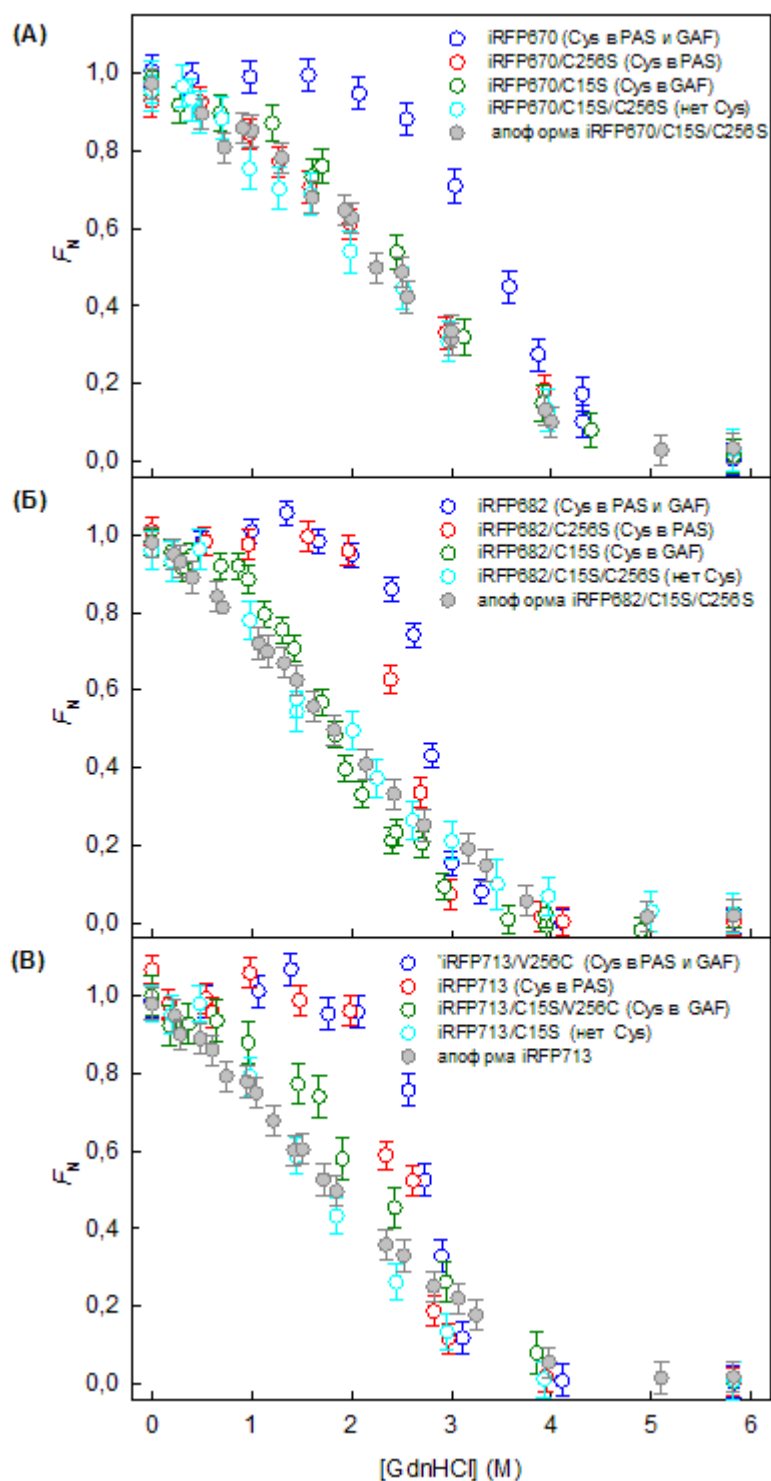


Рис. 3.28. Стабильность мутантных форм iRFP670 (А), iRFP682 (Б) and iRFP713 (В).

Стабильность структуры белка против денатурации под действием GdnHCl определена как изменение доли белка в нативном состоянии F_N . Значение F_N было определено на основании эллиптичности при 222 нм. Для сравнения приведены данные для апоформы белков (серые символы).

белком и лигандом в вариантах iRFP670, по сравнению с вариантами iRFP713 и iRFP682.

Стоит отметить особенность мутантной формы iRFP682/C256S, которая, также как мутантные формы iRFP713 и iRFP670/C256S, имеет цистеиновый остаток только в PAS доменах. Зависимости оптической плотности, измеренные в максимуме флуоресценции и на длинноволновом краю спектра поглощения при денатурации этой формы, существенно различаются и свидетельствуют о том, что iRFP682/C256S содержит хромофор, который диссоциирует в присутствии менее 1 М GdnHCl, когда структура белка еще сохраняется, как и в случае мутантных форм, не содержащих цистеиновые остатки способные связывать BV; отщепление второго вида хромофора происходит синхронно с разрушением структуры белка (рис. 3.25). На основании этого можно предположить, что часть молекул BV в iRFP682/C256S не связана ковалентно (Рис. 3.22). Присутствие в белке iRFP682/C256S нековалентно связанного хромофора также объясняет заметно меньший квантовый выход этого белка по сравнению с квантовым выходом вариантов iRFP713 и iRFP670 с остатками Cys в PAS доменах (Таблица 2).

В мутантных формах iRFP713 и iRFP682, содержащих остатки Cys только в GAF доменах, в которых одна молекула BV ковалентно связана с Cys256, а вторая встроена в карман, но не образует ковалентной связи с Cys256 (рис. 3.22), уменьшение интенсивности поглощения в длинноволновой области, происходит, при столь же низких значениях концентрации GdnHCl (меньше 1 М), как и в случае мутантных форм, не содержащих цистеиновые остатки способные связывать BV (рис. 3.24, 3.25, 3.27). Для мутантной формы iRFP670/C15S зависимости оптической плотности, зарегистрированные в максимуме и на длинноволновом краю спектра поглощения, от концентрации GdnHCl практически совпадают. Возможно, это говорит о том, что взаимодействие между BV и белком в вариантах iRFP670 и вариантах iRFP682/iRFP713 отличается.

Димерные молекулы белков, содержащие остатки Cys15 и Cys256 в PAS и GAF доменах, в которых хромофор связан ковалентно с остатком Cys256 в обоих мономерах (рис. 3.22), имеют даже несколько большую стабильность, по

сравнению с белками, в которых хромофор связан ковалентно с остатком Cys15 в обоих мономерах (рис. 3.24, 3.25, 3.26). Эти белки имеют также наибольшую прочность связывания хромофора, самый высокий квантовый выход флуоресценции и молекулярную яркость (Таблица 2). Среди этих белков наибольший квантовый выход имеет iRFP713/V256C.

Нами было проанализировано влияние замены в положении 204 на спектральные свойства мутантов iRFP713, содержащих остатки Cys только в PAS или только в GAF домене. В белке iRFP713 замена остатка Thr204, находящегося в непосредственной близости от хромофора, на Ala приводит лишь к незначительному длинноволновому сдвигу спектров поглощения и флуоресценции (Рис. 3.20, Табл. 2), в отличие от введения остатка Cys в положении 256, значительно удаленном от хромофора, которое приводит к 30 нм сдвигу спектров. В мутантных формах iRFP713, содержащих остатки Cys только в GAF доменах, остаток в положении 204 влияет на соотношение «коротковолновой» ковалентно связанной с остатком Cys256 и «длинноволновой» нековалентно связанной формы хромофора (Рис. 3.20). В белках, содержащих Thr204 «длинноволновая» нековалентно связанная форма хромофора более выражена, по сравнению с белками, содержащими в положении 204 остаток Ala.

3.10. Процессы денатурации–ренатурации NIR FPs и их мутантных форм

На предыдущем этапе нами было показано, что необратимость денатурации iRFP713 и агрегация молекул белка связана с наличием хромофора и необходимостью его упаковки в белковую глобулу. Мы предположили, что образование ковалентной связи между BV и каноническим остатком Cys15 в iRFP713 может приводить к необходимости протягивать хромофор в узел типа «восьмерка» при сворачивании белка, поскольку остаток Cys15 расположен в N-концевом участке, который вдет в одну из петель узла, что может существенно осложнять процессы сворачивания бактериальных фитохромов. Чтобы выяснить, является ли это причиной необратимости процессов денатурации iRFP713, мы исследовали процессы разворачивания-сворачивания димерных флуоресцентных

белков NIR FPs, с различной локализацией цистеиновых остатков, с которыми может ковалентно связываться хромофор.

Квазиравновесные зависимости параметра A , анизотропии триптофановой флуоресценции, флуоресценции хромофора, измеренной в максимуме спектра флуоресценции и эллиптичности при длине волны 222 нм от концентрации GdnHCl представлены на рис. 3.29 - 3.30 и рис. 3.32 - 3.33 для холоформ мутантных форм iRFP682/C15S и iRFP682/C256S и для мутантных форм iRFP670/C15S и iRFP670/C256S, имеющих различную локализацию остатков цистеина. Квазиравновесные характеристики для мутантных вариантов iRFP682/C15S/C256S и iRFP670/C15S/C256S, не содержащих остатков цистеина, способных связывать BV ковалентно, представлены на рис. 3.31 и рис. 3.33, соответственно.

Результаты этих экспериментов свидетельствуют о том, что денатурация мутантных форм NIR FPs с ковалентно связанным хромофором необратима, вне зависимости от локализации остатка цистеина к которому пришит хромофор. Денатурация NIR FPs, не содержащих остатков Cys15 и Cys256, т.е. не способных ковалентно связывать хромофор, полностью обратима. Было сделано предположение, что ковалентно связанный хромофор образует при сворачивании ненативные контакты с белком, что препятствует его правильному фолдингу.

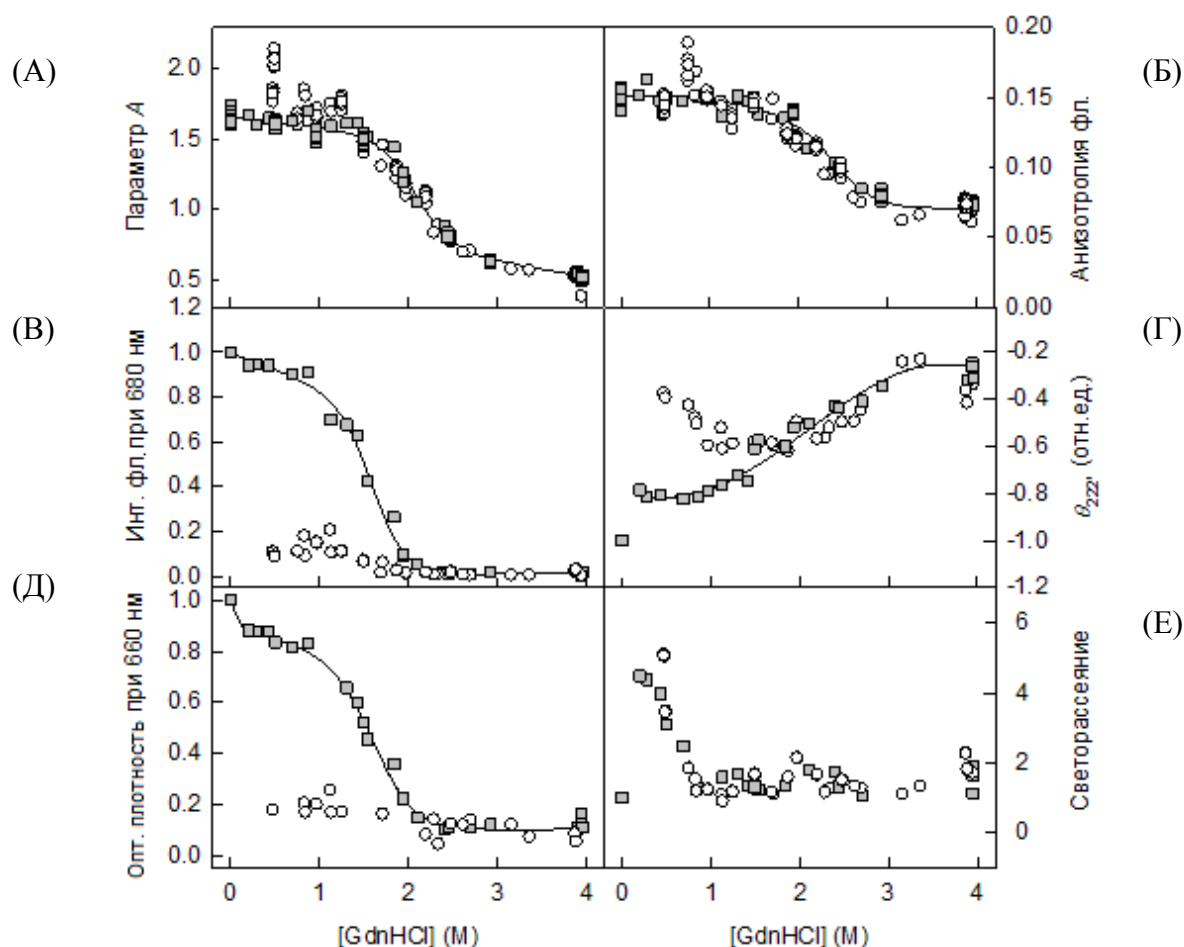


Рис. 3.29. Денатурационные кривые разворачивания и сворачивания iRFP682/C15S под действием GdnHCl.

(А) Изменение параметра $A = I_{320}/I_{365}$ при $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм. (Б) Изменение анизотропии флуоресценции при $\lambda_{\text{рег}} = 365$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм. (В) Изменение интенсивности флуоресценции хромофора. Поскольку спектр поглощения флуоресцентных белков существенно изменяется при изменении концентрации GdnHCl, флуоресценция хромофора была исправлена на оптическую плотность раствора при длине волны возбуждения (Д). (Е) Изменение эллиптичности при 222 нм. (Е) Изменение и рассеяния света, соответственно. Измерения проводились после 24 ч инкубации нативного или денатурированного белка в присутствии GdnHCl. Квадраты серого цвета соответствуют процессу разворачивается, незакрашенные кружки – сворачиванию белка.

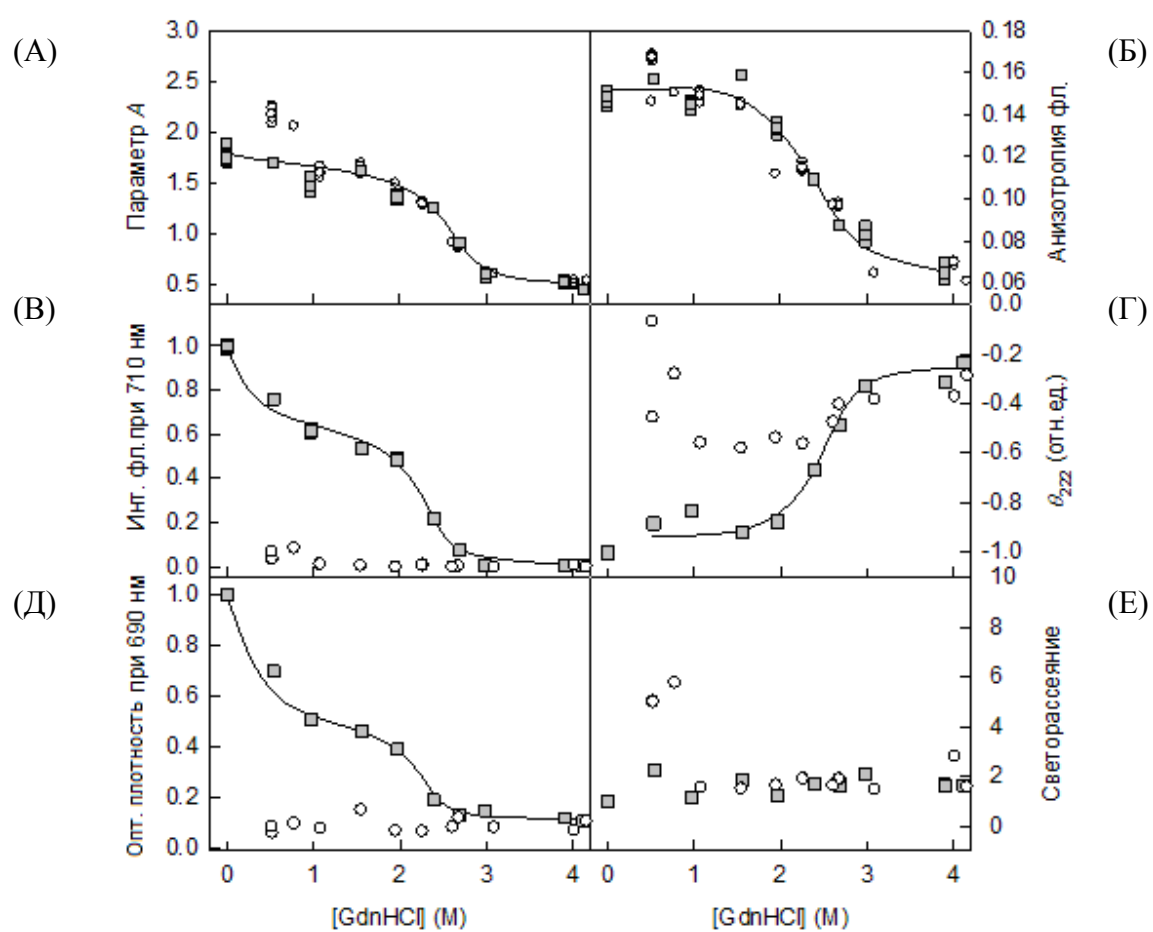


Рис. 3.30. Денатурационные кривые разворачивания и сворачивания iRFP682/C256S под действием GdnHCl.

Подписи данных – см. рис. 3.29.

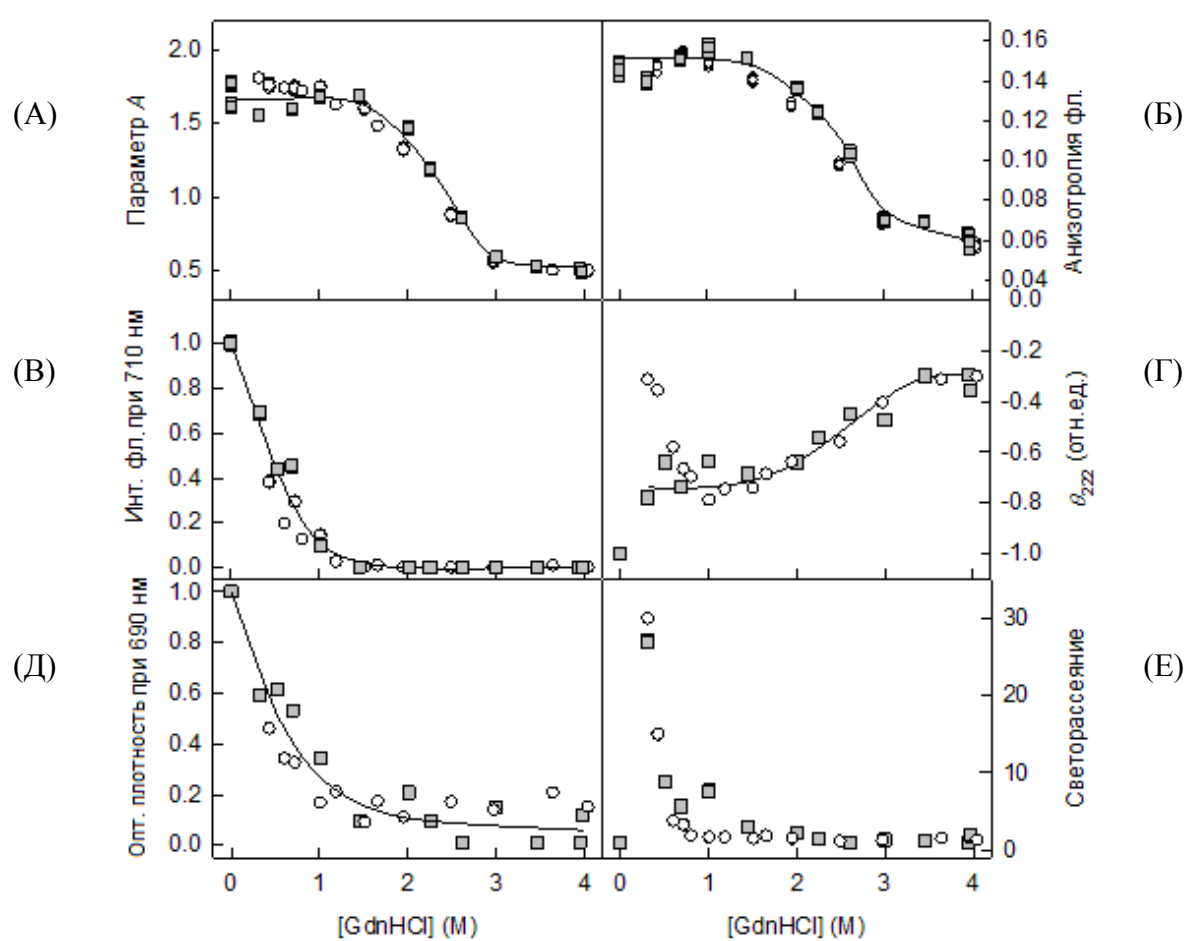


Рис. 3.31. Денатурационные кривые разворачивания и сворачивания iRFP682/C15S/C256S под действием GdnHCl.

Подписи данных – см. рис. 3.29.

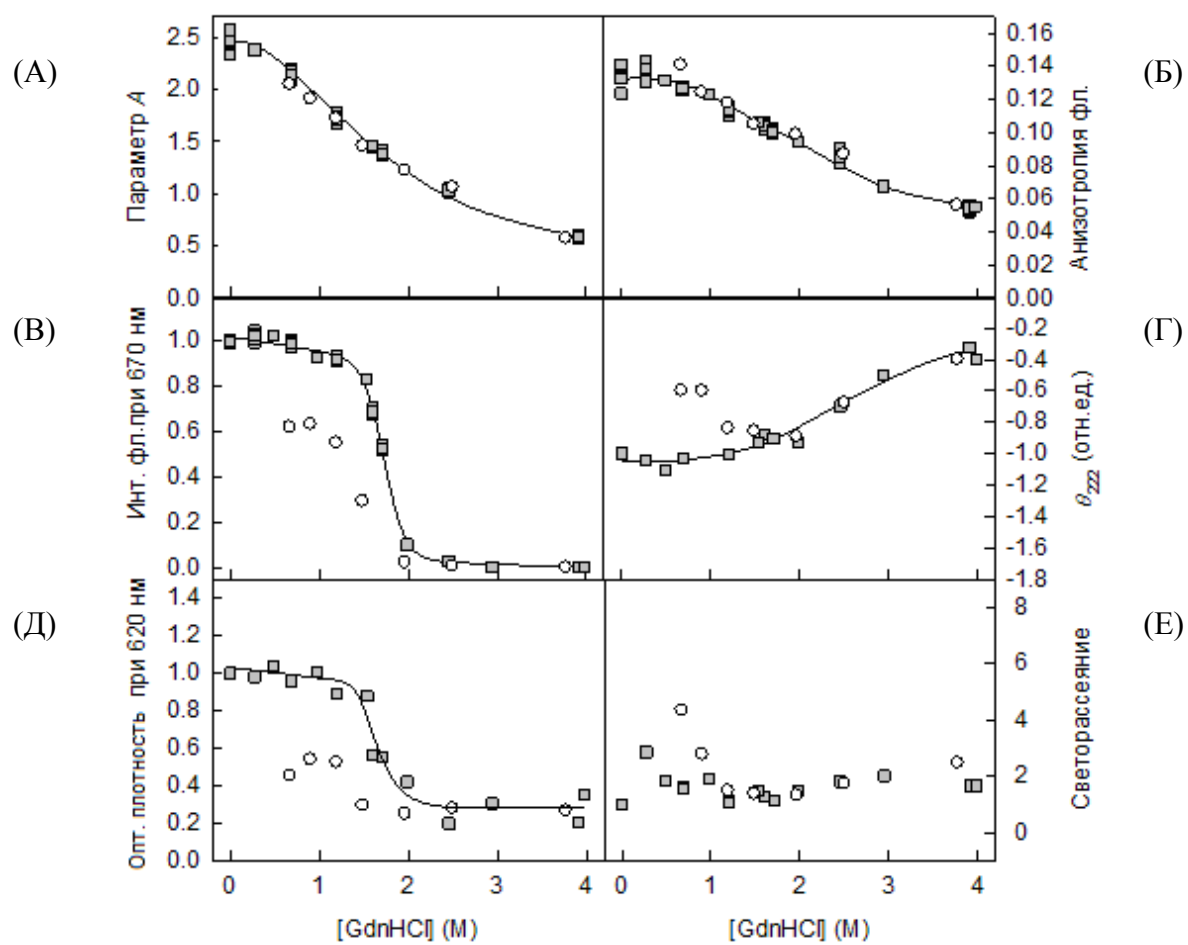


Рис. 3.32. Денатурационные кривые разворачивания и сворачивания iRFP670/C15S под действием GdnHCl.

Подписи данных – см. рис. 3.29

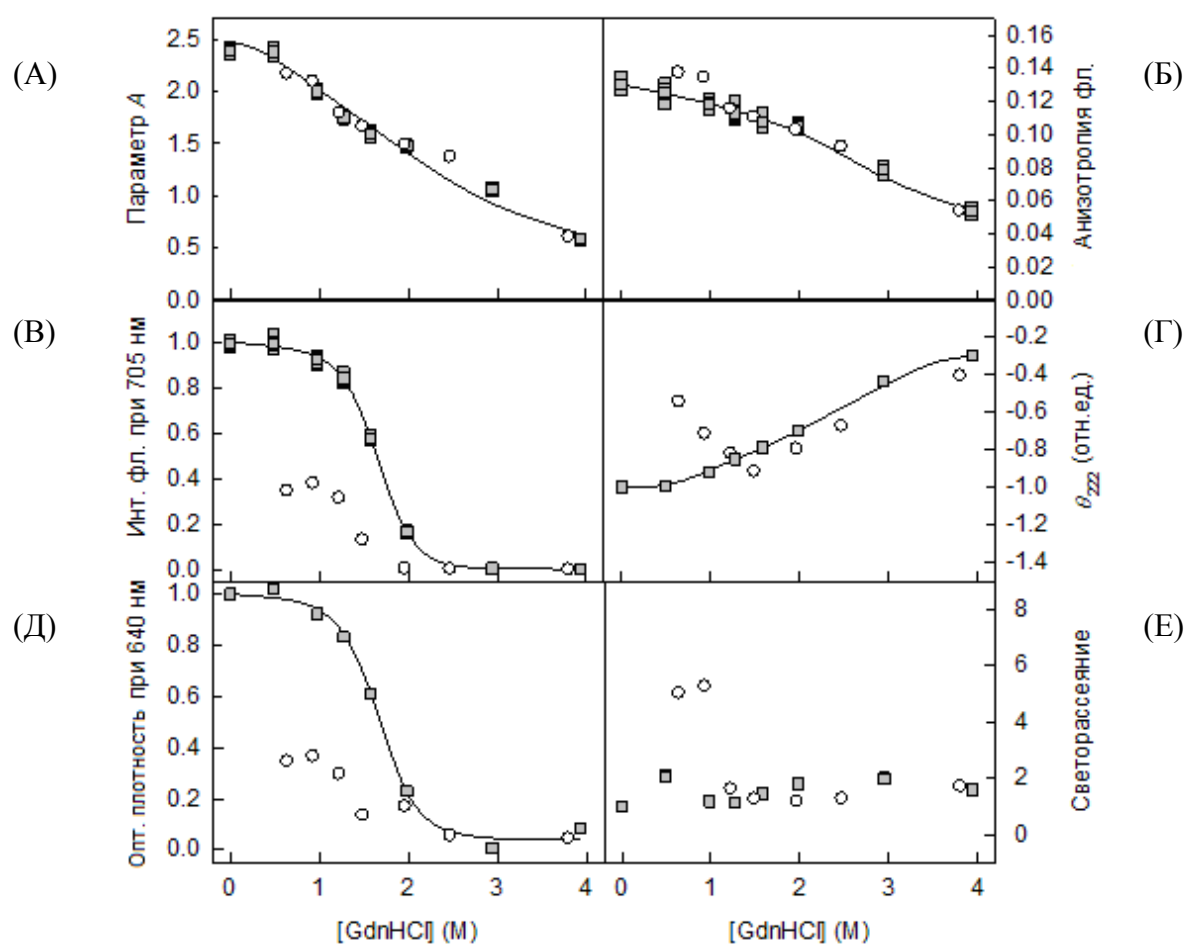


Рис. 3.33. Денатурационные кривые разворачивания и сворачивания iRFP670/C256S под действием GdnHCl.

Подписи данных – см. рис. 3.29

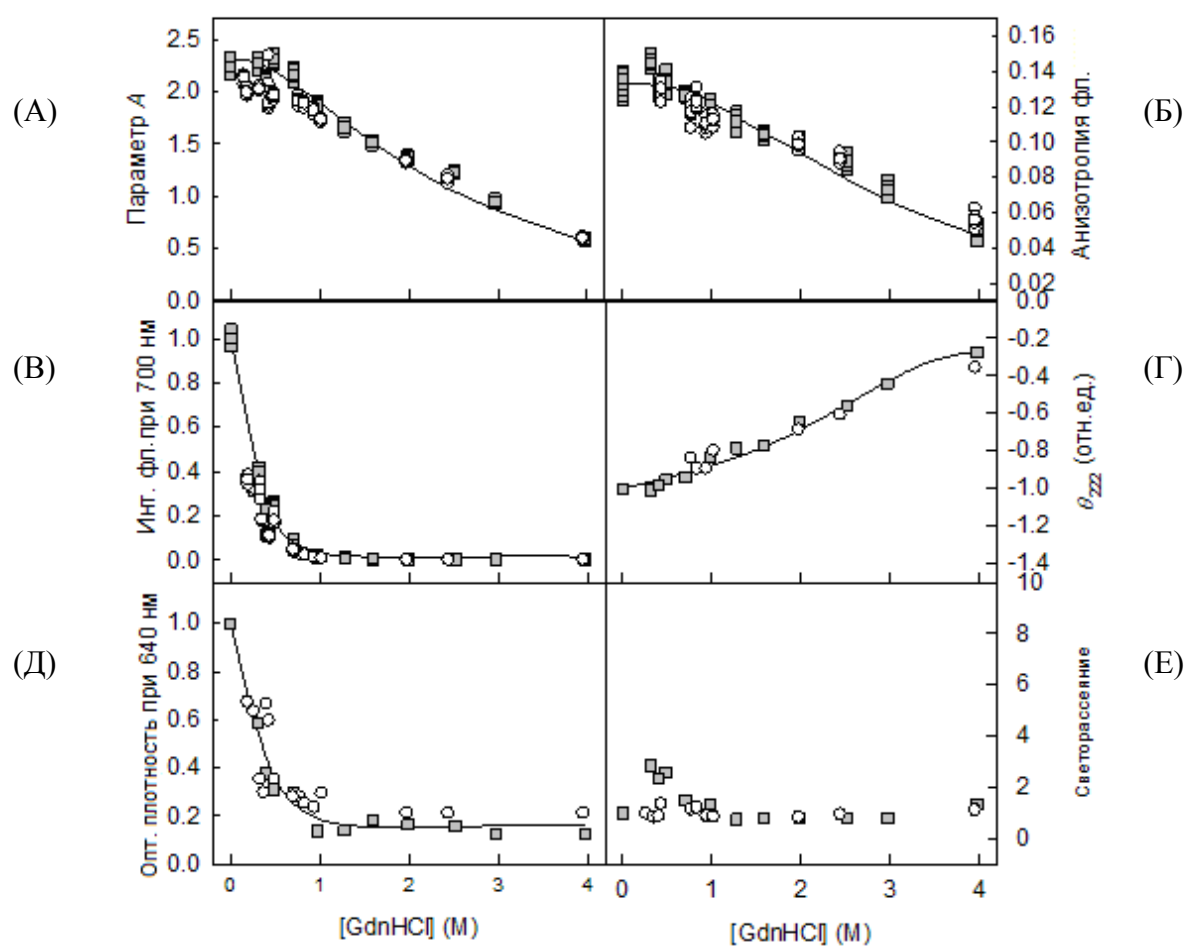


Рис. 3.34. Денатурационные кривые разворачивания и сворачивания iRFP670/C15S/C256S под действием GdnHCl.

Подписи данных – см. рис. 3.29.

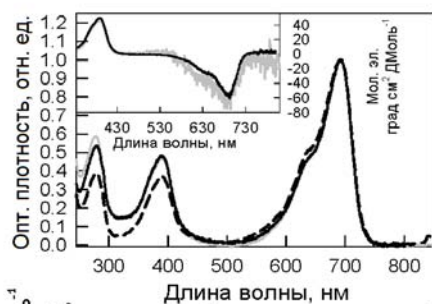
3.11. Влияние краудинг-агентов на структуру и процессы денатурации флуоресцентных белков на основе бактериальных фитохромов

Одним из первых был сконструирован флуоресцентный белок iRFP713 на основе бактериального фитохрома RpBphP2 из *R. Palustris*. Мы выбрали iRFP713 в качестве объекта для исследования влияния краудинг-агентов на структуру и процессы денатурации NIR FPs. В качестве краудинг агентов мы использовали PEG, имеющий молекулярный вес 8 кДа, и декстран с молекулярным весом 70 кДа.

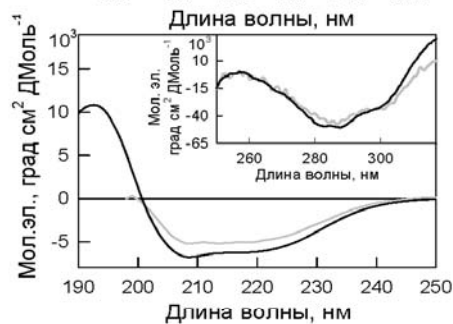
Исследование влияния краудинг-агентов на структуру белка выполнено методами адсорбционной спектроскопии, собственной флуоресценции белков и флуоресценции биливердина, кругового дихроизма в дальней и ближней УФ-областях и видимой области спектра (Рис. 3.35). Эти данные свидетельствуют, что структура iRFP713 в присутствии PEG и декстрана сохраняется. Микроокружение хромофора в присутствии краудинг-агентов также не меняется, о чем свидетельствует практически одинаковое положение спектров поглощения и флуоресценции в ближней ИК-области iRFP713 в буферном растворе и в присутствии PEG и декстрана. Таким образом, можно предположить, что структура кармана в GAF домене сохраняется. В присутствии краудинг-агентов наблюдается небольшой коротковолновый сдвиг спектров триптофановой флуоресценции. Белок iRFP713 содержит три триптофановых остатка: Trp108, Trp280, Trp310, при этом Trp108 расположен во внутренних областях белка, а остатки Trp280 и Trp310 находятся ближе к периферии молекулы белка и частично доступны растворителю. Вероятно, в присутствии краудинг-агентов, микроокружение этих частично доступных растворителю триптофановых остатков становится более гидрофобным.

На Рис. 3.36. представлены денатурационные зависимости параметра A , анизотропии триптофановой флуоресценции, флуоресценции хромофора, измеренной при длине волны 715 нм и эллиптичности при длине волны 222 нм от концентрации гуанидингидрохлорида (GdnHCl) для белка iRFP713 в буферном растворе и в присутствии краудинг-агентов. Квазиравновесные зависимости характеристик белка от концентрации денатуранта были измерены через 24 ч после приготовления растворов. Поскольку полоса поглощения iRFP713 в ближней инфра-красной области спектра существенно изменяется при денатурации белка, зависимости интенсивности флуоресценции биливердина были скорректированы с учетом изменения оптической плотности при длине волны возбуждения. Эти данные свидетельствуют, что присутствие в растворе PEG не влияет на процессы денатурации iRFP713, в то время как наблюдается существенная стабилизация структуры белка в присутствии декстрана. Это подтверждается сдвигом денатурационных зависимостей параметра A и анизотропии флуоресценции в область больших концентраций денатуранта. В тоже время, денатурационные зависимости оптической плотности и флуоресценции хромофора свидетельствуют о том, что диссоциация хромофора из кармана GAF домена в буферном растворе и в присутствии декстрана происходит при одинаковых концентрациях GdnHCl.

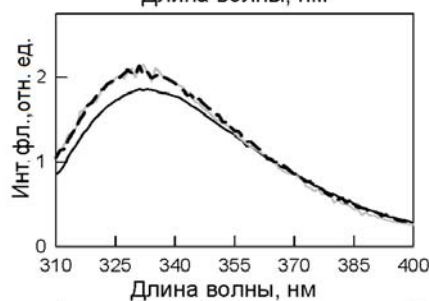
(А)



(Б)



(В)



(Г)

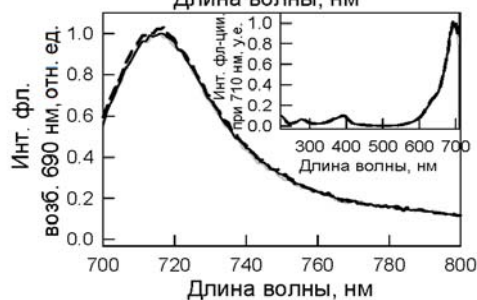


Рис. 3.35. Исследование влияния краудинг-агентов на структуру белка выполнено методами (А) адсорбционной спектроскопии, собственной флуоресценции белков и флуоресценции биливердина, кругового дихроизма в дальней и ближней УФ-областях и видимой области спектра

Денатурация iRFP713 (MW=70kDa у димера) под действием GdnHCl. Инкубация в присутствии денатуранта - 24 ч.

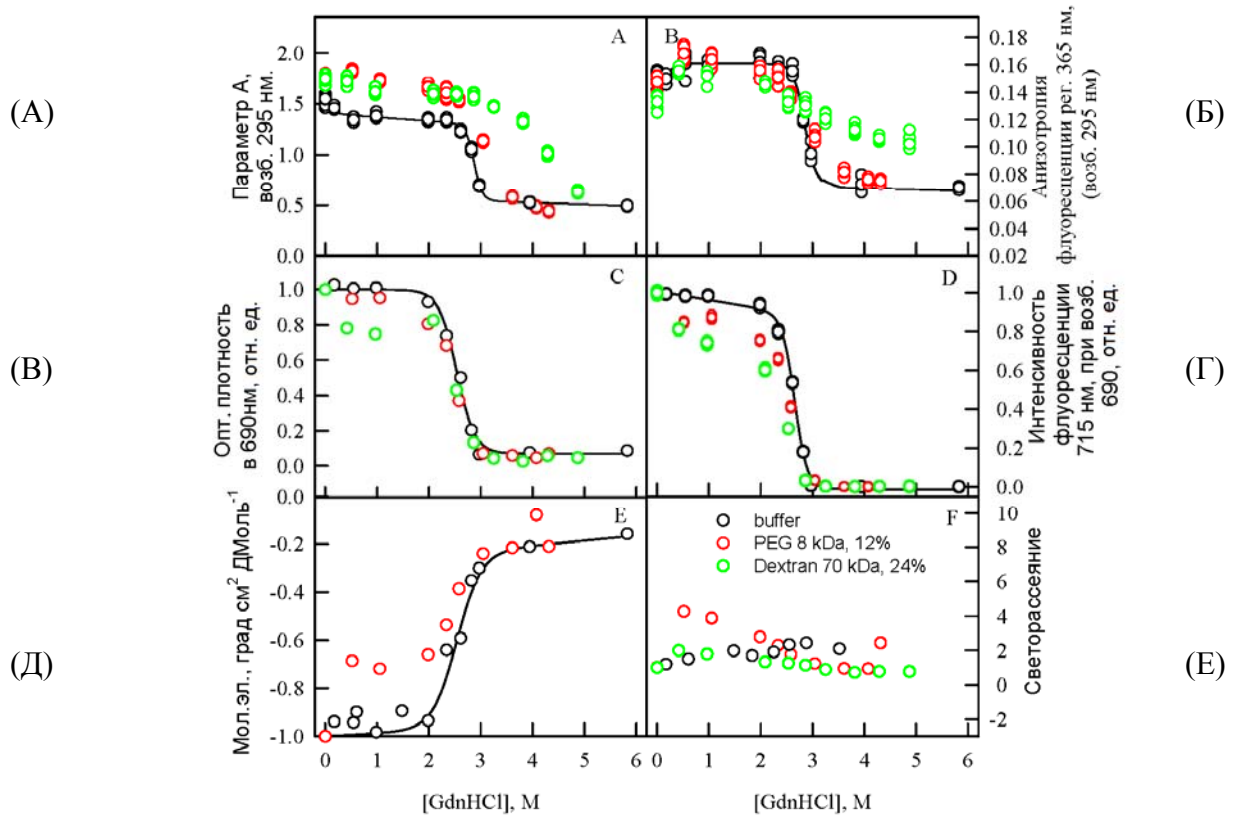


Рис. 3.36. Денатурационные кривые iRFP713 под действием GdnHCl в буферном растворе и в присутствии краудинг-агентов. (А) Изменение параметра $A = I_{320}/I_{365}$ при $\lambda_{\text{возб}} = 295$ нм. (Б) Изменение анизотропии флуоресценции при $\lambda_{\text{рег}} = 365$ нм и $\lambda_{\text{возб}} = 297$ нм. (В) Изменение оптической плотности при измерении на длине волны 690 нм. (Г) Изменение интенсивности флуоресценции хромофора. Поскольку спектр поглощения флуоресцентных белков существенно изменяется при изменении концентрации GdnHCl, флуоресценция хромофора была исправлена на оптическую плотность раствора при длине волны возбуждения (Д). Изменение эллиптичности при 222 нм. (Е) Изменение и рассеяния света, соответственно. Квадраты серого цвета соответствуют процессу разворачивания, незакрашенные кружки – сворачиванию белка. Кружки черного цвета – соответствуют измерениям в буферном растворе, красного – в присутствии краудинг агента PEG 8 kDa, 12%, зеленого - в присутствии краудинг агента Dextran 70kDa, 24%, соответственно.

ВЫВОДЫ

1. Наличие узла в структуре белка не препятствует эффективному рефолдингу iRFP713.
2. Необратимость денатурации iRFP713 в холоформе и агрегация молекул белка при ренатурации из развернутого состояния обусловлена наличием хромофора, связанного с белком ковалентно.
3. Белок iRFP713 в апоформе сохраняет структуру, присущую холоформе белка, и способен взаимодействовать с BV, связывая хромофор в соотношении 1:1. Конформация и микроокружение хромофора в образующемся комплексе и в нативном холобелке совпадают.
4. BV, встроенный в карман GAF домена, но не связанный ковалентно или связанный ковалентно с Cys 15 фитохрома, имеет длинноволновые полосы поглощения и флуоресценции.
5. BV, встроенный в карман GAF домена и ковалентно связанный с Cys 256 фитохрома, имеет коротковолновые полосы поглощения и флуоресценции, более высокий квантовый выход флуоресценции по сравнению с BV, связанным с Cys 15 или не связанным ковалентно.
6. Мутантная форма iRFP713/V256C имеет самый высокий из всех созданных на сегодняшний день NIR FPs квантовый выход и яркость флуоресценции *in vivo* и *in vitro*.
7. Связывание BV с цистеиновым остатком одного из мономеров димерных белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670 аллостерически влияет на связывание BV с цистеиновым остатком второго мономера.
8. Наличие цистеиновых остатков в PAS домене димерных белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670 аллостерически влияет на способность связывания BV с цистеиновыми остатками в GAF домене.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Лакович Д.* Основы флуоресцентной спектроскопии // -1986. -P.136-139.
2. *Степаненко Олеся В., Бубликов Г. С., Степаненко Ольга В., Рычков Г. Н., Поварова О. И., Верхуша В. В., Туроверов К. К., Кузнецова И. М.* Узлы в структуре белков // Цитология. -2015. -V.57 - (3) -P.177-183.
3. *Abagyan R., Totrov M., Kuznetsov D.* ICM—A new method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. // J. Comput. Chem. -1994. -V.15 -P.488-506.
4. *Agollah G. D., Wu G., Sevic-Muraca E. M., Kwon S.* In vivo lymphatic imaging of a human inflammatory breast cancer model // Journal of Cancer. -2014. -V.5 - (9) -P.774-783.
5. *Alam M. T. , Yamada T., Carlsson U., Ikai A.* The importance of being knotted: effects of the C-terminal knot structure on enzymatic and mechanical properties of bovine carbonic anhydrase II // FEBS Lett. . -2002. -V.519 -P.35-40.
6. *Andreeva A., Murzin A. G.* Structural classification of proteins and structural genomics: new insights into protein folding and evolution // Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun. -2010. -V.66 - (10) -P.1190-1197.
7. *Andrews B. T., Capraro D. T., Sulkowska J. I., Onuchic J. N., Jennings P. A.* Hysteresis as a Marker for Complex, Overlapping Landscapes in Proteins // J Phys Chem Lett. -2012. -V.4 - (1) -P.180-188.
8. *Andrews B. T., Roy M., Jennings P. A.* Chromophore packing leads to hysteresis in GFP // J Mol Biol. -2009. -V.392 - (1) -P.218-227.
9. *Auldridge M. E., Forest K. T.* Bacterial phytochromes: more than meets the light // Crit Rev Biochem Mol Biol. -2011. -V.46 - (1) -P.67-88.
10. *Auldridge M. E., Satyshur K. A., Anstrom D. M., Forest K. T.* Structure-guided engineering enhances a phytochrome-based infrared fluorescent protein // J Biol Chem. -2012. -V.287 - (10) -P.7000-7009.
11. *Bellini D., Papiz M. Z.* Dimerization properties of the RpBphP2 chromophore-binding domain crystallized by homologue-directed mutagenesis // Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. -2012. -V.68 - (8) -P.1058-1066.

12. *Bellini D., Papiz M. Z.* Structure of a bacteriophytochrome and light-stimulated protomer swapping with a gene repressor // *Structure*. -2012. -V.20 - (8) -P.1436-1446.
13. *Blumenstein A., Vienken K., Tasler R., Purschwitz J., Veith D., Frankenberg-Dinkel N., Fischer R.* The *Aspergillus nidulans* phytochrome FphA represses sexual development in red light // *Curr Biol*. -2005. -V.15 - (20) -P.1833-1838.
14. *Bolinger D., Sulkowska J., Hsu H. P., Mirny L. A., Kardar M., Onuchic J. N., Virnau P.* A Stevedore's Protein Knot // *PLoS Comput Biol*. -2010. -V.6 - (4) -P.1-6.
15. *Bornschlogl T., Anstrom D. M., Mey E., Dzubiella J., Rief M., Forest K. T.* Tightening the knot in phytochrome by single-molecule atomic force microscopy // *Biophys J*. -2009. -V.96 - (4) -P.1508-1514.
16. *Borucki B., Otto H., Rottwinkel G., Hughes J., Heyn M. P., Lamparter T.* Mechanism of Cph1 phytochrome assembly from stopped-flow kinetics and circular dichroism // *Biochemistry*. -2003. -V.42 - (46) -P.13684-13697.
17. *Bryant T. N., Watson H. C., Wendell P. L.* Structure of yeast phosphoglycerate kinase // *Nature*. -1974. -V.247 - (5435) -P.14-17.
18. *Butler W. L., Norris K. H., Siegelman H. W., Hendricks S. B.* Detection assay and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants // *Biochemistry*. -1959. -V.45 -P.1703-1708.
19. *Calvo-Álvarez E., Stamatakis K., Punzón C., Álvarez-Velilla R., Tejería A., Escudero-Martínez J. M., Pérez-Pertejo Y., Fresno M., Balaña-Fouce R., Reguera R. M.* Infrared Fluorescent Imaging as a Potent Tool for In Vitro, Ex Vivo and In Vivo Models of Visceral Leishmaniasis // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. -2015. -V.9 - (3)
20. *Condeelis J., Weissleder R.* In vivo imaging in cancer // *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. -2010. -V.2 - (12)
21. *Crippen G. M.* Topology of globular proteins // *J Theor Biol*. -1974. -V.45 - (2) -P.327-338.
22. *De Riso V., Raniello R., Maumus F., Rogato A., Bowler C., Falciatore A.* Gene

- silencing in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* // *Nucleic Acids Res.* -2009. -V.37 - (14) -P.e96.
23. *Dutta S., Burkhardt K., Young J., Swaminathan G. J., Matsuura T., Henrick K., Nakamura H., Berman H. M.* Data deposition and annotation at the worldwide protein data bank // *Mol Biotechnol.* -2009. -V.42 - (1) -P.1-13.
 24. *Dzubiella J.* Sequence-specific size, structure, and stability of tight protein knots // *Biophys J.* -2009. -V.96 - (3) -P.831-839.
 25. *Essen L. O., Mailliet J., Hughes J.* The structure of a complete phytochrome sensory module in the Pr ground state // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2008. -V.105 - (38) -P.14709-14714.
 26. *Filonov G. S., Piatkevich K. D., Ting L. M., Zhang J., Kim K., Verkhusha V. V.* Bright and stable near-infrared fluorescent protein for in vivo imaging // *Nat Biotechnol.* -2011. -V.29 - (8) -P.757-761.
 27. *Filonov G. S., Verkhusha V. V.* A Near-Infrared BiFC Reporter for In Vivo Imaging of Protein-Protein Interactions // *Chem Biol.* -2013. -V.20 - (8) -P.1078-1086.
 28. *Fonin A. V., Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K.* Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction // *PLoS One.* -2014. -V.9 - (7) -P.e103878.
 29. *Froehlich A. C., Noh B., Vierstra R. D., Loros J., Dunlap J. C.* Genetic and molecular analysis of phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa* // *Eukaryot Cell.* -2005. -V.4 - (12) -P.2140-2152.
 30. *Fyk-Kolodziej B., Hellmer C. B., Ichinose T.* Marking cells with infrared fluorescent proteins to preserve photoresponsiveness in the retina // *BioTechniques.* -2014. -V.57 - (5) -P.245-253.
 31. *Gill S.C., Hippel P.H.* Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data // *Anal. Biochem.* -1989. -V.182 -P.318-326.
 32. *Hauck A. F., Hardman S. J., Kutta R. J., Greetham G. M., Heyes D. J., Scrutton N. S.* The photoinitiated reaction pathway of full-length cyanobacteriochrome Tlr0924 monitored over 12 orders of magnitude // *J Biol Chem.* -2014. -V.289 -

- (25) -P.17747-17757.
33. *Huang L., Makarov D. E.* Translocation of a knotted polypeptide through a pore // *J Chem Phys.* -2008. -V.129 - (12) -P.121107.
 34. *Hughes J., Lamparter T., Mittmann F., Hartmann E., Gartner W., Wilde A., Borner T.* A prokaryotic phytochrome // *Nature.* -1997. -V.386 - (6626) -P.663.
 35. *Jablonski A.* Decay of photoluminescence of solutions. // *Acta Phys. Polon.* - 1957. -V.16 - P.471-479.
 36. *Jiguet-Jiglaire C., Cayol M., Mathieu S., Jeanneau C., Bouvier-Labit C., Ouafik L., El-Battari A.* Noninvasive near-infrared fluorescent protein-based imaging of tumor progression and metastases in deep organs and intraosseous tissues // *Journal of Biomedical Optics.* -2014. -V.19 - (1)
 37. *Johnston S. C. , Riddle S. M. , Cohen R. E., Hill C. P.* Structural basis for the specificity of ubiquitin C-terminal hydrolases // *EMBO J.* -1999. -V.18 -P.3877-3887.
 38. *Kim E. E. Wyckoff H. W.* Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. // *J. Mol. Biol.* -1991. -V.218 -P.449-464.
 39. *King N. P. Yeates E. O., Yeates T. O.* Identification of rare slipknots in proteins and their implications for stability and folding // *J. Mol. Biol.* -2007. -V.373 - P.153-166.
 40. *Kuznetsova I. M., Sulatskaya A. I., Povarova O. I., Turoverov K. K.* Reevaluation of ANS Binding to Human and Bovine Serum Albumins: Key Role of Equilibrium Microdialysis in Ligand - Receptor Binding Characterization // *PLoS One.* -2012. -V.7 - (7) -P.e40845.
 41. *Kuznetsova I. M., Turoverov K. K.* What determines the characteristics of the intrinsic UV-fluorescence of proteins? Analysis of the properties of the microenvironment and features of the localization of their tryptophan residues // *Tsitologiya.* -1998. -V.40 - (8-9) -P.747-762.
 42. *Kuznetsova I. M., Yakusheva T. A., Turoverov K. K.* Contribution of separate tryptophan residues to intrinsic fluorescence of actin. Analysis of 3D structure //

- FEBS Lett. -1999. -V.452 - (3) -P.205-210.
43. *Laemmli U. K.* Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. -1970. -V.227 - (5259) -P.680-685.
 44. *Lai Y. L., Yen S. C., Yu S. H., Hwang J. K.* pKNOT: the protein KNOT web server // *Nucleic Acids Res.* -2007. -V.35 - (Web Server issue) -P.W420-424.
 45. *Leung E. W. , Guddat L. W.* Conformational changes in a plant ketol-acid reductoisomerase upon Mg(2+) and NADPH binding as revealed by two crystal structures. // *J. Mol. Biol.* -2009. -V.389 - P.167-182.
 46. *Lim K. , Zhang H. , Tempczyk A., Krajewski W. , Bonander N., Toedt J. , Howard A., Eisenstein E. , Herzberg O.* Structure of the YibK methyltransferase from *Haemophilus influenzae* (HI0766): a cofactor bound at a site formed by a knot // *Proteins*. -2003. -V.51 -P.56-67.
 47. *Lu Y., Darne C. D., Tan I. C., Wu G., Wilganowski N., Robinson H., Azhdarinia A., Zhu B., Rasmussen J. C., Sevick-Muraca E. M.* In vivo imaging of orthotopic prostate cancer with far-red gene reporter fluorescence tomography and in vivo and ex vivo validation // *Journal of Biomedical Optics*. -2013. -V.18 - (10)
 48. *Lua R. C., Grosberg A. Y.* Statistics of knots, geometry of conformations, and evolution of proteins // *PLoS Comput Biol.* -2006. -V.2 - (5) -P.e45.
 49. *Mallam A. L., Jackson S. E.* A comparison of the folding of two knotted proteins: YbeA and YibK // *J Mol Biol.* -2007. -V.366 - (2) -P.650-665.
 50. *Mallam A. L., Jackson S. E.* Folding studies on a knotted protein // *J Mol Biol.* -2005. -V.346 - (5) -P.1409-1421.
 51. *Mallam A. L., Jackson S. E.* Knot formation in newly translated proteins is spontaneous and accelerated by chaperonins // *Nat Chem Biol.* -2011. -V.8 - (2) - P.147-153.
 52. *Mallam A. L., Jackson S. E.* Probing nature's knots: the folding pathway of a knotted homodimeric protein // *J Mol Biol.* -2006. -V.359 - (5) -P.1420-1436.
 53. *Mallam A. L., Morris E. R., Jackson S. E.* Exploring knotting mechanisms in protein folding // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2008. -V.105 - (48) -P.18740-18745.

54. *Mallam A. L., Rogers J. M., Jackson S. E.* Experimental detection of knotted conformations in denatured proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2010. -V.107 - (18) -P.8189-8194.
55. *Mansfield M. L.* Are there knots in proteins? // *Nature Struct. Biol.* -1994. -V.1 - (4) -P.213-214.
56. *McDonagh A. F., Palma L. A.* Preparation and properties of crystalline biliverdin IX alpha. Simple methods for preparing isomerically homogeneous biliverdin and [14C]biliverdin by using 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone // *Biochem J.* - 1980. -V.189 - (2) -P.193-208.
57. *Michel G., Sauve V., Larocque R., Li Y., Matte A., Cygler M.* The structure of the RlmB 23S rRNA methyltransferase reveals a new methyltransferase fold with a unique knot // *Structure.* -2002. -V.10 - (10) -P.1303-1315.
58. *Montgomery Beronda L., Lagarias J. Clark* Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light // *Trends in Plant Science.* -2002. -V.7 - (8) -P.357-366.
59. *Narikawa R., Ishizuka T., Muraki N., Shiba T., Kurisu G., Ikeuchi M.* Structures of cyanobacteriochromes from phototaxis regulators AnPixJ and TePixJ reveal general and specific photoconversion mechanism // *Proc Natl Acad Sci U S A.* - 2013. -V.110 - (3) -P.918-923.
60. *Nedosekin D. A., Sarimollaoglu M., Galanzha E. I., Sawant R., Torchilin V. P., Verkhusha V. V., Ma J., Frank M. H., Biris A. S., Zharov V. P.* Synergy of photoacoustic and fluorescence flow cytometry of circulating cells with negative and positive contrasts // *Journal of Biophotonics.* -2013. -V.6 - (5) -P.425-434.
61. *Noel J. K., Sulkowska J. I., Onuchic J. N.* Slipknotting upon native-like loop formation in a trefoil knot protein // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2010. -V.107 - (35) -P.15403-15408.
62. *Nureki O., Shirouzu M., Hashimoto K., Ishitani R., Terada T., Tamakoshi M., Oshima T., Chijimatsu M., Takio K., Vassilyev D. G., Shibata T., Inoue Y., Kuramitsu S., Yokoyama S.* An enzyme with a deep trefoil knot for the active-site architecture // *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* -2002. -V.58 - (7) -P.1129-1137.

63. *Onuchic J. N., Wolynes P. G.* Theory of protein folding // *Curr Opin Struct Biol.* -2004. -V.14 - (1) -P.70-75.
64. *Piatkevich K. D., Subach F. V., Verkhusha V. V.* Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals // *Chem Soc Rev.* -2013. -V.42 - (8) -P.3441-3452.
65. *Piatkevich K. D., Subach F. V., Verkhusha V. V.* Far-red light photoactivatable near-infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome // *Nat Commun.* -2013. -V.4 - P.2153.
66. *Povarova O. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K.* Differences in the pathways of proteins unfolding induced by urea and guanidine hydrochloride: molten globule state and aggregates // *PLoS One.* -2010. -V.5 - (11) -P.e15035.
67. *Rawdon E. J., Millett K. C., Sulkowska J. I., Stasiak A.* Knot localization in proteins // *Biochem. Soc. Trans.* . -2013. -V.41 -P.538—541.
68. *Richardson J. S.* beta-Sheet topology and the relatedness of proteins // *Nature.* -1977. -V.268 - (5620) -P.495-500.
69. *Rockwell N. C., Lagarias J. C.* A brief history of phytochromes // *Chemphyschem.* -2010. -V.11 - (6) -P.1172-1180.
70. *Samma A. A., Johnson C. K., Song S., Alvarez S., Zimmer M.* On the origin of fluorescence in bacteriophytochrome infrared fluorescent proteins // *J Phys Chem B.* -2010. -V.114 - (46) -P.15362-15369.
71. *Schmidberger J. W., Wilce J. A., Weightman A. J., Whisstock J. C., Wilce M. C.* The crystal structure of DehI reveals a new alpha-haloacid dehalogenase fold and active-site mechanism // *J Mol Biol.* -2008. -V.378 - (1) -P.284-294.
72. *Shcherbakova D. M., Baloban M., Verkhusha V. V.* Near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes // *Curr Opin Chem Biol.* -2015. -V.27 - P.52-63.
73. *Shcherbakova D. M., Shemetov A. A., Kaberniuk A. A., Verkhusha V. V.* Natural photoreceptors as a source of fluorescent proteins, biosensors, and optogenetic tools // *Annu Rev Biochem.* -2015. -V.84 -P.519-550.
74. *Shcherbakova D. M., Verkhusha V. V.* Near-infrared fluorescent proteins for

- multicolor in vivo imaging // *Nat Methods*. -2013. -V.10 - (8) -P.751-754.
75. *Shu X., Royant A., Lin M. Z., Aguilera T. A., Lev-Ram V., Steinbach P. A., Tsien R. Y.* Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome // *Science*. -2009. -V.324 - (5928) -P.804-807.
 76. *Song C., Psakis G., Lang C., Mailliet J., Gartner W., Hughes J., Matysik J.* Two ground state isoforms and a chromophore D-ring photoflip triggering extensive intramolecular changes in a canonical phytochrome // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -2011. -V.108 - (10) -P.3842-3847.
 77. *Song C., Psakis G., Lang C., Mailliet J., Zaanen J., Gartner W., Hughes J., Matysik J.* On the collective nature of phytochrome photoactivation // *Biochemistry*. -2011. -V.50 - (51) -P.10987-10989.
 78. *Stepanenko Olesya V., Baloban M., Bublikov G. S., Shcherbakova D. M., Stepanenko Olga V., Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Verkhusha V. V.* Allosteric effects of chromophore interaction with dimeric near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes // *Sci Rep*. -2016. -P.1-13.
 79. *Stepanenko Olesya V., Bublikov G. S., Stepanenko Olga V., Shcherbakova D. M., Verkhusha V. V., Turoverov K. K., Kuznetsova I.M.* A knot in the protein structure – probing the near-infrared fluorescent protein iRFP designed from a bacterial phytochrome // *Febs J*. -2014. -V.281 -P.2284-2298.
 80. *Stepanenko O. V., Stepanenko O. V., Kuznetsova I. M., Verkhusha V. V., Turoverov K. K.* Beta-barrel scaffold of fluorescent proteins: folding, stability and role in chromophore formation // *Int Rev Cell Mol Biol*. -2013. -V.302 -P.221-278.
 81. *Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K.* Interaction of thioflavin T with amyloid fibrils: stoichiometry and affinity of dye binding, absorption spectra of bound dye // *J Phys Chem B*. -2011. -V.115 - (39) -P.11519-11524.
 82. *Sulatskaya A. I., Povarova O. I., Kuznetsova I. M., Uversky V. N., Turoverov K. K.* Binding stoichiometry and affinity of fluorescent dyes to proteins in different structural states // *Methods Mol Biol*. -2012. -V.895 -P.441-460.

83. *Sulkowska J. I., Noel J. K., Onuchic J. N.* Energy landscape of knotted protein folding // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2012. -V.109 - (44) -P.17783-17788.
84. *Sulkowska J. I., Noel J. K., Ramirez-Sarmiento C. A., Rawdon E. J., Millett K. C., Onuchic J. N.* Knotting pathways in proteins // *Biochem Soc Trans.* -2013. -V.41 - (2) -P.523-527.
85. *Sulkowska J. I., Rawdon E. J., Millett K. C., Onuchic J. N., Stasiak A.* Conservation of complex knotting and slipknotting patterns in proteins // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2012. -V.109 - (26) -P.E1715-1723.
86. *Sulkowska J. I., Rawdon E. J., Millett K. C., Onuchic J. N., Stasiak A.* Conservation of complex knotting and slipknotting patterns in proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* -2012. -V.109 -P.E1715-E1723.
87. *Sulkowska J. I., Sulkowski P., Onuchic J.* Dodging the crisis of folding proteins with knots // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2009. -V.106 - (9) -P.3119-3124.
88. *Sulkowska J. I., Sulkowski P., Onuchic J.* Dodging the crisis of folding proteins with knots // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* -2009. -V.106 -P.3119-3124.
89. *Takusagawa F., Kamitori S., Markham G. D.* Structure and function of S-adenosylmethionine synthetase: crystal structures of S-adenosylmethionine synthetase with ADP, BrADP, and PPi at 28 angstroms resolution // *Biochemistry.* -1996. -V.35 -P.2586—2596.
90. *Takusagawa F., Kamitori S., Misaki S., Markham G. D.* Crystal structure of S-adenosylmethionine synthetase // *J. Biol. Chem.* -1996. -V.271 -P.136—147.
91. *Tarutina M., Ryjenkov D. A., Gomelsky M.* An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP // *J Biol Chem.* -2006. -V.281 - (46) -P.34751-34758.
92. *Taylor W. R.* A deeply knotted protein structure and how it might fold // *Nature.* -2000. -V.406 - (6798) -P.916-919.
93. *Taylor W. R.* Protein knots and fold complexity: some new twists // *Comput Biol Chem.* -2007. -V.31 - (3) -P.151-162.
94. *Tinoco I. J., Bustamante C., Maestre M. F.* The optical activity of nucleic acids and their aggregates // *Annu Rev Biophys Bioeng.* -1980. -V.9 -P.107-141.

95. *Toh K. C., Stojkovic E. A., van Stokkum I. H., Moffat K., Kennis J. T.* Fluorescence quantum yield and photochemistry of bacteriophytochrome constructs // *Phys Chem Chem Phys*. -2011. -V.13 - (25) -P.11985-11997.
96. *Toh K. C., Stojkovic E. A., van Stokkum I. H., Moffat K., Kennis J. T.* Proton-transfer and hydrogen-bond interactions determine fluorescence quantum yield and photochemical efficiency of bacteriophytochrome // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -2010. -V.107 - (20) -P.9170-9175.
97. *Tran M. T., Tanaka J., Hamada M., Sugiyama Y., Sakaguchi S., Nakamura M., Takahashi S., Miwa Y.* In vivo image analysis using iRFP transgenic mice // *Experimental Animals*. -2014. -V.63 - (3) -P.311-319.
98. *Turoverov K. K., Biktashev A. G., Dorofeiuk A. V., Kuznetsova I. M.* A complex of apparatus and programs for the measurement of spectral, polarization and kinetic characteristics of fluorescence in solution // *Tsitologiya*. -1998. -V.40 - (8-9) -P.806-817.
99. *Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Uversky V. N.* The protein kingdom extended: ordered and intrinsically disordered proteins, their folding, supramolecular complex formation, and aggregation // *Prog Biophys Mol Biol*. -2010. -V.102 - (2-3) -P.73-84.
100. *Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Zaitsev V. N.* The environment of the tryptophan residue in *Pseudomonas aeruginosa* azurin and its fluorescence properties // *Biophys Chem*. -1985. -V.23 - (1-2) -P.79-89.
101. *Turoverov K. K., Verkhusha V. V., Shavlovsky M. M., Biktashev A. G., Povarova O. I., Kuznetsova I. M.* Kinetics of actin unfolding induced by guanidine hydrochloride // *Biochemistry*. -2002. -V.41 - (3) -P.1014-1019.
102. *van Roon A. M., Loening N. M., Obayashi E., Yang J. C., Newman A. J., Hernandez H., Nagai K., Neuhaus D.* Solution structure of the U2 snRNP protein Rds3p reveals a knotted zinc-finger motif // *Proc Natl Acad Sci U S A*. -2008. -V.105 - (28) -P.9621-9626.
103. *Virnau P., Mallam A., Jackson S.* Structures and folding pathways of topologically knotted proteins // *J Phys Condens Matter*. -2011. -V.23 - (3) -

P.033101.

104. *Virnau P., Mirny L. A., Kardar M.* Intricate knots in proteins: Function and evolution // PLoS Comput Biol. -2006. -V.2 - (9) -P.e122.
105. *Wagner J. R., Brunzelle J. S., Forest K. T., Vierstra R. D.* A light-sensing knot revealed by the structure of the chromophore-binding domain of phytochrome // Nature. -2005. -V.438 - (7066) -P.325-331.
106. *Wagner J. R., Zhang J., Brunzelle J. S., Vierstra R. D., Forest K. T.* High resolution structure of Deinococcus bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution // J Biol Chem. -2007. -V.282 - (16) -P.12298-12309.
107. *Wagner J. R., Zhang J., von Stetten D., Gunther M., Murgida D. H., Mroginiski M. A., Walker J. M., Forest K. T., Hildebrandt P., Vierstra R. D.* Mutational analysis of Deinococcus radiodurans bacteriophytochrome reveals key amino acids necessary for the photochromicity and proton exchange cycle of phytochromes // J Biol Chem. -2008. -V.283 - (18) -P.12212-12226.
108. *Wallin S., Zeldovich K. B., Shakhnovich E. I.* The folding mechanics of a knotted protein // J. Mol. Biol. . -2007. -V.368 -P.884-893.
109. *Wang P., Yang L., Liu P., Gao Y. Q., Zhao X. S.* Single-molecule detection reveals knot sliding in TrmD denaturation // Chemistry. -2013. -V.19 - (19) -P.5909-5916.
110. *Wang Y., Zhou M., Wang X., Qin G., Weintraub N. L., Tang Y.* Assessing in vitro stem-cell function and tracking engraftment of stem cells in ischaemic hearts by using novel iRFP gene labelling // Journal of Cellular and Molecular Medicine. -2014. -V.18 - (9) -P.1889-1894.
111. *Wass J. A.* SigmaPlot 11: Now with Total SigmaStat Integration // Scientific Computing International. -2009. -P.1-5.
112. *Watters A. L., Deka P., Corrent C., Callender D., Varani G., Sosnick T., Baker D.* The highly cooperative folding of small naturally occurring proteins is likely the result of natural selection // Cell. -2007. -V.128 - (3) -P.613-624.
113. *Wu S. H., McDowell M. T., Lagarias J. C.* Phycocyanobilin is the natural

- precursor of the phytochrome chromophore in the green alga *Mesotaenium caldariorum* // *J Biol Chem.* -1997. -V.272 - (41) -P.25700-25705.
114. *Yang X., Kuk J., Moffat K.* Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophytochrome: photoconversion and signal transduction // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2008. -V.105 - (38) -P.14715-14720.
 115. *Yang X., Stojkovic E. A., Ozarowski W. B., Kuk J., Davydova E., Moffat K.* Light Signaling Mechanism of Two Tandem Bacteriophytochromes // *Structure.* -2015. -V.23 - (7) -P.1179-1189.
 116. *Yu D., Gustafson C., Han C., Lafaye C., Noirclerc-Savoye M., Ge W.P., Thayer D., Huang H., Kornberg T.B., Royant A., Jan L.Y, Jan Y.N., Weiss W.A., Shu X.* An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumourbrain imaging // *Nat. Commun.* -2014. -V.5 - (3626) -P.1-7.
 117. *Zhang K., Cui B.* Optogenetic control of intracellular signaling pathways // *Trends Biotechnol.* -2015. -V.33 - (2) -P.92-100.
 118. *Zhu B., Wu G., Robinson H., Wilganowski N., Hall M. A., Ghosh S. C., Pinkston K. L., Azhdarinia A., Harvey B. R., Sevic-Muraca E. M.* Tumor margin detection using quantitative NIRF molecular imaging targeting EpCAM validated by far red gene reporter iRFP // *Molecular Imaging and Biology.* -2013. -V.15 - (5) -P.560-568.