На правах рукописи

БУБЛИКОВ Григорий Сергеевич

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

03.01.03 – молекулярная биология

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Санкт-Петербург 2016 Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии Российской академии наук (ИНЦ РАН)

Научные руководители:

кандидат биологических наук СТЕПАНЕНКО Олеся Викторовна ИНЦ РАН

доктор физико-математических наук, профессор **ТУРОВЕРОВ Константин Константинович**, ИНЦ РАН

Официальные оппоненты:

доктор биологический наук

Лукьянов Константин Анатольевич

заведующий Лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

кандидат биологических наук Васин Андрей Владимирович

заведующий Лаборатории структурной и функциональной протеомики Федерального государственного бюджетного учреждения Научно-исследовательского института гриппа Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация:

Национальный исследовательский центр "Курчатовский институт" Федеральное государственное бюджетное учреждение Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова

Защита диссертации состоится «29» апреля 2016 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета Д 002.230.01 на базе ИНЦ РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д. 4.

Адрес электронной почты Института: <u>cellbio@mail.cytspb.rssi.ru</u> Сайт: <u>http://www.cytspb.rssi.ru</u> Факс: 8(812)297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИНЦ РАН и на сайте Института http://www.cytspb/rssi/ru

Автореферат разослан « » 2016 года

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат биологических наук

2 Jacker

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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.

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.

Принятые сокращения:

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

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:

- Провести изучение процессов сворачивания разворачивания флуоресцентного белка iRFP713; выяснить роль узла, образованного его аминокислотной последовательностью, в процессах их сворачивания – разворачивания;
- 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;
- 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;
- ВV, встроенный в карман GAF домена, но не связанный ковалентно или связанный ковалентно с Cys 15 NIR FP, имеет длинноволновые полосы поглощения и флуоресценции;
- ВV, 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/V256С 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 ВV 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 коротковоновые 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;

5

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.

Финансовая поддержка

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы «Молекулярная и клеточная биология» (грант К.К. Туроверова), РФФИ (грант №13-04-0814), и Российского научного фонда (грант № 14-24-00131) в части, касающейся использования флуоресцентного маркера

iRFP713 в качестве одного из объектов изучения влияния краудинг-агентов на структуру и стабильность белков.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 135 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, результаты и обсуждение, выводы. Материал иллюстрирован 39 рисунками и 2 таблицами. Библиографический указатель содержит 195 источников.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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 [1]. Для получения холоформы NIR FPs клетки LMG 194 были котрансформированы плазмидой pWA21h, кодирующей ген гемоксигеназы (HO), необходимой для синтеза ВV. Клеточную культуру инкубировали в RM среде, содержащей ампицилин, канамицин и 0.02% рамнозы в течение 5-6 ч. Индукция синтеза целевого белка NIR FP осуществлялась путем введения арабинозы в конечной концентрации 0.002% с последующей инкубацией при 37 °C в течение 6 ч и при 18 °C в течение 24 ч. Рекомбинантный белок в холоформе 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). При получении апоформы белка клеточную культуру инкубировали в RM среде, содержащей ампицилин в течение 3-4 ч. Индукция экспрессии целевого NIR FP и последующие этапы получения белка осуществлялись так же, как и для холоформы. Чистоту белка контролировали методом электрофореза в SDS/PAGE с использованием 15%-ного полиакриламидного геля [2]. Белок был сконцентрирован и хранился в 20 мм TrisHCl буфере, pH 8.0.

Материалы. Биливердин гидрохлорид (Frontier Scientific, США) использовали без дополнительной очистки. Концентрацию BV определяли спектрофотометрически. При этом коэффициент молярной экстинкции ε_{376} принимали равным 45500 M⁻¹см⁻¹ [3]. Для исследования процессов денатурации – ренатурации белков использовали химический денатурант гуанидингидрохлорид (GdnHCl) производства Sigma-Aldrich, (США) без дополнительной очистки. Концентрацию раствора GdnHCl определяли рефрактометрически с использованием рефрактометра Аббе (ЛОМО, Санкт-Петербург, Россия).

Спектрофотометрические измерения. Спектры поглощения были измерены с использованием спектрофотометра U-3900H (Hitachi, Япония). Измерения проводили при комнатной температуре с использованием кварцевых кювет (101.016-QS, 5х5 мм, Hellma, Германия) с длиной оптического пути 5мм.

Анализ 3D структуры белка. При анализе пространственной структуры были использованы рентгеноструктурные данные для бактериальных фитохромов, представленные в банке белковых структур (4E04.pdb) [4]. Анализ особенностей микроокружения триптофановых остатков был выполнен с использованием ранее разработанной методики [5, 6, 7, 8].

Измерения флуоресцентных характеристик. Флуоресцентные измерения проводили с использованием спектрофлуориметра Cary Eclipse и кювет типа 26.400-F (10x10x4мм) Starna Scientific (Англия). Измерение анизотропии флуоресценции было выполнены с использованием спектрофлуориметрических установок собственного изготовления со стационарным возбуждением [9] в микрокюветах (101.016-QS 5 × 5 мм; Hellma, Германия) и спектрофлуориметра Cary Eclipse. Ближне-инфракрасную флуоресценцию, характерную для NIR FPs, возбуждали светом с длиной волны, соответствующей максимуму поглощения BV в белках, во всех случаях, если это не оговорено особо. Триптофановая флуоресценция белка была измерена при возбуждении в длинноволновой области спектра поглощения (λ_{ex} =297нм), где вклад остатков тирозина в суммарную флуоресценции белка является незначительным. Для характеристики положения и формы спектров триптофановой флуоресценции использовали параметр $A = I_{320}/I_{365}$, где I_{320} и I_{365} – интенсивность флуоресценции и параметр A корректировали на спектральную чувствительность установки. Анизотропию триптофановой флуоресценции определяли с использованием соотношения $r = (I_V^v - GI_V^H)/(I_V^v - 2GY_H^v)$, где I_V^v и

 I_{H}^{v} – вертикальные и горизонтальные компоненты интенсивности флуоресценции при возбуждении вертикально поляризованным светом, соответственно; коэффициент, учитывающий различную чувствительность приемной системы установки к вертикальной и горизонтальной составляющей интенсивности флуоресценции, *G*, определяли с использованием соотношения $G = I_{V}^{H} / I_{H}^{H}$ (λ_{em} =365нм), где I_{V}^{H} и I_{H}^{H} – вертикальная и горизонтальная компоненты интенсивности флуоресценции при возбуждении горизонтально поляризованным светом [9].

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

спектра от 260 до 190 нм использовали кварцевые кюветы с длиной оптического пути 1 мм, в ближней УФ от 320 до 250 нм и видимой областях от 800 до 320 нм в кюветах с длиной оптического пути 1 см. Измерения проводили с шагом 0.1 нм. Для улучшения соотношения сигнал/шум каждый спектр регистрировали 3 раза и полученные данные усредняли. Спектры КД белков корректировали с учетом КД соответствующего буферного раствора.

Равновесный микродиализ. Равновесный микродиализ проводили с использованием устройства Harvard Apparatus/Amika (США), которое состоит из двух камер (объемом по 500 мкл), разделенных мембраной, проницаемой для лиганда, но непроницаемой для рецептора. В экспериментах с NIR FPs использовали мембрану, непроницаемую для молекул с молекулярной массой более 10 кДа. Белок в апоформе помещали в камеру №1, а раствор BV – в камеру №2. Белок и BV были приготовлены в одинаковом буферном растворе (20мМ TrisHCl pH8.6). Концентрация NIR FP составляла 8мкМ, а BV изменялась от 25 до 70 мкМ. Микродиализное устройство было расположено на качающейся платформе в течении 5 сут при 4 °С. Время установления равновесия было определено в контрольных экспериментах с использованием растворов BV и буферного раствора. После установления равновесия концентрация свободного BV (C_i) в обеих камерах становилась одинаковой, в то время как общая концентрация BV в камере №1 была больше, чем в камере №2, на концентрацию BV, связанного с белком. Концентрацию BV, связанного с белком, рассчитывали с использованием соотношения: $C_b = C_0 - 2C_f$, где C_0 начальная концентрация BV в камере №2. Спектр поглощения раствора в камере №1 представляет собой суперпозицию спектров поглощения свободного BV с концентрацией C_f и комплекса NIR FP/BV. Измерение спектров поглощения растворов из каждой камеры позволяет определить разностный спектр, который представляет собой спектр поглощения связанного BV.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Роль узла и хромофора в процессах денатурации – ренатурации флуоресцентных маркеров, созданных на основе бактериальных фитохромов

Денатурацию – ренатурацию флуоресцентных маркеров на основе бактериальных фитохромов под действием химического денатуранта GdnHCl изучали с использованием методов, основанных на регистрации триптофановой флуоресценции, флуоресценции хромофора, спектров КД в дальней УФ области, светорассеяния. Оказалось, что во всех случаях денатурационные и ренатурационные кривые не совпадают. На Рис. 1 показаны экспериментальные данные, полученные для iRFP713. Перевод денатурированного белка в условия, отвечающие нативному состоянию, не приводит к восстановлению регистрируемых характеристик до значений, соответствующих нативному белку: интенсивность флуоресценции BV остается значительно ниже, чем для нативного белка (Рис. 1, панель Б), существенно увеличивается интенсивность светорассеяния (Рис. 1, панель Е), что свидетельствует об образовании агрегатов частично свернутых молекул, более высокое значение параметра *A* по сравнению с нативным белком, может быть объяснено тем, что при агрегации трипофановые остатки становятся менее доступными растворителю.



Рис. 1. Денатурация – ренатурация флуоресцентного маркера iRFP713 под действием GdnHCl. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции при λ_{per} =320 нм и $\lambda_{возб}$ =295 нм (панель A), интенсивности флуоресценции BV при λ_{per} =715 нм и $\lambda_{возб}$ =690 нм (панель Б), параметра *A* (панель B); анизотропии триптофановой флуоресценции (панель Г); эллиптичности при λ =222 нм (панель Д); интенсивности светорассеяния (панель E) от концентрации GdnHCl. *Красные* символы – денатурация, *синие* символы – ренатурация.

В структуре NIR FPs можно выделить две особенности, которые могут приводить к необратимости процесса денатурации: наличие ковалентно связанного с полипептидной цепью белка хромофора и узла, образованного аминокислотной последовательностью (Рис. 2). Долгое время считалось, что узлы в принципе не могут присутствовать в нативной структуре белка. К настоящему времени, однако, известно уже несколько сот белковых структур, имеющих узлы (около 1% всех белковых структур, имеющихся в Банке белковых структур). Сравнение вероятности возникновения узла в белках и в синтетических полимерах свидетельствует о том, что возникновение узла в белках почему-то явно невыгодно. В каких случаях и почему возможно исключение – фундаментальный вопрос, стоящий перед исследователями. Число работ, посвященных этой проблеме, невелико, и практически все эти работы являются теоретическими.

Бактериальные фитохромы содержат узел с четырьмя пересечениями аминокислотной цепи, который называют узлом типа восьмерки (Рис.2, Степаненко и др., 2015). Узел образован N-концевой последовательностью, входящей в PAS домен, и петлей GAF домена [12,13]. Узел содержит два остатка, которые высоко консервативны среди PAS-содержащих фитохромов, а именно



Рис. 2. Узел в структуре ближне-инфракрасного димерного белка iRFP713. А. Пространственная структура iRFP713 (4E04.pdb). Цветом выделены PAS (*сиреневый*) и GAF (*зеленый*) домены. Показана локализация BV, триптофановых остатков и узла. Б. Схематическое представление узла с четырьмя пересечениями типа «восьмерки», С. Взаимное расположение BV и узла в iRFP713 (4E04.pdb).

Ile35 и Gln36 [14]. Остаток Gln36 участвует в образовании водородной связи, что, как полагают, укрепляет узел. Тем не менее, функциональное значение узла в бактериальных фитохромах до сих пор не установлено. Предполагается, что узел бактериальных фитохромов минимизирует потери энергии при изомеризации хромофора в процессе фотопреобразования, влияет на эффективность конформационных изменений фотосенсорного модуля (образованного PAS, GAF и PHY доменами) при изомеризации хромофора, и (или) способствует эффективному связыванию хромофора [15, 16].

Чтобы выяснить, что же препятствует сворачиванию белка, были выполнены эксперименты по сворачиванию – разворачиванию iRFP713 в апоформе. Для этого в первую очередь белок был выделен и охарактеризован. Было установлено, что по данным электрофореза полученный белок имеет массу, соответствующую холобелку. Спектры Trp флуоресценции для холо- и апоформ iRFP совпадают. Это свидетельствует о том, что апобелок сохраняет вторичную и третичную структуру, присущую холоформе iRFP713 (Stepanenko et al, 2014).



Рис.3. Спектральные характеристики iRFP713 в апо- и холоформах, а также свободного биливердина в водном растворе. А. Спектры поглощения ВV. Б. Спектры КД в ближней ИК области спектра. 1 и 2 – холоформа и апоформа iRFP713, 3 – свободный BV в водном растворе.

Как и следовало ожидать, белок не имеет пиков поглощения и сигнала КД в видимой области спектра, характерных для холобелка (Рис. 3). Введение в раствор ВV приводит к появлению характерного спектра поглощения и спектра КД в ближней области спектра (Рис. 3). Это свидетельствует о том, что апобелок способен связывать BV, т.е. он функционально активен (Stepanenko et al., 2014).

Эксперименты по микродиализу, показали что апоформа iRFP713 связывает BV в соотношении 1:1. Было показано, что денатурация апоформы iRFP713 полностью обратима (Рис. 4). Таким образом, обратимости процесса денатурации бактериальных фитохромов препятствует ковалентно связанный хромофор, а не наличие узла в структуре бактериальных фитохромов.

Аллостерическое влияние мономеров в димерных маркерах, созданных на основе бактериальных фитохромов

Для одновременной визуализации нескольких целевых белков в клетке необходимы маркеры с различными спектральными характеристиками. Ближне-инфракрасные маркеры, созданные на основе бактериальных фитохромов iRFP682 и iRFP670, имеют более высокий квантовый выход флуоресценции и более коротковолновые спектры поглощения и флуоресценции по сравнению с iRFP713. Анализ аминокислотной последовательности этих белков показал, что основной отличительной особенностью iRFP682 и iRFP670 по сравнению с дру-

гими маркерами, созданными на основе бактериальных фитохромов, является наличие Cys 256 в GAF доменах в дополнение к консервативному Cys 15 в PAS доменах этих белков.



Рис. 4 Денатурация – ренатурация апоформы iRFP713 под действием GdnHCl. Зависимость интенсивности триптофановой флуоресценции $\lambda_{per}=320$ нм и $\lambda_{возб}=295$ нм (панель A), эллиптичности при 220 нм (панель Б) ; параметра A(панель B), анизотропии триптофановой флуоресценции (панель Г) от концентрации GdnHCl. *Красные кривые* – денатурация, *синие кривые* – ренатурация.

С целью выяснения факторов, определяющих существенное различие спектральных свойств этих белков (iRFP682 и iRFP670) от iRFP713, были созданы мутантные формы димерных флуоресцентных белков iRFP670, iRFP682 и iRFP713, имеющие цистеиновые остатки как в PAS, так 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 (Stepanenko et al., 2015).

Бактерии, экспрессирующие любой из этих вариантов NIR FPs, были окрашены. Это свидетельствует о том, что все исследуемые формы NIR FPs способны эффективно связывать BV. Чтобы проверить, связывают ли белки, имеющие цистеиновые остатки хотя бы в одном из доменов, BV ковалентно, белки, разделенные с помощью SDS/PAGE в присутствии1мM ZnCl₂, были проанализированы с использованием системы гель-документирования ChemiDoc XRS (Puc.5).

Окрашивание цинком свидетельствует о ковалентном связывании BV с остатками цистеина. Варианты NIR FPs, содержащие только консервативные для BphPs остатки Cys15 в PAS доменах, как и следовало ожидать, связывают BV ковалентно, а варианты



Рис. 5 Электорофореграмма мутантных форм белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670, которые использовались в спектроскопических исследованиях.

Окрашивание с помощью Кумасси голубого (CB) и $ZnCl_2$ (Zn).

NIR FPs, не содержащие цистеиновых остатков Cys15 и Cys256, т.е. не способные связывать хромофор ковалентно, не окрашиваются цинком. Окрашивание цинком показало, что в белках, имеющих цистеиновые остатки как в PAS, так и в GAF доменах, BV связан ковалентно. Впервые было показано, что варианты NIR FPs, имеющие цистеиновые остатки Cys256 только в GAF доменах, также ковалентно связывают краситель. Таким образом, показано, что BV способен ковалентно взаимодействовать не только с каноническим Cys15 BphPs, но и с Cys256 в GAF доменах белков. Возможное объяснение наличия двух полос, обнаруженных в электрофореграммах всех мутантных форм с Cys15 и Cys256, будет дано после обсуждения фотофизических свойств этих белков.

Для всех полученных мутантных форм были измерены спектры поглощения и спектры флуоресценции (Рис.6). Было показано, что спектральные свойства определяется не столько принадлежностью к разным NIR FPs, сколько наличием и локализацией цистеиновых остатков в их PAS и (или) в GAF доменах. По спектральным свойствам мутантные варианты всех исследованных здесь NIR FPs можно разделить на четыре класса (Табл. 1, Рис. 6 и Рис. 7): 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. Оказалось, что мутантные формы, содержащие цистеиновые остатки, способные связывать BV только в PAS доменах (Cys15), имеют наиболее длинноволновые спектры поглощения и флуоресценции. Белки, не содержащие цистеиновых остатков, способных связывать BV, также способны образовывать с BV флуоресцирующие комплексы. Спектры этих белков сходны по форме со спектрами белков, содержащих цистеиновые остатки только в PAS доменах, хотя и сдвинуты в коротковолновую область на 4-7 и 1-3 нм, соответственно.



Рис. 6. 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.

Все мутантные формы, содержащие цистеиновые остатки в GAF домене (Cys256) вне зависимости от того, имеются ли цистеиновые остатки в PAS доменах (Cys15) или белки содержат цистеиновые остатки только в GAF доменах, имеют более коротковолновые спектры поглощения и флуоресценции (Рис. 6). Различие спектров поглощения и флуоресценции ВV, ковалентно связанного с Cys256 и Cys15 [17], обусловлено тем, что система сопряженных *π*связей BV, связанного с Cys256, меньше, чем для BV, связанного с Cys15.

Можно было бы предположить, что NIR FPs, имеющие в своем составе только Cys256, будут иметь более узкие спектры поглощения и флуоресценции по сравнению с NIR FPs, содержащими кроме Cys256 еще и Cys15. Однако оказалось, что наиболее узкие спектры поглощения и флуоресценции имеют белки, в состав которых входят два цистеиновых остатка (Cys15 и Cys256). В белках, содержащих только остатки Cys256 в GAF доменах, в спектрах поглощения и флуоресценции присутствует явно выраженное длинноволновое плечо, соответствующее максимуму спектров BV, связанного с Cys15 или не связанного ковалентно с белком. Поскольку Cys15 в этих белках нет, было сделано предположение, что длинноволновое плечо в спектрах поглощения и флуоресценции обусловлено хромофором, нековалентно связанным со вторым мономером. На Рис. 7 представлена схема, дающая представление о взаимодействии биливердина с различными мутантными формами NIR FPs в зависимости от локализации цистеиновых остатков. Предположение о присутствии в мутантных формах с одним цистеиновым остатком Cys256 нековалентно связанных молекул BV было подтверждено при изучении изменения спектральных свойств мутантных форм iRFP713, iRFP682 и iRFP670 под действием GdnHCl.



n – число молекул BV, ковалентно присоединенных к NIR FPs

- Суз 15 или Суз 256
- Ser 15 или Ser 256

ВV, встроенный в карман GAF домена, но не связанный ковалентно или связанный ковалентно с Cys 15 NIR FPs; имеет длинноволновые полосы поглощения и флуоресценции

ВV, встроенный в карман GAF домена и ковалентно связанный с Cys 256 NIR FPs; имеет коротковолновые полосы поглощения и флуоресценции, более высокий квантовый выход по сравнению с BV, связанным с Cys 15 или не связанным ковалентно



На Рис.8, для примера, представлены зависимости оптической плотности от концентрации денатуранта, измеренные в максимуме поглощения и на длинноволновом краю спектра поглощения (где вносит существенный вклад несвязанный ковалентно BV) для мутантных вариантов iRFP682. Очевидно, что эти зависимости существенно различаются. В мутантных формах, 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. 8, Б), 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 цистеиновых остатков, способных связывать BV (Рис. 8, А). Диссоциация хромофора происходит уже при малых концентрациях денатуранта, когда структура белка еще сохраняется. В то же время зависимости оптической плотности, зарегистрированные в максимуме спектра поглощения, практически совпадают с зависимостью содержания нативного белка, определенной по эллиптичности при 222 нм



Рис.8. Аллостерическое влияние связывания BV в одном мономере iRFP682/ C15S на связывание BV со вторым мономером.

А и Б – спектры поглощения варианта iRFP682, не имеющего цистеиновых остатков, способных связывать BV (iRFP682/C15S/C256S), и имеющего один цистеиновый остаток (iRFP682/C15S), измеренные в растворах с различной концентрацией GdnHCl. В и Г – зависимости оптической плотности белков от концентрации GdnHCl, измеренные при различных длинах волн. Длина волны отображена на левых панелях вертикальными штриховыми линиями соответствующего цвета. F_N – доля нативного белка, рассчитанная на основании измерений эллиптичности при 222 нм.

(Рис. 8, Б). Полученные данные свидетельствуют о присутствии в этих белках двух форм хромофора.

Эти данные показывают, что связывание BV с одним из мономеров димерных NIR FPs, имеющих только Cys256, аллостерически препятствует ковалентному связыванию BV с Cys256 второго мономера. Поэтому в кармане второго мономера оказывается BV, не связанный химически с цистеиновыми остатками белка, что приводит к уширению спектров поглощения и флуоресценции белков, содержащих только Cys256.



Рис.9. Аллостерическое влияние связывания BV в одном мономере iRFP682/ C256S на связывание BV со вторым мономером. Спектры поглощения вариантов iRFP682, iRFP713 и iRFP670, имеющих цистеиновые остатки (Cys 15) только в PAS доменах. Обозначения как на Рис. 8.

В случае NIR FPs, имеющих как Cys256 так и Cys15, наличие Cys15 оказывает существенное влияние на структуру GAF доменов, так что в этом случае BV связывается с Cys256 в GAF доменах обоих мономеров. NIR FP с двумя Cys остатками имеют наиболее узкие спектры поглощения и флуоресценции, т.е. они спектрально гомогенны. Более того, суммарная яркость двух полос при окрашивании $ZnCl_2$ оказалась в два раза больше по сравнению с полосой, отвечающей NIR FP с цистеиновым остатком только в GAF доменах. Две полосы на электорофореграммах можно объяснить тем, что структура NIR FP с двумя Cys остатками, которая способствует преодолению аллостерического эффекта связывания BV со вторым мономером димерного белка, проявляется также в том, что становится доступен некоторый ранее скрытый протеолитический сайт. Можно предположить, что разрыв полипептидной цепи не нарушает нативную структуру белка, но проявляется при денатурации. Присутствие второй полосы на электрофореграмме NIR FP с двумя Cys остатками станет предметом последующих исследований.

Локализа- ция остат- ков Cys, способных связывать BV	NIR FP	Мак- симум погло- ще- ния (нм)	FWHM спектра погло- щения (нм)	Мак- симум флуо- рес- ценции (нм)	FWHM спектра флуо- рес- ценции (нм)	Коэффи- циент экстинк- ции (М ⁻¹ см ⁻¹)	Квантовый выход флуорес- ценции (%)	Молеку- лярная яркость (%)	Эффек- тивная яркость в клетках млекопи- тающих (%)
Cys15 в 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 Суѕ в положении 15 и 256 (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 в 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 в PAS и Cys256 в 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

Таблица 1. Фотофизические свойства NIR FPs с различной локализацией цистеиновых остатков, способных связывать BV

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

Поскольку спектральные характеристики BV, связанного ковалентно с Cys15, и BV, встроенного в карман, но не связанного ковалентно, очень близки, нельзя исключить того, что аллостерический эффект присутствует и в случае NIR FPs, содержащих цистеиновые остатки только в PAS доменах. Дать ответ на этот вопрос позволило изучение зависимости оптической плотности от концентрации GdnHCl. Оказалось, что в случае мутантной формы iRFP682 (iRFP682/C256S), в отличие от iRFP713 и iRFP670/C256S, также имеющих только Cys15, изменение оптической плотности с увеличением концентрации GdnHCl, измеренное в максимуме и на длинноволновом краю, не совпадает. Таким образом, для iRFP682/C256S так же, как для мутантных форм, содержащих только Cys256, наблюдается аллостерический эффект – ковалентное связывание BV в одном домене препятствует ковалентному связыванию BV в другом мономере (Рис. 9, 7).

Все полученные спектральные характеристики сведены в Таблицу 1. Как и следовало ожидать белки, не содержащие цистеиновых остатков, способных ковалентно связывать BV, имеют самый низкий кантовый выход флуоресценции. Самый высокий квантовый выход флуоресценции имеют белки, содержащие как Cys15, так и Cys256. Белки с BV, ковалентно связанным с цистеиновыми остатками в PAS домене, имеют промежуточное значение квантового выхода флуоресценции. Важным результатом проведенных исследований явилось создание варианта iRFP713/V256C, имеющего самый высокий квантовый выход флуоресценции среди всех существующих в настоящее время маркеров на основе BphPs.

выводы

- 1. Наличие узла в структуре белка не препятствует эффективному рефолдингу iRFP713.
- 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. ВV, 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/V256С имеет самый высокий из всех созданных на сегодняшний день NIR FPs квантовый выход и яркость флуоресценции *in vivo* и *in vitro*.
- Связывание BV с цистеиновым остатком одного из мономеров димерных белков iRFP713, iRFP682 и iRFP670 аллостерически влияет на связывание BV с цистеиновым остатком второго мономера.

 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 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.
- 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.
- 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; supl. 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 schoolseminar "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 ближнеинфракрасного 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.
- 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.

- 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 fold-ing. 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.
- 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.
- 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.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Filonov G.S., Piatkevich K.D., Ting L.M., Zhang J., Kim K., Verkhusha V.V. 2011. Nat. Biotechnol. 29, 757–761.
- 2. Laemmli U.K. 1970. Nature 227, 680–685.
- 3. McDonagh A.F., Palma L.A. 1980. Biochem J. 189, 193–208.
- 4. Bellini D., Papiz M.Z. 2012. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 68, 1058–1066.
- 5. Turoverov K.K., Kuznetsova I.M., Zaitsev V.N. 1985. Biophys Chem 23, 79-89.
- 6. Kuznetsova I.M., Yakusheva T.A., Turoverov K.K. 1999. FEBS Lett 452, 205–210.
- 7. Kuznetsova I.M., Stepanenko O.V., Turoverov K.K., Staiano M., Scognamiglio V., Rossi M., D'Auria S. 2005. J Proteome Res 4, 417–423.
- 8. Giordano A., Russo C., Raia C.A., Kuznetsova I.M., Stepanenko O.V., Turoverov K.K. 2004. J Proteome Res 3, 613–620.
- 9. Turoverov K.K., Biktashev A.G., Dorofeiuk A.V., Kuznetsova I.M. 1998. Tsitologiia 40, 806–817.
- 10. Turoverov K.K., Kuznetsova I.M. 2003. J. Fluoresc. 13, 41–57.
- 11. Stepanenko O.V., Kuznetsova I.M., Turoverov K.K., Huang C., Wang C.C. 2004. Biochemistry 43, 5296–5303.
- 12. Essen L.O., Mailliet J., Hughes J. 2008. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 14709–14714.
- 13. Yang X., Kuk J., Moffat K. 2008. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 14715–14720.
- 14. Wagner J.R., Zhang J., von Stetten D., Gunther M., Murgida D.H., Mroginski M.A., Walker J.M., Forest K.T., Hildebrandt P., Vierstra R.D. 2008. J. Biol. Chem. 283, 12212–12226.
- 15. Wagner J.R., Brunzelle J.S., Forest K.T., Vierstra R.D. 2005. Nature 438, 325–331.
- Bornschlogl T., Anstrom D.M., Mey E., Dzubiella J., Rief M., Forest K.T. 2009. Biophys J. 96, 1508–1514.
- 17. Shcherbakova D.M., Baloban M., Pletnev S., Malashkevich V.N., Xiao H., Dauter Z. and Verkhusha V.V. 2015. Chem. Biol. 22, 1540-1551