

ПОЛУЧЕНИЕ БЛИЖНЕИНФРАКРАСНОГО ОДНОДОМЕННОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА GAF-FP НА ОСНОВЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ФИТОХРОМА

© К. А. Румянцев,^{1,2} Д. М. Щербакова,² Н. И. Захарова,²
В. В. Верхуша,² К. К. Туроверов^{1,*}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

² Департамент анатомии и структурной биологии,
Колледж медицины им. Альберта Эйнштейна, Нью-Йорк, 10461, США;

* электронный адрес: kkt@incras.ru

Флуоресцентные белки (FP) широко применяются в качестве генетически кодируемых маркеров для количественного и неинвазивного исследования биологических процессов. Разработка биомаркеров, флуоресцирующих в ближнем инфракрасном спектральном диапазоне, позволяет изучать ткани животных на более глубоком уровне, поскольку они наиболее проницаемы для света этого диапазона длин волн, чем для света видимого диапазона. Для широкого применения FP важны такие свойства, как низкая молекулярная масса и мономерность. В настоящей работе на основе хромофоросвязывающего домена бактериального фитохрома (VrhP) *Rhodospseudomonas palustris* (RpVrhP1) нам удалось получить FP, названный GAF-FP, с мол. массой ~19 кДа, в 2 раза меньшей, чем у других FP на основе VrhP, и в 1.4 раза меньше, чем у широко применяемых GFP-подобных белков, флуоресцирующих в ближнеинфракрасном диапазоне. В отличие от большинства других ближнеинфракрасных FP GAF-FP является мономером, обладает высокой фотостабильностью, его структура устойчива к внесению малых пептидных вставок. Более того, GAF-FP способен ковалентно присоединять два различных тетрапиррольных хромофора — фикоцианобилин (PCB) и биливердин (BV), который содержится в тканях млекопитающих. GAF-FP с присоединенным BV в качестве хромофора (GAF-FP—BV) имеет основную полосу поглощения с максимумом при 635 нм. Максимум флуоресценции приходится на 670 нм, благодаря чему GAF-FP имеет высокое соотношение сигнала флуоресценции к фоновому сигналу, если даже FP локализован на глубине нескольких миллиметров под поверхностью ткани. Помимо ближнеинфракрасной полосы поглощения GAF-FP—BV имеет также полосу поглощения в фиолетовой области спектра с максимумом при 378 нм. Это свойство было использовано нами для создания химерного белка, состоящего из модифицированной люциферазы *Renilla reniformis* (RLuc8) и GAF-FP. Мы показали, что в созданном белке слияния возможен резонансный перенос энергии от субстрата, возбужденное состояние которого возникает при его окислении люциферазой, к хромофору GAF-FP—BV. В отсутствие акцептора энергии RLuc8 катализирует расщепление субстрата с излучением света с максимумом при 400 нм. В то же время в составе химерного белка GAF-FP—RLuc8 энергия от субстрата передается на хромофор FP и затем излучается в ближнем инфракрасном диапазоне, соответствующем спектру флуоресценции GAF-FP. Полученные результаты открывают путь для создания новых малых ближнеинфракрасных FP на основе различных природных VrhP с перспективой их широкого применения в клеточной и молекулярной биологии.

Ключевые слова: мономерность, флуоресцентные белки, фитохромы, биолюминесценция.

Принятые сокращения: VrhP — бактериальный фитохром, BV — биливердин IX α , PCB — фикоцианобилин, FP — флуоресцентный белок, GFP — зеленый флуоресцентный белок, RLuc8 — люцифераза *Renilla reniformis*.

Большая потребность в генетически кодируемых ближнеинфракрасных флуоресцентных маркерах для неинвазивного исследования метаболических процессов в тканях животных существенно расширила область создания новых флуоресцентных белков (FP) на основе бактериальных фитохромов (VrhP) (Shcherbakova, Shemetov et al., 2015). Особенности ближнего инфракрасного излучения являются его способность проникать в ткани животных на большую глубину, чем у света с длиной волны

меньше 600 нм, а также меньшая подверженность светорассеянию. В свою очередь VrhP являются наиболее подходящей основой для создания ближнеинфракрасных FP, поскольку их естественный спектр поглощения сдвинут в ближнеинфракрасную область, а хромофор, продукт метаболизма гема, биливердин IX α (BV), всегда имеется в достаточном количестве в клетках млекопитающих (Piatkevich et al., 2013a). VrhP уже послужили основой для создания ближнеинфракрасных FP (Shu et al., 2009; Filonov

et al., 2011; Auldridge et al., 2012; Shcherbakova, Verkhusha, 2013; Bhattacharya et al., 2014; Yu et al., 2014), фотопереключаемых ближнеинфракрасных FP (Piatkevich et al., 2013) и ближнеинфракрасных маркеров белок-белковых взаимодействий (Filonov, Verkhusha, 2013; Chen et al., 2015).

Несмотря на преимущества спектральных характеристик ближнеинфракрасных FP, созданных на основе BphP, эти белки имеют тенденцию к образованию димеров и обладают примерно на 40 % большей молекулярной массой по сравнению с GFP-подобными FP. Эти недостатки обусловлены свойствами природных BphP, таких как наличие нескольких доменов и структуры типа узел, а также способности к образованию гомодимеров (Bhoo et al., 2001; Rockwell, Lagarias, 2010). Для связывания хромофора BphP необходимы домены PAS (PER/ARNT/Sim) и GAF (cGMPphosphodiesterase/Adenyl cyclase/FhlA). PAS-домен содержит консервативный остаток цистеина, который ковалентно связывает BV; домен GAF имеет «карман», в который может встраиваться BV. Междоменные взаимодействия усилены узлом, в который входят 35 остатков N-концевой части домена PAS и остатки 225—257 домена GAF (Stepanenko, Bublikov et al., 2014). Эти структурные особенности BphP препятствуют уменьшению размеров ближнеинфракрасных FP, основанных на BphP, что сужало их потенциальные возможности для применения в качестве биомаркеров.

Цианобактериохромы, подкласс фоторецепторов, относящихся к фитохромам, способны автокаталитически связывать тетрапиррольный хромофор фикоцианобилин (PCB) при участии только домена GAF (Lamparter, 2004; Fischer et al., 2005). Кроме того, было показано, что некоторые цианобактериохромы способны флуоресцировать в связи с PCB (Zhang et al., 2010; Rockwell et al., 2012; Narikawa et al., 2015), а один из них — AM1_1557g2 — способен связывать как PCB, так и BV (Narikawa et al., 2015).

Основываясь на этих данных, мы предположили, что, переместив цистеиновый остаток с N-концевого участка PAS-домена BphP в его GAF-домен, мы сможем объединить ковалентное и стерическое связывание BV в кармане этого домена. Таким образом, целью настоящего исследования стало создание малого мономерного ближнеинфракрасного FP на основе GAF-домена *RpBPhP1*, грамотрицательной пурпурной несерной бактерии *Rhodospseudomonas palustris*.

Материал и методика

Мутагенез и отбор клонов из бактериальных библиотек мутантов белка. Амплифицированные фрагменты, кодирующие PAS- и GAF-домены *RpBPhP1* (первые 315 аминокислот) или только домен GAF, были встроены в вектор *pBAD/HisB* (Life Technologies/Invitrogen, США). Направленный мутагенез проводили с использованием набора QuikChangeMutagenesisKit (Stratagene, США). Случайный мутагенез проводили с использованием GeneMorphII Random Mutagenesis Kit (Stratagene, США) в таких условиях, чтобы на 1000 нуклеотидов приходилось 16 мутаций. Полученная таким образом мутантная ДНК была использована для трансформации клеток *Escherichia coli* путем электропорации. В настоящей работе использовали штамм LMG194, содержащий плазмиды *pWA23h* (Shcherbakova, Verkhusha, 2013) или

pL-PCB (Gambetta, Lagarias, 2001), обеспечивающие синтез BV или PCB соответственно.

Библиотека мутантной ДНК в среднем включала в себя 10^6 — 10^8 клонов. Бактериальные клетки наращивали в течение ночи при 37 °C в среде RM (Fisher Scientific, США), содержащей ампицилин и канамицин. Поле индукции экспрессии белков добавлением арабинозы и рамнозы до 0.004 и 0.04 % соответственно клетки культивировали в течение 6—8 ч. При дальнейшем культивировании температуру последовательно снижали сначала до 30 °C на 10—12 ч, затем до 18 °C еще на 24 ч. Перед отбором клонов (с наиболее яркой флуоресценцией) с помощью клеточного сортера MoFlo XDP, укомплектованного аргоновым, криптоновым и гелий-неоновым газовыми лазерами (Beckman Coulter, США), бактериальные клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором и разводили до достижения оптической плотности 0.03 ед. при длине волны 600 нм. Для отбора необходимого количества положительных клонов анализировали количество клеток, соответствующее десяти размерам библиотеки, при возбуждении светом с длиной волны 633 нм и регистрации флуоресценции с использованием фильтра, пропускающего свет с длиной волны более 647 нм.

Наиболее яркие клетки собирали в обогащенную среду SOC (Fisher Scientific, США) и инкубировали при 30 °C в течение 1 ч, после чего рассеивали на чашки Петри, содержащие агаризованную среду LB (Fisher Scientific, США), ампицилин, канамицин, 0.004 % арабинозы и 0.04 % рамнозы, и культивировали в течение ночи при 37 °C и еще 24 ч при 18 °C. Колонии бактерий анализировали с использованием флуоресцентного стереомикроскопа MZ16F (Leica, США), оснащенного фильтрами 605/40 и 650/45 нм в канале возбуждения флуоресценции, и фильтрами, пропускающими свет с длиной волны более 640 или 690 нм, в канале регистрации флуоресценции (Chroma, США), а также ПЗС-камерой. На основе анализа яркости отбирали ~30—50 клонов из каждой библиотеки, а их плазмидную ДНК секвенировали. Смесь плазмид наиболее ярких из отобранных мутантов использовали для следующего раунда мутагенеза.

Спектральные и физико-химические свойства бактериальных клеток-продуцентов мутантных форм GAF-FP. Бактериальные клетки культивировали в среде RM (Fisher Scientific, США), содержащей ампицилин, канамицин, 0.004 % арабинозы и 0.02 % рамнозы, в течение 6—8 ч при 37 °C, затем в течение 10—12 ч при 30 °C и еще 24 ч при 18 °C. Фотообесцвечивание бактерий осуществляли с помощью инвертированного эпифлуоресцентного микроскопа IX81 (Olympus, США), оснащенного металлогалогенной лампой мощностью 200 Вт (Prior, США), иммерсионным объективом 1.4 NA с увеличением 100× (UPlanSApo, Olympus) и набором фильтров для возбуждения (605/40 нм) и эмиссии (фильтр, пропускающий свет с длиной волны более 640 нм) флуоресценции (Chroma, США). Интенсивность флуоресценции рассчитывали с учетом коэффициента пропускания фильтра, используемого для возбуждения флуоресценции, коэффициентов экстинкции флуоресцентных белков и перекрытия их спектров поглощения со спектром металлогалогенной лампы. GAF-FP и его мутанты, содержащие полигистидиновый N-пептид, экспрессировали в клетках штамма LMG194 *E. coli*, содержащих плазмиды *pWA23h* или *pL-PCB*.

Биохимическая характеристика клеточ-продуктов мутантных форм GAF-FP. Для исследования скорости созревания флуоресцентных белков клетки LMG194, содержащие исследуемый флуоресцентный белок, закодированный в плазмиде *pBAD/HisB* (GAF-FP или iRFP670), и плазмиды *pWA23h* или *pPL-PCB*, инкубировали в среде RM в течение ночи при 37 °C. На следующие сутки в среду добавляли рамнозу до концентрации 0.2 % на 2 ч, после чего добавляли арабинозу до концентрации 0.002 % еще на 1 ч. После этого клетки отмывали от арабинозы и продолжали культивировать в среде RM, содержащей 0.2 % рамнозы, при 37 °C. Затем через равные интервалы времени оценивали интенсивность флуоресценции равных аликвот клеточной суспензии, разведенных до оптической плотности 0.2 ед., при длине волны 600 нм. Полученные значения интенсивности флуоресценции рассчитаны с учетом степени разведения образцов. При экспрессии флуоресцентного белка EGFP клетки LMG194 не содержали плазмид для синтеза тетрапирролов.

Связывание тетрапирролов с FP анализировали путем регистрации цинкиндуцируемой флуоресценции комплекса белка с хромофором в полиакриламидном геле после электрофореза по Лэммли. Для оценки связывания хромофора с GAF-FP его экспрессировали без индукции синтеза тетрапирролов. Дальнейшую работу с очищенным апобелком мы проводили по описанному ранее протоколу (Wagner et al., 2007). Холобелок получали *in vitro* посредством инкубации апобелка с 10-кратным избытком BV, PCB или их смеси в различных пропорциях. На основе измеренных спектров поглощения растворов холобелка после инкубации мы оценивали эффективность связывания BV относительно PCB. Для каждой смеси холобелка с BV- и PCB-хромофорами определяли оптическую плотность при длине волны, отвечающей длинноволновому максимуму поглощения хромофора (Abs). На основе этих данных (Abs_{BV}/Abs_{PCB}) определяли вклад каждой из холоформ GAF-FP, связанной с BV или PCB. Соотношения между формами холобелка для каждого раствора были нормализованы путем вычитания величины, соответствующей образцу, содержащему 100 % PCB. Таким образом, образец со 100 % PCB принимали за 0, а образец со 100 % BV — за 100.

Для проведения гель-фильтрации 2 мл очищенного GAF-FP—BV были внесены в хроматографическую колонку HiLoad 16/600 Superdex 200 (GE Healthcare, США), уравновешенную буферным раствором, содержащим 10 mM HEPES, pH 7.4, 50 мкМ ЭДТА, 10 % глицерина, 150 mM NaCl, 1 mM ДТТ, 0.2 mM фенилметансульфонилфторида, 0.01 % детергента EP—40 и 0.2 mM бензодиазепина. Хроматографию проводили при скорости потока в колонке 1 мл/мин. Колонку для гель-фильтрации калибровали с использованием набора стандартов (Bio-Rad, США).

Изучение анаэробного созревания флуоресцентных белков проводили в бактериальных клетках LMG194, содержащих исследуемый FP в плазмиде *pBAD/HisB*, а также одну из плазмид для синтеза тетрапирролов. Штрихи бактерий на чашках Петри с агаризованной средой LB, содержащей ампицилин, канамицин и 0.02 % рамнозы, культивировали в течение ночи при 37 °C. Далее после опрыскивания бактерий 200 мкл 20%-ного раствора арабинозы чашки Петри помещали в камеру с анаэробными условиями (Mitsubishi gas chemical, Япония) на 24 ч при 37 °C. Затем измеряли флуоресценцию бактерий с ис-

пользованием эпифлуоресцентного микроскопа MZ16F (Leica, США), оснащенного фильтрами 480/40, 570/30 и 605/40 нм в канале возбуждения флуоресценции, а также фильтрами 530/40 и 615/40 нм и фильтрами, пропускающими свет с длиной волны более 640 или 690 нм, в канале регистрации флуоресценции (Chroma, США). Незамедлительно после выполнения анализа чашки Петри с клетками помещали в термостат на 24 ч при 4 °C в присутствии кислорода. В течение этого времени синтезированный за время анаэробной инкубации FP имел возможность присоединить хромофор, однако синтез нового белка был значительно замедлен. После культивирования при 4 °C колонии на чашках Петри снова анализировали. Окончательный уровень флуоресценции бактерий принимали за 100 %. При экспрессии флуоресцентных белков EGFP или mCherry клетки LMG194 не содержали плазмид для синтеза тетрапирролов. Все количественные измерения на основе изображений проводили с использованием программы ImageJ (Schneider et al., 2012).

Экспрессия GAF-FP в клетках животных. Амплифицированные фрагменты, кодирующие GAF-FP и флуоресцентный белок sfGFP (Pedelacq et al., 2006), были вставлены в вектор *pEGFP-N1* (Clontech, США) вместо гена, кодирующего EGFP. Клетки линии HeLa росли на среде Игла, модифицированной Дульбекко и содержащей 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 0.5 % пенициллина, 0.5 % стрептомицина и 2 mM глутамина (Life Technologies/Invitrogen, США). Для эпифлуоресцентной микроскопии клетки культивировали в 35-миллиметровых чашках Петри со стеклянным доньшком (MatTek, США). Трансфекцию плазмид осуществляли при помощи реагента Effectene (Qiagen, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. При необходимости в среду к клеткам добавляли растворы тетрапирролов в диметилсульфоксиде (конечная концентрация 10 мкМ) за 24 ч до проведения имиджинга.

Проточная цитометрия. Анализ клеток методом проточной цитофлуориметрии проводили с использованием проточного цитометра LSR II (BD Biosciences, США). Клетки линии HeLa, трансфицированные плазмидой *pGAF-FP—sfGFP-N1*, анализировали по зеленой и ближнеинфракрасной флуоресценции. Флуоресценцию возбуждали аргоновым и гелий-неоновым лазерами с длинами волн 488 и 640 нм соответственно. Флуоресценцию детектировали в каналах с фильтром 530/40 нм и с фильтром, пропускающим свет с длиной волны более 670 нм. Средние значения яркости клеток были получены при помощи программы FCS express (DeNovo Software, США).

Эпифлуоресцентную микроскопию живых клеток линии HeLa проводили через 24 ч после трансфекции. Имиджинг клеток проводили при помощи эпифлуоресцентного микроскопа IX81 (Olympus, США), который использовали для фотообесцвечивания бактериальных клеток. Для измерения зеленой флуоресценции использовали набор фильтров для возбуждения и для эмиссии флуоресценции 480/40 и 535/40 нм соответственно (Chroma, США). Для управления микроскопом использовали программу SlideBook (Intelligent Imaging Innovations, США).

Создание химерных белков. Амплифицированные фрагменты, кодирующие GAF-FP и модифицированную люциферазу *Renilla reniformis* (RLuc8) (Saito et al., 2012), были встроены в вектор *pBAD/HisB* (Life Technologies/Invitrogen, США). Линкер между белками состоял из 2 (-GT), 7 (-GGGSGT-) или 14 (-GGGSGT-

GGGGSGG-) аминокислотных остатков. Аминокислотная последовательность линкера была выбрана таким образом, чтобы обеспечить его гидрофильность и подвижность. В вектор *pBAD/HisB* встроили также амплифицированный фрагмент, кодирующий RLuc8.

Для сравнения яркости ближнеинфракрасной биолюминесценции химерных конструкторов мы культивировали клетки LMG194 в среде RM, содержащей ампицилин, канамицин, 0.004 % арабинозы и 0.04 % рамнозы, в течение ночи при 37 °C. Измерения проводили в биолюминесцентном режиме IVIS Spectrum (PerkinElmer, США). Для индукции биолюминесценции 200 мкл бактериальной суспензии смешивали раствором субстрата (диметокси-коэ-лентеразин) до его конечной концентрации 50 мкМ согласно рекомендациям фирмы-производителя (NanoLight Technologies, США).

Измерения в мышинном фантоме по описанному ранее методу (Shcherbakova, Verkhusha, 2013). Рекомбинантную RLuc8 экспрессировали в бактериальных клетках штамма LMG194 и очищали методом аффинной хроматографии на никель-агарозе (Qiagen, США). Очищенные химерный белок, GAF-FP или RLuc8 разводили до концентрации 8 мкМ, рассчитанной по коэффициентам экстинкции хромофоров в максимуме спектра поглощения или по поглощению при длине волны 280 нм. Далее 5 мкл раствора белка или их смеси смешивали с диметокси-коэлентеразином (NanoLight Technologies, США) до конечной концентрации 50 мкМ. Незамедлительно после смешивания субстрата и раствора белков образцы помещали в одну из двух полостей мышинного фантома XFM-2 (PerkinElmer/Caliper, США) и проводили имиджинг. Полости в мышинном фантоме располагались на расстояниях 7.0 и 18.1 мм от поверхности. Имиджинг проводили в биолюминесцентном и эпифлуоресцентном режимах системы IVIS Spectrum (PerkinElmer, США). Для получения изображений наилучшего качества мы тестировали различные комбинации фильтров возбуждения и регистрации флуоресценции или регистрации биолюминесценции в диапазоне от 500 до 750 нм. Мышиный фантом с образцом, содержащим только буферный раствор, использовали для определения автофлуоресценции. Все количественные измерения сигналов биолюминесценции и флуоресценции, а также математические операции с изображениями осуществляли с использованием программы Living Image (Perkin Elmer, США).

Результаты и обсуждение

Для создания однодоменного ближнеинфракрасного флуоресцентного белка на основе *RpVrhP1* мы применили направленную молекулярную эволюцию (рис. 1, а). В первую очередь мы подвергли направленному мутагенезу кодирующую последовательность GAF- и PAS-доменов *RpVrhP1* в позициях Asp200 и Ile201 (рис. 1, б). Эти аминокислоты входят в консервативную последовательность -197PXSDIP202- и располагаются в непосредственной близости от хромофора. Их замена препятствует фотоизомеризации хромофора и безызлучательной диссипации энергии, таким образом усиливая флуоресценцию белка (Toh et al., 2011; Auldridge et al., 2012; Shcherbakova, Verkhusha, 2013). Далее мы применили случайный мутагенез всей последовательности белка. Во время отбора наиболее ярких клонов в бактериальной библиотеке мутантов мы обнаружили вариант FP, наз-

ванный PAS-GAF-FP. Этот мутант был способен слабо флуоресцировать и в то же время обладал двумя аминокислотными заменами Cys19Ser и Ile252Cys. Мы предположили, что замена Cys19Ser привела к тому, что BV более не мог связываться ковалентно в PAS-доме и что, возможно, новый цистеин в положении 252 стал выполнять эту функцию. Наша гипотеза была основана на сходстве позиций нового аминокислотного остатка цистеина и хромофорсвязывающего остатка цистеина в доменах GAF фитохромов растений и цианобактерий, которые используют более восстановленные тетрапирролы (фитохромобилин и PCB) в качестве хромофоров (Rockwell, Lagarias, 2010).

Опираясь на эту гипотезу, мы предположили, что PAS-GAF-FP может быть укорочен до домена GAF. Однако удаление домена PAS привело к потере флуоресценции и стабильности, что проявлялось в образовании видимых агрегатов в растворах очищенного белка. Для того чтобы стабилизировать домен GAF с мутацией Ile252Cys, мы провели аминокислотное выравнивание его последовательности с GAF-доменами фитохромов цианобактерий. В качестве примера таких фитохромов можно привести GAF-домены *AnPixJ* (Narikawa et al., 2008) и *TePixJ* (Ishizuka, Narikawa et al., 2007), которые, как было показано, стабильны и способны ковалентно связывать PCB в качестве хромофора. Мы обратили внимание на то, что домены GAF этих цианобактериохромов не имели узла, характерного для бактериофитохромов, после чего удалили узел из GAF-домена с мутацией Ile252Cys (рис. 1, а).

В результате описанного процесса новая версия мутированного домена GAF, состоящая из аминокислотных остатков 122—224 и 247—315 *RpVrhP1*, была способна к слабой флуоресценции, так же как и PAS-GAF-FP. На данном этапе мы также внесли мономеризующие мутации в С-концевую часть белка (Shu et al., 2009; Auldridge et al., 2012) и провели случайный мутагенез. Помимо этого, мы снова применили направленный мутагенез позиций 200 и 201, а также добавили к ним позицию 178, мутации в которой встречались у более коротковолновых вариантов двухдоменных FP на основе бактериальных фитохромов (iRFP) (Shcherbakova, Verkhusha, 2013) (рис. 1, б). Из бактериальной библиотеки мутантов мы отобрали наиболее яркие мутанты и собрали все аминокислотные замены в одном белке. Ранее было показано, что подобный подход позволяет эффективно повысить стабильность FP (Shcherbakova, Verkhusha, 2013). Окончательный вариант нового FP был назван GAF-FP. Суммарно в процессе мутагенеза GAF-FP были заменены аминокислотные остатки в 25 позициях, что составляет около 15 % от количества аминокислотных остатков во всем белке. Более того, в GAF-FP отсутствует участок длиной в 22 аминокислотных остатка, которые составляли узел в GAF-доме *RpVrhP1*.

На основе сходства между GAF-FP и PCB-связывающими GAF-доменами цианобактериохромов (рис. 1, б) мы предположили, что GAF-FP также будет способен связывать как BV (хромофор бактериальных фитохромов), так и PCB (хромофор цианобактериохромов). Поскольку молекула PCB имеет на две двойные углеродные связи меньше, чем молекула BV (рис. 2, а), FP, связанные с PCB, обладают более коротковолновым спектром поглощения и флуоресценции.

Измеренные спектральные характеристики GAF-FP соответствовали спектральным характеристикам других

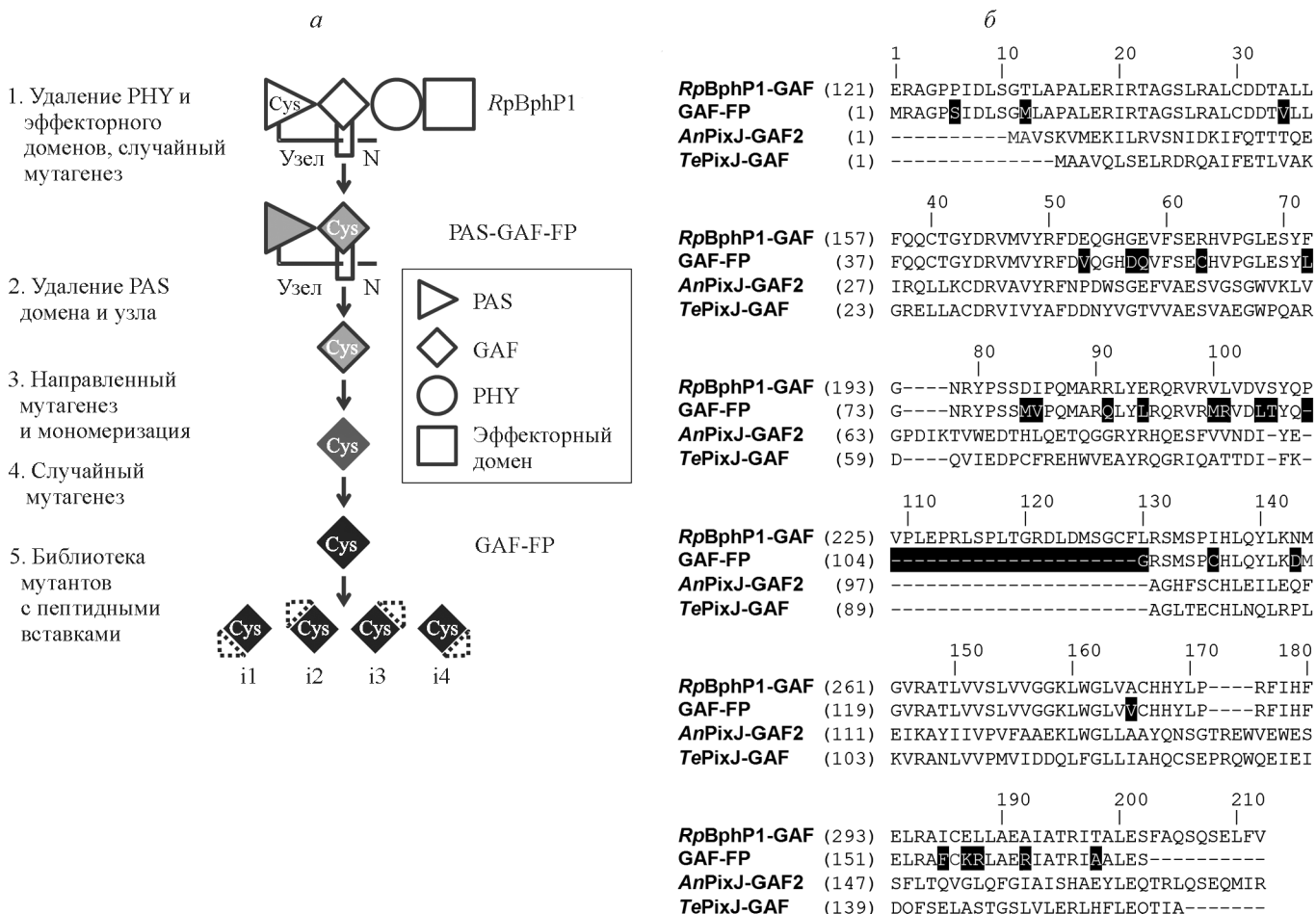


Рис. 1. Молекулярная эволюция ближнеинфракрасного флуоресцентного белка GAF-FP.

а — схематичное изображение направленной молекулярной эволюции *RpBphP1*, позволившей создать GAF-FP и его мутантные формы с пептидными вставками; интенсивность окраски участка схемы соответствует яркости флуоресценции соответствующего белка. *б* — выравнивание аминокислотных последовательностей GAF-FP, GAF-домена *RpBphP1*, а также GAF-доменов цианобактериохромов *AnPixJ* и *TePixJ*; аминокислотные остатки GAF-FP, которые были мутированы в процессе молекулярной эволюции, обозначены белым шрифтом на черном фоне. Нумерация приведена для *RpBphP1*.

ближнеинфракрасных FP, полученных на основе бактериальных фитохромов, что свидетельствовало о правильном встраивании обоих хромофоров (Shu et al., 2009; Filonov et al., 2011; Auldridge et al., 2012; Shcherbakova, Verkhusha, 2013; Bhattacharya et al., 2014; Yu et al., 2014). GAF-FP имеет две полосы поглощения в видимом диапазоне длин волн: в фиолетовой области с максимумами при 359 (GAF—PCB) и 379 (GAF—BV) нм, а также в ближнеинфракрасной области спектра с максимумами при 623 (GAF—PCB) и 637 (GAF—BV) нм (рис. 2, б). Спектры возбуждения флуоресценции соответствуют спектру поглощения белка GAF-FP и имеют максимумы при 625 и 635 нм для форм, связанных с PCB и BV соответственно. Спектры флуоресценции имеют Стоксов сдвиг порядка 35 нм и соответственно максимумы при 660 (GAF—PCB) и 670 (GAF—BV) нм (рис. 2, в). Молярные коэффициенты экстинкции GAF-FP в ближнеинфракрасной полосе поглощения составили 80 500 и 49 800 M⁻¹·см⁻¹ для форм, связанных с PCB и BV соответственно. Квантовый выход флуоресценции GAF—PCB составил 12 %, а GAF-FP—BV — 7 % (см. таблицу).

Для подтверждения ковалентного связывания хромофоров посредством нового аминокислотного остатка цис-

теина (Cys110, порядковый номер соответствует нумерации для GAF-FP) мы заменили этот аминокислотный остаток на серин. Полученный мутант экспрессировали в присутствии BV или PCB и после очистки проанализировали методом электрофореза белков в полиакриламидном геле по Лэммли наряду с исходным FP. Анализ цинкиндукции флуоресценции хромофоров в полиакриламидном геле не выявил присутствия хромофоров в полосе мутантного белка, подтвердив, таким образом, нашу гипотезу (рис. 2, г).

Для оценки различий в связывании хромофоров мы применили метод конкурентного связывания, который заключается в инкубации апоформы GAF-FP со смесью хромофоров в их различном соотношении при неизменной суммарной концентрации (соотношение BV и PCB в инкубационной смеси варьировали от 1 до 100). Соотношение между BV и PCB, связавшимися с белком, определяли спектрофотометрически по различию спектров поглощения GAF-FP—BV и GAF-FP—PCB. Как показано на рис. 2, б, спектры поглощения двух форм белка хорошо различимы, что позволяет оценить вклад каждой из них в общий спектр поглощения образца после инкубации. Построив зависимость содержания GAF-FP—BV от соотношения хромофоров в инкубационной смеси, мы

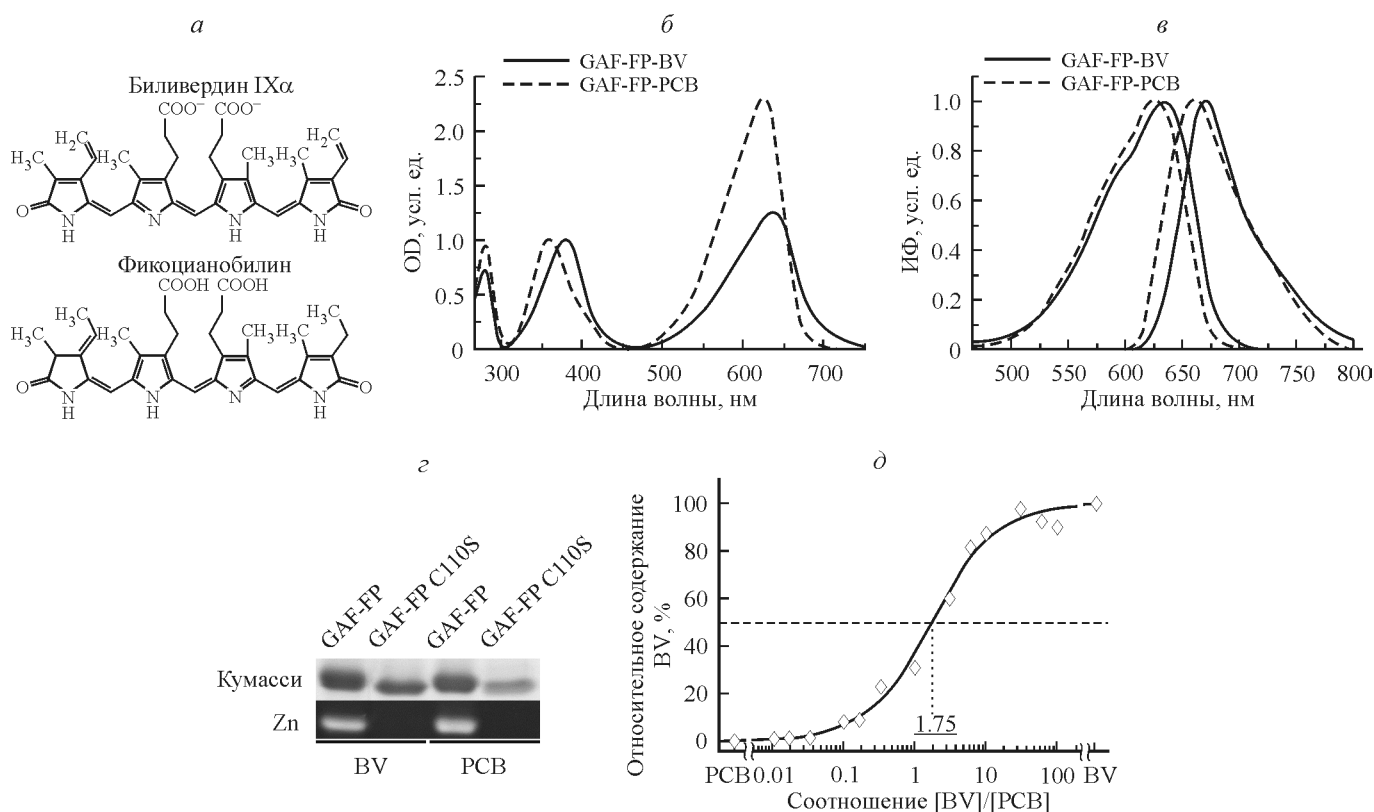


Рис. 2. Спектральные характеристики и связывание хромофоров с GAF-FP.

a — структурные формулы хромофоров GAF-FP — биливердина IXα (BV) и фикоцианобилина (PCB). *б* — спектр поглощения GAF-FP, связанного с BV или с PCB. *в* — спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции GAF-FP, связанного с BV или с PCB; *г* — электрофоретический анализ ковалентного связывания BV и PCB с GAF-FP и мутантом Cys110Ser белка GAF-FP; показаны изображения геля, окрашенные Кумасси бриллиантовым синим или демонстрирующие цинкиндукцированную флуоресценцию тетрапирролов. *д* — конкурентное связывание BV и PCB с апоформой GAF-FP. OD — оптическая плотность, ИФ — интенсивность флуоресценции.

определили, что апобелок связывает PCB в 1.75 раза эффективнее, чем BV (рис. 2, *д*).

Биохимические свойства GAF-FP. Анализ зависимости флуоресценции от величины pH раствора показал, что FP обладает двумя значениями pKa (рис. 3, *а*), соответствующими 4.0 и 7.8 для GAF-FP-BV и 4.6 и 8.3 для GAF-FP-PCB. Изменения pH не приводили к из-

менению формы спектров флуоресценции. Максимальной яркостью флуоресценции белок обладает при значении pH 6.0 (рис. 3, *б*), в то время как при физиологическом значении pH 7.2 GAF-FP-BV обладает 70%-ной яркостью флуоресценции от максимальной.

Мы также определили скорости созревания и встраивания хромофора для GAF-FP и двухдоменного ближне-

Характеристики GAF-FP и его мутантов, связанных с BV или с PCB

Флуоресцентный белок	$E_{x,max},^a$ нм	$E_{m,max},^b$ нм	$\epsilon,^в$ $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	QY, ^г %	Расчетная яркость, ^д %	$T_{1/2},^e$ ч	pKa ₁	pKa ₂	Измеренная яркость, ^ж %
GAF-FP—BV	635	670	49.800	7.3	100	4.0	4.0	7.8	100
GAF-FP i1 BV	635	670	45.650	5.7	72	4.1	4.8	8.1	58
GAF-FP i2 BV	635	670	52.300	6.5	94	3.7	4.7	8.1	111
GAF-FP i3 BV	635	670	49.600	6.2	85	5.4	4.7	8.0	56
GAF-FP i4 BV	635	670	47.400	5.5	72	5.1	4.6	7.8	60
GAF-FP—PCB	625	657	80.500	12.1	268	3.5	4.6	8.3	176
GAF-FP i1 PCB	625	657	66.500	12.4	227	3.0	4.4	9.1	111
GAF-FP i2 PCB	625	657	83.000	12.7	290	3.3	4.6	8.6	183
GAF-FP i3 PCB	625	657	81.500	12.8	287	4.4	4.7	8.2	55
GAF-FP i4 PCB	625	657	72.500	11.4	227	3.7	4.8	8.4	158

^a Максимум возбуждения флуоресценции; ^б максимум эмиссии флуоресценции; ^в коэффициент молярной экстинкции; ^г квантовый выход флуоресценции; ^д молекулярная яркость флуоресцентного белка, рассчитываемая как произведение квантового выхода и коэффициента молярной экстинкции; ^е время полусозревания при 37 °C; ^ж яркость флуоресцентного белка в клетках *E. coli*, определяемая как среднее значение яркости популяции клеток при анализе на проточном цитометре, выраженная в % относительно яркости клеток с GAF-FP-BV.

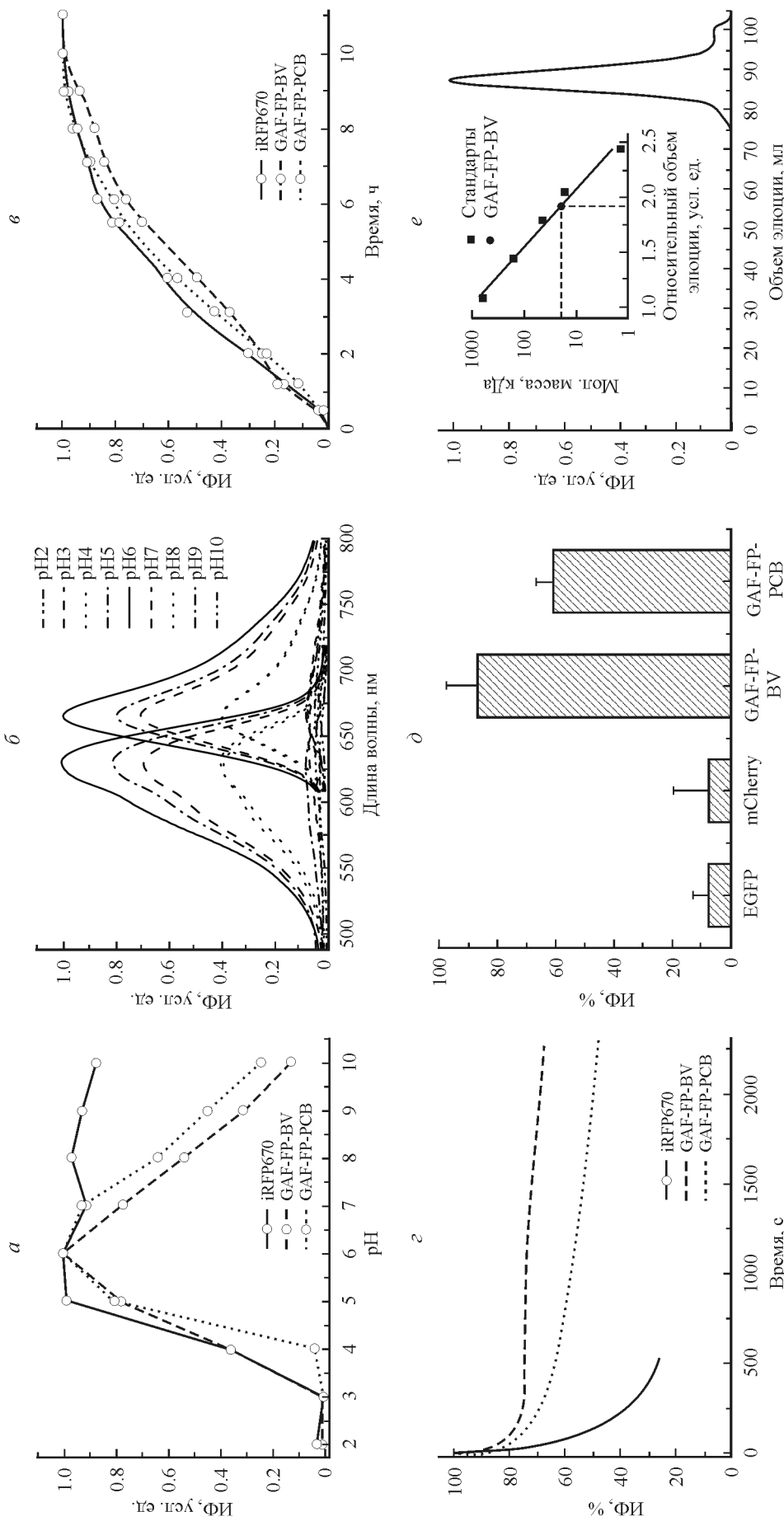


Рис. 3. Биохимические и физико-химические характеристики GAF-FP.

а — зависимость ИФ белка GAF-FP от величины pH в сравнении с iRFP670. *б* — pH-зависимость спектров возбуждения и эмиссии флуоресценции GAF-FP-BV. *в* — кинетика роста флуоресценции GAF-FP, связанного с BV или с PCB, в сравнении с iRFP670 при 37 °С; начальная точка отсчета соответствует началу индукции синтеза флуоресцентных белков. *г* — кинетика фотообесцвечивания GAF-FP, связанного с BV или с PCB, в сравнении с iRFP670; кривые были построены с учетом коэффициента пропускания фильтра в канале возбуждения флуоресценции, экстинкции флуоресцентных белков и перекрывания их спектров поглощения со спектром лампы. *д* — эффективность созревания GAF-FP в анаэробных условиях, показана доля ИФ (от максимума), которой достигают GFR-подобные (EGFP и mCherry) FP и белок GAF-FP, связанный с BV или с PCB; вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних значений для трех измерений. *е* — гель-фильтрация GAF-FP-BV; на врезке приведен калибровочный график.

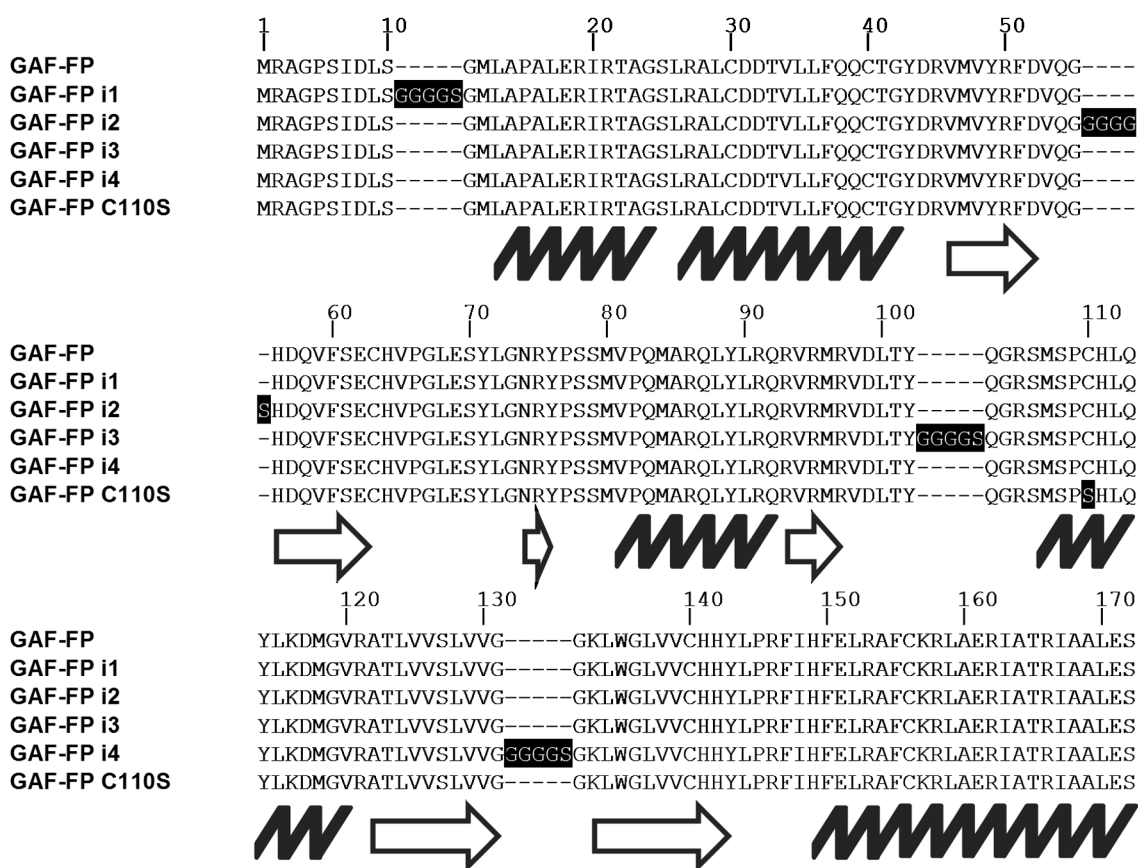


Рис. 4. Аминокислотное выравнивание GAF-FP и его мутантов: GAF-FP i1, GAF-FP i2, GAF-FP i3, GAF-FP i4 и GAF-FP Cys110Ser.

Пептидные вставки и мутация Cys110Ser выделены белым шрифтом на черном фоне. Положение альфа-спиралей отмечено зигзагообразной линией, положение бета-листов показано стрелками. Нумерация аминокислотных остатков приведена для GAF-FP без вставок.

инфракрасного флуоресцентного белка со сходными спектральными свойствами — iRFP670 (Shcherbakova, Verkhusha, 2013). Для этого мы следили за изменением уровня флуоресценции бактерий при краткой одномоментной индукции экспрессии белка. Время достижения флуоресценцией половины от максимального уровня как для iRFP670, так и для GAF-FP с любым из двух хромофоров лежало в промежутке между 3.5—4.0 ч (рис. 3, в). Исследование фотостабильности GAF-FP выявило его значительную устойчивость к фотообесцвечиванию в сравнении с iRFP670 (рис. 3, з). Было показано также, что GAF-FP обладает сложной кинетикой фотообесцвечивания, состоящей из двух компонент. Вначале, в течение 200 с, теряется около 20 % яркости флуоресценции GAF-FP, в то время как при дальнейшем фотообесцвечивании (более 2000 с) происходит лишь ее незначительное падение.

Для проверки способности GAF-FP связывать хромофор в анаэробных условиях мы сравнили яркость флуоресценции бактериальных клеток при индукции экспрессии белка в отсутствие кислорода и в его присутствии. В отличие от GFP-подобных FP GAF-FP достигал 90 и 60 % яркости в анаэробных условиях для форм, связанных с BV и PCV соответственно, в то время как флуоресценция GFP-подобных белков EGFP и mCherry в анаэробных условиях не превышала 10 % от таковой в аэробных условиях (рис. 3, д).

Олигомерное состояние GAF-FP мы изучили про помощи гель-фильтрации на носителе Superdex-200. Резуль-

таты хроматографии показали, что GAF-FP с полигистидиновым N-пептидом представляет собой мономер с мол. массой порядка 20 кДа, что в 2 и 1.4 раза меньше масс ближнеинфракрасных FP на основе BphP и GFP-подобных FP соответственно (рис. 3, е).

Стабильность структуры GAF-FP исследована нами при помощи создания библиотеки мутантов белка, содержащих встроенные случайным образом вставки из пяти аминокислот. Из этой библиотеки мы отобрали те мутанты, которые сохранили яркость флуоресценции, близкую к исходному уровню. Четыре наиболее ярких мутанта были названы согласно положению вставки в аминокислотной последовательности GAF-FP (рис. 4). Определив положения вставок относительно расположения элементов вторичной структуры GAF-домена R_pBphP1, мы обнаружили, что позиции вставок совпадают с регионами, не имеющими вторичной структуры и обладающими относительно высоким индексом подвижности. Эти данные позволяют предположить, что GAF-FP не только проявляет высокую стабильность структуры в целом, но и сохраняет вторичную структуру белка, близкую к таковой у GAF домена исходного BphP.

Экспрессию GAF-FP в клетках животных исследовали методами проточной цитофлуориметрии и эпифлуоресцентной микроскопии. Для того чтобы способствовать экспрессии GAF-FP в трансфицированных клетках, мы сконструировали и использовали белок слияния GAF-FP и sfGFP (superfolder GFP, высокостабильный мутант зеле-

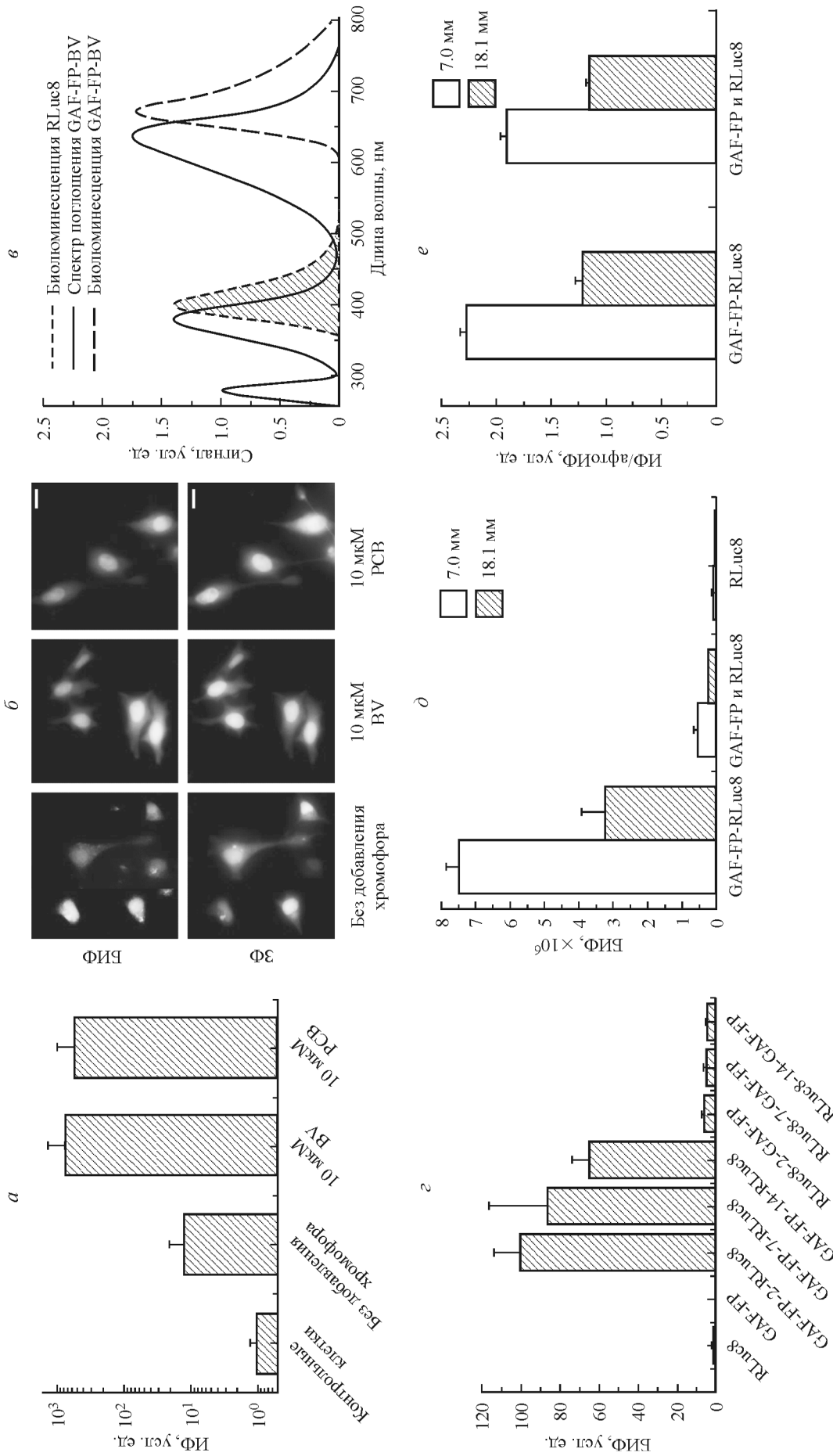


Рис. 5. Экспрессия GAF-FP в клетках животных, получение GAF-FP-RLuc8 и характеристика его оптических свойств.

а — сравнение яркости ближнеинфракрасной флуоресценции клеток линии HeLa, экспрессирующих GAF-FP-sfGFP (протоочная цитометрия); для анализа отбирали клетки, обладающие зеленой флуоресценцией; значения рассчитаны с учетом коэффициента экстинкции GAF-FP, коэффициента пропускания фильтра эмиссии флуоресценции, перекрывание его спектра со спектром флуоресценции GAF-FP. *б* — фотографии ближнеинфракрасной (БИФ) и зеленой (ЗФ) флуоресценции живых клеток HeLa, экспрессирующих GAF-FP-sfGFP; время экспозиции для крайнего левого изображения в ближнеинфракрасном канале было в 6,5 раза больше, чем для центрального и крайнего правого изображений; масштабный отрезок — 20 мкм. *в* — спектральная картина резонансного переноса энергии биолюминесценции от RLuc8 к GAF-FP. *г* — поиск оптимальной структуры химерного белка; для сравнения использовали интенсивность БИФ конструированных в бактериях; образец максимальным сигналом был принят за 100 %, в то время как образец с минимальным сигналом — за 0 %. *д* — сравнение БИФ (фотон · с⁻¹ · см⁻² · ср⁻¹) белков внутри мышинного фантома на различной глубине. *е* — сравнение относительной интенсивности флуоресценции (автоИФ) для флуоресцентных белков внутри мышинного фантома на различной глубине; масштабные отрезки — стандартные ошибки средних значений для трех измерений.

ного флуоресцентного белка (Pedelacq et al., 2006)), содержащий гибкий линкер из 20 аминокислот. Временно трансфицированные клетки линии HeLa анализировали через 48 ч после трансфекции (рис. 5, а). При этом часть клеток культивировали в среде, к которой за 24 ч до анализа добавляли 10 мкМ BV или РСВ. Клетки HeLa, экспрессирующие GAF-FP без добавления экзогенного хромофора, были в 12 раз ярче, чем нетрансфицированные клетки. Те клетки, которые культивировали с добавлением хромофоров, увеличили свою яркость в 65 и 45 раз в случаях BV и РСВ соответственно. Эпифлуоресцентная микроскопия трансфицированных клеток HeLa показала равномерное распределение сигнала флуоресценции и отсутствие агрегатов GAF-FP в клетке, что наблюдается как в зеленом, так и в ближнеинфракрасном каналах (рис. 5, б).

Мономерность, малые масса и размер, а также способность GAF-FP поглощать свет в фиолетовой области спектра были использованы нами для создания ближнеинфракрасной люциферазы. Для этого мы создали несколько химерных конструкторов, содержащих GAF-FP и модифицированную люциферазу *Renilla reniformis* (RLuc8). При окислении люциферазой диметокси-козлен-теразина происходит излучение света с максимумом при 400 нм. В химерном белке значительное перекрытие спектра биолюминесценции со спектром поглощения GAF-FP—BV обеспечивает условия для безызлучательного резонансного переноса энергии от субстрата после его окисления люциферазой к FP, который флуоресцирует с максимумом излучения при 670 нм (рис. 5, в). Для выбора оптимальной структуры химерного белка мы протестировали несколько конструкций, различающихся по порядку расположения двух белков и по длине линкера между ними (рис. 5, з). Наилучший химерный конструктор, названный GAF-FP—RLuc8, имел наименьший по длине линкер из двух аминокислот.

Для того чтобы оценить свойства GAF-FP—RLuc8 в сравнении с другими биолюминесцентными пробами, мы использовали фантом мыши, имитирующий поглощение, светорассеяние и автофлуоресценцию тканей животного. Равные количества очищенных белков (GAF-FP—RLuc8, смесь GAF-FP и RLuc8 или только RLuc8) смешивали с субстратом. Пробы немедленно помещали в фантом на глубину 7.0 или 18.1 мм и производили съемку в разных спектральных каналах. На основе полученных изображений мы измеряли интенсивности биолюминесценции и соотношение сигнала флуоресценции к сигналу автофлуоресценции. В канале 680/20 нм биолюминесценция GAF-FP—RLuc8 в 10 раз превосходила яркость смеси GAF-FP и RLuc8 и более чем в 100 раз яркость RLuc8 (рис. 5, д). Ближнеинфракрасная флуоресценция GAF-FP также обладает высоким соотношением сигнала флуоресценции и сигнала автофлуоресценции (рис. 5, е). Для химерного белка это соотношение составило 2.3 и 1.2 для глубин в 7.0 и 18.1 мм соответственно.

Заключение. Результатом настоящего исследования стал биоинженерный подход, который привел к созданию самого маленького в настоящее время ближнеинфракрасного FP. Введение аминокислотного остатка цистеина в GAF-домен позволило нам уменьшить двухдоменный флуоресцентный белок до хромофорсвязывающего домена, а также удалить консервативную структуру типа «узел». В сочетании со значительным мутагенезом это привело к созданию нового ближнеинфракрасного FP — GAF-FP. Он обладает рядом улучшенных характе-

ристик, таких как мономерность, высокая фотостабильность, способность флуоресцировать в анаэробных условиях, а также устойчивость к встраиванию коротких пептидов. Более того, способность присоединять два различных хромофора позволит применять GAF-FP в различных организмах, эндогенно синтезирующих разные тетрапирролы.

Созданный химерный белок превратил GAF-FP в ближнеинфракрасную люциферазу, которая обладает возможностями для многопараметрического (одновременного флуоресцентного и биолюминесцентного) анализа. Подобный подход может быть применен и к другим ближнеинфракрасным FP, которые используют тетрапирролы в качестве хромофоров и поглощают свет в фиолетовой области. Продемонстрированный в работе рациональный путь создания GAF-FP может послужить основой для создания усовершенствованных малых ближнеинфракрасных FP и химерных ближнеинфракрасных люцифераз на основе доменов GAF других BphP, которые уже использовались для создания двухдоменных ближнеинфракрасных FP, таких как *RpBphP2*, *RpBphP6*, *DrBhpP* и *BrBhpP*.

Список литературы

- Auldridge M. E., Satyshur K. A., Anstrom D. M., Forest K. T. 2012. Structure-guided engineering enhances a phytochrome-based infrared fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* 287 : 7000—7009.
- Bellini D., Papiz M. Z. 2012. Structure of a bacteriophytochrome and light-stimulated protomer swapping with a gene repressor. *Structure.* 20 : 1436—1446.
- Bhattacharya S., Auldridge M. E., Lehtivuori H., Ihalainen J. A., Forest K. T. 2014. Origins of fluorescence in evolved bacteriophytochromes. *J. Biol. Chem.* 289 : 32 144—32 152.
- Bhoo S. H., Davis S. J., Walker J., Karniol B., Vierstra R. D. 2001. Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. *Nature.* 414 : 776—779.
- Chen M., Li W., Zhang Z., Liu S., Zhang X., Zhang X. E., Cui Z. 2015. Novel near-infrared BiFC systems from a bacterial phytochrome for imaging protein interactions and drug evaluation under physiological conditions. *Biomaterials.* 48 : 97—107.
- Filonov G. S., Piatkevich K. D., Ting L. M., Zhang J., Kim K., Verkhusha V. V. 2011. Bright and stable near-infrared fluorescent protein for *in vivo* imaging. *Nat. Biotechnol.* 29 : 757—761.
- Filonov G. S., Verkhusha V. V. 2013. A near-infrared BiFC reporter for *in vivo* imaging of protein-protein interactions. *Chem. Biol.* 20 : 1078—1086.
- Fischer A. J., Rockwell N. C., Jang A. Y., Ernst L. A., Waggoner A. S., Duan Y., Lei H., Lagarias J. C. 2005. Multiple roles of a conserved GAF domain tyrosine residue in cyanobacterial and plant phytochromes. *Biochemistry.* 44 : 15 203—15 215.
- Gambetta G. A., Lagarias J. C. 2001. Genetic engineering of phytochrome biosynthesis in bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 10 566—10 571.
- Ishizuka T., Narikawa R., Kohchi T., Katayama M., Ikeuchi M. 2007. Cyanobacteriochrome TePixJ of *Thermosynechococcus elongatus* harbors phycoviolobin as a chromophore. *Plant Cell Physiol.* 48 : 1385—1390.
- Lamparter T. 2004. Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Lett.* 573 : 1—5.
- Narikawa R., Fukushima Y., Ishizuka T., Itoh S., Ikeuchi M. 2008. A novel photoactive GAF domain of cyanobacteriochrome AnPixJ that shows reversible green/red photoconversion. *J. Mol. Biol.* 380 : 844—855.
- Narikawa R., Nakajima T., Aono Y., Fushimi K., Enomoto G., Ni Ni W., Itoh S., Sato M., Ikeuchi M. 2015. A biliverdin-binding cyanobacteriochrome from the chlorophyll d-bearing cyanobacterium *Acaryochloris marina*. *Sci. Rep.* 5 : 7950.

- Pedelacq J. D., Cabantous S., Tran T., Terwilliger T. C., Waldo G. S. 2006. Engineering and characterization of a superfolder green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 24 : 79—88.
- Piatkevich K. D., Subach F. V., Verkhusha V. V. 2013a. Engineering of bacterial phytochromes for near-infrared imaging, sensing, and light-control in mammals. *Chem. Soc. Rev.* 42 : 3441—3452.
- Piatkevich K. D., Subach F. V., Verkhusha V. V. 2013b. Far-red light photoactivatable near-infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Nat. Commun.* 4 : 2153.
- Rockwell N. C., Lagarias J. C. 2010. A brief history of phytochromes. *Chemphyschem: Eur. J. Chem. Phys. Phys. Chem.* 11 : 1172—1180.
- Rockwell N. C., Martin S. S., Lagarias J. C. 2012. Red/green cyanobacteriochromes: sensors of color and power. *Biochemistry.* 51 : 9667—9677.
- Saito K., Chang Y. F., Horikawa K., Hatsugai N., Higuchi Y., Hashida M., Yoshida Y., Matsuda T., Arai Y., Nagai T. 2012. Luminescent proteins for high-speed single-cell and whole-body imaging. *Nat. Commun.* 3 : 1262.
- Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. 2012. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods.* 9 : 671—675.
- Shcherbakova D. M., Shemetov A. A., Kaberniuk A. A., Verkhusha V. V. 2015. Natural photoreceptors as a source of fluorescent proteins, biosensors, and optogenetic tools. *Ann. Rev. Biochem.* 84 : 519—550.
- Shcherbakova D. M., Verkhusha V. V. 2013. Near-infrared fluorescent proteins for multicolor *in vivo* imaging. *Nat. Methods* 10 : 751—754.
- Shu X., Royant A., Lin M. Z., Aguilera T. A., Lev-Ram V., Steinbach P. A., Tsien R. Y. 2009. Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science.* 324 : 804—807.
- Stepanenko O. V., Bublikov G. S., Stepanenko O. 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.
- Takai A., Nakano M., Saito K., Haruno R., Watanabe T. M., Ohyanagi T., Jin T., Okada Y., Nagai T. 2015. Expanded palette of nano-lanterns for real-time multicolor luminescence imaging. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 112 : 4352—4356.
- Toh K. C., Stojkovic E. A., van Stokkum I. H., Moffat K., Kennis J. T. 2011. Fluorescence quantum yield and photochemistry of bacteriophytochrome constructs. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13 : 11 985—11 997.
- Wagner J. R., Zhang J., Brunzelle J. S., Vierstra R. D., Forest K. T. 2007. High resolution structure of *Deinococcus* bacteriophytochrome yields new insights into phytochrome architecture and evolution. *J. Biol. Chem.* 282 : 12 298—12 309.
- Yu D., Gustafson W. C., Han C., Lafaye C., Noirclerc-Savoie M., Ge W. P., Thayer D. A., Huang H., Kornberg T. B., Royant A., Jan L. Y., Jan Y. N., Weiss W. A., Shu X. 2014. An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging. *Nat. Commun.* 5 : 3626.
- Zhang J., Wu X. J., Wang Z. B., Chen Y., Wang X., Zhou M., Scheer H., Zhao K. H. 2010. Fused-gene approach to photoswitchable and fluorescent biliproteins. *Angew. Chem.* 49 : 5456—5458.

Поступила 3 VI 2016

DEVELOPMENT OF SINGLE-DOMAIN NEAR-IRRED FLUORESCENT PROTEIN GAF-FP BASED ON BACTERIAL PHYTOCHROME

K. A. Rumyantsev,^{1,2} D. M. Shcherbakova,² N. I. Zaharova,² V. V. Verkhusha,² K. K. Turoverov^{1,*}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and

² Department of Anatomy and Structural Biology, Albert Einstein College of Medicine, New York, NY 10461, USA;

* e-mail: kkt@incras.ru

Fluorescent proteins (FPs) are widely used as genetically encoded markers for noninvasive and quantitative study of biological processes. Development of biomarkers that fluoresce in the near-infrared spectral range allows the study of animals at a deeper level due to high permeability of tissues to light in this wavelength range, compared to the visible light. For widespread use of FPs, such properties as low molecular weight and the monomer become important. In this paper, we developed a FP called the GAF-FP and based on the chromophore-binding domain of bacterial phytochrome from *Rhodospseudomonas palustris* (RpBphP1). GAF-FP has a molecular mass of ~ 19 kDa, 2 times lower than that of other FP based on BphPs and 1.4 times less than the commonly used GFP-like proteins. Unlike most other near-infrared FP, GAF-FP is a monomer, has high photostability and its structure can withstand the introduction of small peptide inserts. Moreover, GAF-FP can covalently bind two different tetrapyrrole chromophores: phycocyanobilin (PCB) and biliverdin (BV), which is found in mammalian tissues. GAF-FP with BV as a chromophore (GAF-FP—BV) has a main absorption band with a maximum at 635 nm and fluorescence maximum at 670 nm, whereby GAF-FP has a high signal to background ratio even if localized at a depth of several mm below the tissue surface. Apart from the near-infrared absorption band, GAF-FP—BV also has also an absorption band in the violet spectral range with a maximum at 378 nm. This property has been used by us to create a chimeric protein consisting of a modified luciferase from *Renilla reniformis* (RLuc8) and GAF-FP. We have shown that the chimeric protein is capable of resonance energy transfer from the substrate, which is oxidized by luciferase, to chromophore of GAF-FP—BV. In the absence of energy acceptor, RLuc8 catalyzes the cleavage of the substrate with light radiation having a peak of 400 nm. At the same time, as a part of GAF-FP—RLuc8 chimeric protein, the energy from the substrate is transferred to the chromophore of FP and then emitted in the near-infrared spectral range corresponding to GAF-FP fluorescence. These results open the way for the creation of new small near-infrared FPs based on various natural BphPs with a prospect of their wider use in cell and molecular biology.

Key words: monomeric proteins, fluorescent proteins, phytochromes, bioluminescence.