

DOI: 10.7868/S004137711810017X

## АГРЕГАЦИЯ БЛИЖНЕ-ИНФРАКРАСНОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА iRFP713 ПРИ РАЗВОРАЧИВАНИИ

© Ольга В. Степаненко,\* Олеся В. Степаненко

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;  
\* электронный адрес: sov@incras.ru

В настоящей работе мы исследовали процессы разворачивания—сворачивания белка iRFP713, принадлежащего к классу ближне-инфракрасных флуоресцентных маркеров (NIR FPs), широко используемых для исследования молекулярных процессов отдельной клетки и визуализации тканей и органов целого организма в реальном масштабе времени. Разворачивание iRFP713 в апоформе (в отсутствие хромофора) и в холоформе (в комплексе с биливердином) под действием сильного химического денатуранта гуанидинтиоцианата (GTC) начинается с диссоциации димера белка на мономеры. Агрегация iRFP713 при использовании GTC обусловлена совпадением области концентраций денатуранта, в которой происходит образование промежуточного состояния белка, с областью концентраций денатуранта, оптимальной для нейтрализации заряда поверхности белка.

**Ключевые слова:** бактериальные фитохромы, флуоресцентные маркеры, агрегация белка

**Принятые сокращения:** NIR FPs — ближне-инфракрасные флуоресцентные белки, BV — биливердин, GTC — гуанидинтиоцианат.

Ближне-инфракрасные флуоресцентные белки (NIR FPs), сконструированные на основе комплексов бактериальных фитохромов с их природным лигандом биливердином (BV), нашли применение в качестве генетически кодируемых флуоресцентных маркеров для приживленной визуализации молекулярных процессов, происходящих в отдельных клетках и в целом организме с высоким разрешением в реальном масштабе времени (Rodriguez et al., 2017). NIR FPs состоят из двух доменов PAS (Per-ARNT-Sim) и GAF (cGMP PDE/AC/FhIA), образующих хромофорсвязывающий домен фитохромов. Оба домена, PAS и GAF, вовлечены в образование сложного и редкого для белков структурного элемента, узла типа восьмерки (Jamroz et al., 2015). Исследования NIR FPs в основном были направлены на оптимизацию их спектральных и фотофизических свойств (Toh et al., 2011; Bhattacharya et al., 2014). Изучение процессов сворачивания—разворачивания ряда димерных и мономерных NIR FPs позволило показать, что на спектральные свойства (Stepanenko et al., 2016) и стабильность структуры этих белков (Stepanenko et al., 2017) оказывает влияние место ковалентного присоединения BV и аллостерическое взаимодействие мономеров в димерных NIR FPs. При изучении процессов разворачивания и сворачивания iRFP713, сконструированного на основе бактериального фитохрома *RpBphP2* (Filonov et al., 2011) под действием гуанидингидрохлорида (GdnHCl), мы показали, что ковалентно связанный BV препятствует эффективному рефолдингу iRFP713 (Stepanenko et al., 2014).

В настоящей работе мы продолжили исследование процессов разворачивания—сворачивания iRFP713 в апо- и холоформе под действием сильного химического денатуранта гуанидинтиоцианата (GTC) методами абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Наряду со стационарными зависимостями были исследованы кинетические зависимости спектральных характеристик при разворачивании iRFP713 — такой комплексный подход позволяет наиболее полно выявить структурные изменения в белке.

### Материал и методика

**Материалы.** (GTC, три(2-карбоксиэтил)fosфин гидрохлорид (TCEP)) и три(гидроксиметил)аминометан (Tris) (Sigma, США) использованы без дополнительной очистки. Концентрацию GTC определяли с помощью рефрактометра Аббе (ЛОМО, Россия).

**Выделение и очистка белков.** Ген *iRFP713* с polyHis-tag на N-конце клонирован в вектор pBAD/His-B (Invitrogen, США) по сайтам BglII и EcoRI, которым трансформировали штамм бактерий *Escherichia coli* LMG 194. Белок получен и очищен, как описано ранее (Stepanenko et al., 2016), его чистоту контролировали электрофоретически. Оптическая плотность в растворах белка не превышала 0,1, измерения выполнены в 20 мМ Tris/HCl, pH 8,0, 1 мМ TCEP.

**Спектрофотометрия.** Спектры поглощения измеряли с использованием спектрофотометра U-3900N

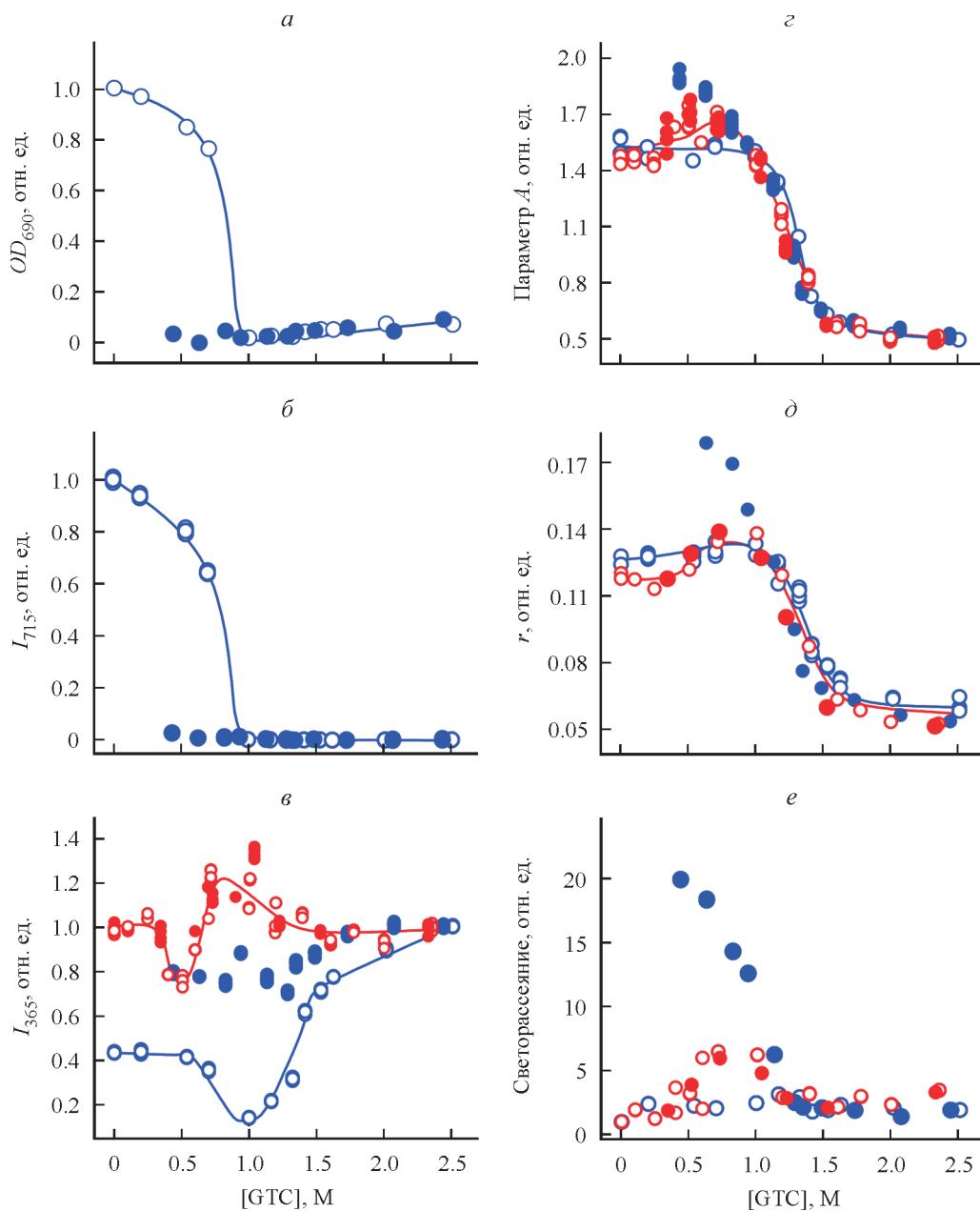


Рис. 1. Разворачивание—сворачивание белка iRFP713 в апоформе и холоформе под действием гуанидинтиоцианата (GTC).  
 а — изменение интенсивности флуоресценции (ИФ) триптофана при длинах волн возбуждения и регистрации 295 и 365 нм соответственно; б — изменение оптической плотности раствора при длине волн регистрации 690 нм; в — изменение ИФ хромофора при длине волн возбуждения (см. раздел «Материал и методика»); г — изменение параметра  $A = I_{320}/I_{365}$  при длине волн возбуждения 295 нм; д — изменение анизотропии флуоресценции при длинах волн возбуждения и регистрации 295 и 365 нм соответственно; е — изменение интенсивности светорассеяния. Значения регистрируемых характеристик для iRFP713 в апоформе и холоформе представлены кружками красного и синего цветов соответственно. Открытые символы — разворачивание, закрытые — сворачивание. Изменения выполнены после инкубации нативного или денатурированного белка в присутствии GTC в течение 24 ч.

(Hitachi, Япония) и кварцевых кювет (101.016-QS, Hellma, Германия) с длиной оптического пути 5 мм.

**Флуоресцентные измерения.** Использовали спектрофлуориметр Cary Eclipse (Agilent, США) и кюветы 10(10(4 мм (Starna, США). Спектральные характеристики триптофановой флуоресценции и флуоресценции BV корректировали с учетом эффекта вторичного внутреннего фильтра (Fonin et al., 2014). Разворачивание (сворачивание) белка инициировали ручным смешением нативного белка (или белка, денатурированного в течение 24 ч в 2.5 М GTC) с буферным раствором, содержащим

необходимую концентрацию денатуранта. Равновесные значения спектральных характеристик iRFP713 были измерены после инкубации белка в присутствии GTC при 23 °C в течение 24 ч.

## Результаты

**Разворачивание—сворачивание iRFP713. Стационарные зависимости. Конформационные превращения iRFP713 в апо- и холоформе при разворачива-**

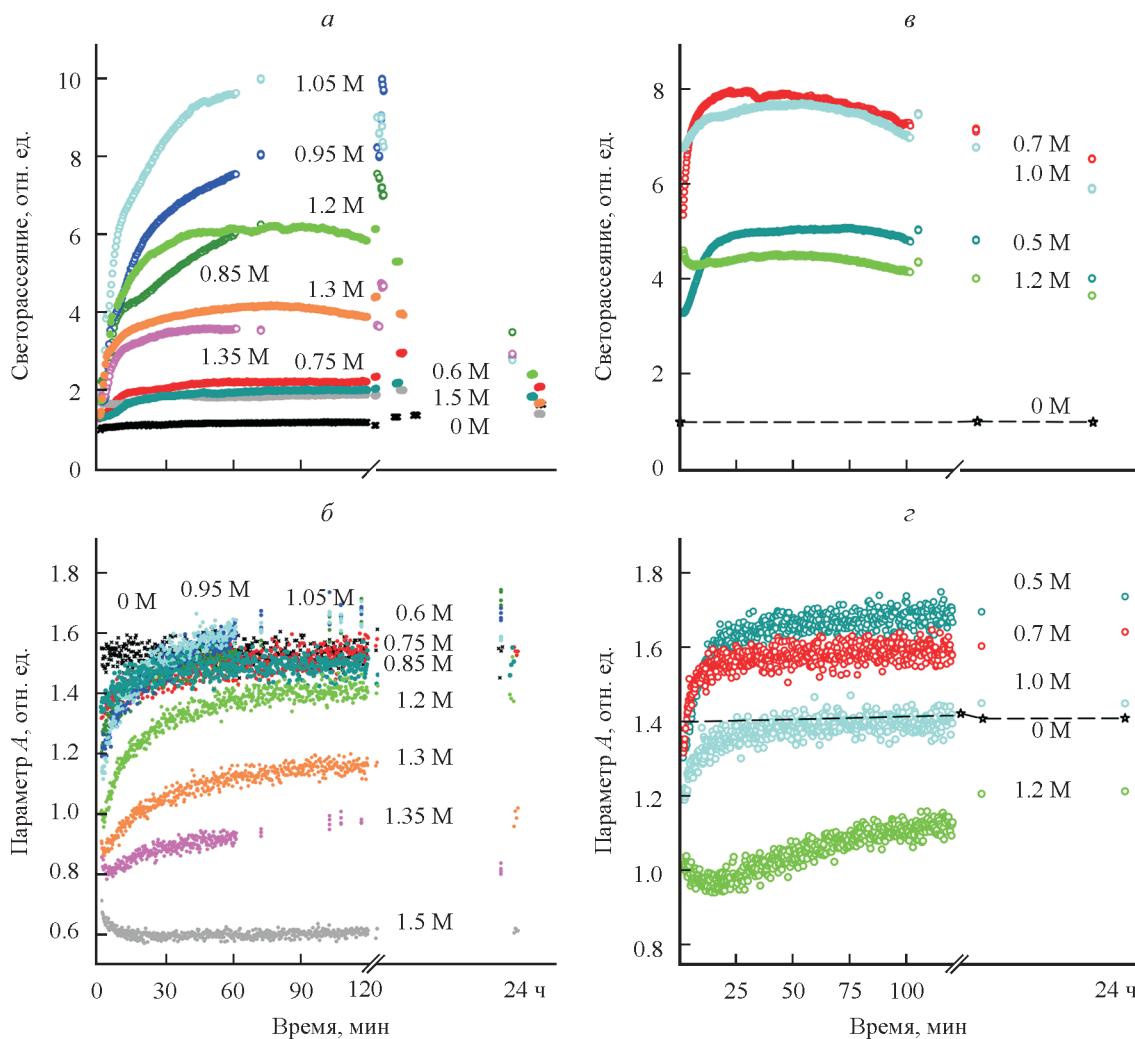


Рис. 2. Кинетические кривые разворачивания iRFP713 в апоформе и холоформе под действием GTC.

а, в — изменение интенсивности светорассеяния для холоформы и апоформы соответственно; б, г — изменение параметра  $A = I_{320}/I_{365}$  при длине волн возбуждения 295 нм для холоформы и апоформы соответственно. Числа у кривых — концентрация GTC в растворе белка.

нии — сворачивание под действием GTC регистрировали по изменению характеристик триптофановой флуоресценции (интенсивности флуоресценции, параметра  $A$  и анизотропии флуоресценции), спектральных характеристик хромофора (оптической плотности в максимуме дальней-красной полосы поглощения и интенсивности флуоресценции) и светорассеяния (рис. 1).

Интенсивность триптофановой флуоресценции iRFP713 в холоформе в нативном состоянии существенно ниже, чем у белка в апоформе. Как мы показали ранее, тушение флуоресценции триптофановых остатков iRFP713 в холоформе обусловлено безызлучательным переносом энергии от триптофановых остатков белка на хромофор (Stepanenko et al., 2014). В области концентраций от 0.5 до 1.0 М GTC существенно уменьшается интенсивность триптофановой флуоресценции iRFP713 в холоформе (рис. 1, а), а оптическая плотность и интенсивность флуоресценции BV белка уменьшаются до нуля (рис. 1, б, в). Эффект обусловлен агрегацией и выпадением белка в осадок. Значения параметра  $A$  и анизотропии флуоресценции iRFP713 в холоформе в этой области концентраций денатуранта практически не изменяются (рис. 1, г, д). Это означает, что характеристики триптофа-

ни — сворачивания под действием GTC регистрировали по изменению характеристик триптофановой флуоресценции (интенсивности флуоресценции, параметра  $A$  и анизотропии флуоресценции), спектральных характеристик хромофора (оптической плотности в максимуме дальней-красной полосы поглощения и интенсивности флуоресценции) и светорассеяния (рис. 1).

новой флуоресценции оставшейся в растворе части белка не отличаются от характеристик белка в отсутствие денатуранта. Агрегация iRFP713 в апоформе начинается уже при 0.4 М GTC (рис. 1, а). То, что агрегация iRFP713 в холоформе происходит при больших концентрациях денатуранта, очевидно, вызвано стабилизацией холобелка встроенным BV. В области концентраций от 0.5 до 0.7 М GTC наблюдается рост всех измеренных характеристик iRFP713 в апоформе (рис. 1, красные кривые). Мы предполагаем, что в этих экспериментальных условиях увеличивается количество растворенных агрегатов апобелка.

В области концентраций более 1.0 М GTC интенсивность триптофановой флуоресценции iRFP713 в холоформе возрастает (рис. 1, а). Также наблюдается незначительное увеличение оптической плотности BV (рис. 1, б), форма спектров поглощения характерна для свободного BV. Это свидетельствует о том, что в этих условиях увеличивается доля растворенных молекул белка, в которых хромофор уже не встроен в карман GAF-домена. Разворачивание iRFP713 в холоформе в области концентраций GTC 1.1—1.7 М также сопровождается уменьшением значений параметра  $A$  и анизотропии флуоресценции (рис. 1, г, д). В области денатурационного перехода зна-

чения параметра  $A$  и анизотропии флуоресценции iRFP713 в холоформе практически совпадают со значениями этих характеристик апобелка. Это обусловлено тем, что в области концентраций GTC, при которых происходит разворачивание белка, BV уже не встроен в структуру белка (рис. 1, б), поэтому поведение холо- и апобелка идентично. Значения характеристик iRFP713 в холоформе, измеренных при денатурации белка и его ренатурации, не совпадают в области концентрации GTC менее 1.0 М (рис. 1), что свидетельствует о необратимости денатурации iRFP713 в холоформе под действием GTC, вероятно из-за накопления агрегированных форм белка. Процесс разворачивания iRFP713 в апоформе обратим, что подтверждается совпадением зависимостей всех регистрируемых характеристик iRFP713 в апоформе, измеренных при денатурации и ренатурации белка из полностью развернутого состояния (рис. 1).

**Разворачивание—сворачивание iRFP713.** Кинетические зависимости. В растворах GTC в концентрации 0.85—1.35 М обнаружено значительное увеличение интенсивности светорассеяния белка в течение 1 ч после смешения растворов белка и денатуранта и последующее уменьшение этой характеристики при продолжительной инкубации холобелка в присутствии GTC (рис. 2, а). Максимальное 10-кратное увеличение интенсивности светорассеяния наблюдается для холобелка в растворе 1.05 М GTC. Наблюдаются заметное уменьшение значения параметра  $A$  и анизотропии флуоресценции iRFP713 в холоформе за мертвое время эксперимента при переводе белка в раствор GTC во всем диапазоне концентраций (рис. 2, б). В присутствии GTC в концентрации менее 1.35 М первичное уменьшение этих характеристик сменяется их выраженным ростом. Разворачивание iRFP713 в апоформе под действием GTC также сопровождается существенным увеличением интенсивности светорассеяния (максимальное 8-кратное возрастание интенсивности светорассеяния относительно белка в буферном растворе зарегистрировано в присутствии 0.7 М GTC) и увеличением параметра  $A$  (рис. 2, в, г).

## Обсуждение

Полученные данные свидетельствуют об образовании при разворачивании iRFP713 состояния с более низким значением параметра  $A$  по сравнению с нативным белком. Логично предположить, что разворачивание iRFP713 начинается с разрушения его димерной структуры. Три триптофановых остатка iRFP713 локализованы в разных доменах белка. Остатки W109 и W281 находятся во внутренней области PAS-домена и на периферии GAF-домена белка в плотном и жестком микроокружении (Stepanenko et al., 2017). Остаток W311 находится в области взаимодействия мономеров в димере белка. Существенное уменьшение параметра  $A$  iRFP713 в апо- и холоформе за мертвое время при переводе белка в раствор GTC в умеренных концентрациях (рис. 2, б, г) может быть обусловлено разрушением димера белка на мономеры и увеличением доступности растворителю W311. Образование мономеров iRFP713 на ранних этапах разворачивания белка требует дальнейшего подтверждения.

В присутствии умеренных концентраций GTC наблюдается агрегация iRFP713 в апо- и холоформе. Ранее было показано, что ионные денатуранты могут вызывать агрегацию белков в промежуточном состоянии при нейтрализации заряда поверхности белка катионами GdnH<sup>+</sup> (Povarova et al., 2010). Это позволило нам предположить, что в области концентраций более 0.4 и 0.5 М GTC для апо- и холобелка iRFP713 соответственно происходит образование промежуточного состояния белка, склонного к агрегации. С этим предположением согласуется наблюдение о том, что условия, наиболее благоприятные для агрегации апобелка, создаются в присутствии GTC в меньшей концентрации по сравнению с концентрацией GTC, необходимой для стимулирования агрегации холобелка (рис. 1). Поскольку диссоциация димера происходит на ранних этапах разворачивания iRFP713, данное промежуточное состояние также должно быть мономерным.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы МКБ РАН и Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01515).

## Список литературы

- Bhattacharya S., Auldrige 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.
- 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.
- Fonin A. V., Sulatskaya A. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2014. Fluorescence of dyes in solutions with high absorbance. Inner filter effect correction. *PLoS ONE.* 9 : e103878.
- Jamroz M., Niemyska W., Rawdon E. J., Stasiak A., Millett K. C., Sulkowski P., Sulkowska J. I. 2015. KnotProt: a database of proteins with knots and slipknots. *Nucleic Acids Res.* 43 : D306—D314.
- Povarova O. I., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K. 2010. Differences in the pathways of proteins unfolding induced by urea and guanidine hydrochloride: molten globule state and aggregates. *PLoS ONE* 5 : e15035.
- Rodriguez E. A., Campbell R. E., Lin J. Y., Lin M. Z., Miyawaki A., Palmer A. E., Shu X., Zhang J., Tsien R. Y. 2017. The growing and glowing toolbox of fluorescent and photoactive proteins. *Trends Biochem. Sci.* 42 : 111—129.
- Stepanenko O. V., Baloban M., Bublikov G. S., Shcherbakova D. M., Stepanenko O. V., Turoverov K. K., Kuznetsova I. M., Verkhusha V. V. 2016. Allosteric effects of chromophore interaction with dimeric near-infrared fluorescent proteins engineered from bacterial phytochromes. *Sci. Rep.* 6 : 18750.
- 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.
- Stepanenko O. V., Stepanenko O. V., Bublikov G. S., Kuznetsova I. M., Verkhusha V. V., Turoverov K. K. 2017. Stabilization of structure in near-infrared fluorescent proteins by binding of biliverdin chromophore. *J. Mol. Str.* 1140 : 22—31.
- 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.

Поступила 13 VII 2018

## AGGREGATION AT UNFOLDING OF THE NEAR-INFRARED FLUORESCENT PROTEIN iRFP713

*Olga V. Stepanenko,\* Olesya V. Stepanenko*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;  
\* e-mail: sov@incras.ru

Here, we studied the unfolding — refolding processes of iRFP713, belonging to near-infrared fluorescent proteins (NIR FPs), widely used as genetically encoded optical probes for real times visualization of molecular processes from single cell to the whole organism. Our data are consistent with the dissociation of the protein dimer to monomers at early step of guanidine thiocyanate induced unfolding of iRFP713 in apo- (free of the chromophore) and holoform (bound with biliverdin). Pronounced aggregation of iRFP713 in the case of the use of guanidine thiocyanate arises from the coincidence of the concentration range of the denaturant, in which the intermediate state of the protein is populated, with the range of denaturant concentrations that is optimal for neutralizing the charge of the protein surface.

**Key words:** bacterial phytochromes, optical probes, protein aggregation