

УДК 577.29

# Две ключевые замены в хромофорном окружении белка mKate2 для получения улучшенного FusionRed-подобного красного флуоресцентного белка

Д. А. Ручкин<sup>1</sup>, А. С. Гавриков<sup>1</sup>, Д. В. Колесов<sup>1</sup>, А. Ю. Гороховатский<sup>1</sup>, Т. В. Чепурных<sup>1</sup>, А. С. Мишин<sup>1</sup>, Е. Г. Максимов<sup>2</sup>, Н. В. Плетнева<sup>1</sup>, В. З. Плетнев<sup>1</sup>, А. М. Павлова<sup>1,3</sup>, В. А. Никитин<sup>1,2</sup>, А. М. Богданов<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Государственный научный центр Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119992 Россия

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва, 117997 Россия

<sup>4</sup>Измирский институт технологий, кафедра фотоники, Измир, 35430 Турция

\*E-mail: noobissat@ya.ru

Поступила в редакцию 20.10.2024

Принята к печати 19.02.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27545

**РЕФЕРАТ** Красные флуоресцентные белки (RFP) часто используются в качестве предпочтительных флуоресцентных меток в микроскопии живых тканей и визуализации целого организма. При выборе конкретного варианта RFP приоритетными могут быть такие характеристики, как молекулярная яркость флуоресценции, скорость созревания хромофора, мономерность, длины волн возбуждения/эмиссии флуоресценции и низкая токсичность, которые в конкретном белке редко сочетаются оптимальным образом. Если же к метке предъявляются дополнительные требования, такие как продолжительное время жизни флуоресценции и/или мигание (blinking), то доступный набор вариантов может существенно сузиться. Поскольку все разнообразие традиционных моногенных RFP относится лишь к нескольким филогенетическим линиям (основные из которых – производные DsRed, eqFP578 и eqFP611), их практически значимые свойства ожидаемо распределены между близкими гомологами. В таких случаях систематический мутационный анализ, ориентированный на вариант-специфичные аминокислотные остатки, может пролить свет на происхождение различий между родственными RFP и быть полезным для объединения их преимуществ в новых вариантах RFP. Так, белок FusionRed, эффективный для флуоресцентного мечения благодаря высокой степени мономерности и низкой цитотоксичности, имеет значительно сниженную яркость и время жизни флуоресценции по сравнению с предковым mKate2. Нами охарактеризован новый быстро созревающий мономерный RFP, полученный на основе mKate2 и FusionRed, превосходящий оба родительских белка по молекулярной яркости, обладающий увеличенным временем жизни флуоресценции и спонтанным миганием, перспективным для наноскопии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** RFP, FusionRed, mKate2, флуоресцентный белок, время жизни флуоресценции.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ФБ – флуоресцентные белки; RFP – Red fluorescent protein, красные флуоресцентные белки; FLIM – Fluorescence lifetime imaging microscopy, микроскопия времени жизни флуоресценции; BALM – Bleaching/Blinking Assisted Localization Microscopy, локализационная микроскопия с использованием фотообесцвечивания и мигания; OSER – Organised smooth endoplasmic reticulum, организованный гладкий эндоплазматический ретикулум; NE – nuclear envelope, ядерная оболочка; PEI – полиэтиленмин; SMLM – single molecule localization microscopy, микроскопия одиночных молекул.

**ВВЕДЕНИЕ**

Современные методы биологической визуализации используют огромное разнообразие флуоресцентных меток, среди которых предпочтение часто отдается генетически кодируемым флуорофорам, таким как флуоресцентные белки (ФБ). ФБ обеспечивают высокоспецифичное внутриклеточное мечение и позволяют реализовать продвинутое модальности флуоресцентной визуализации, микроскопию сверхвысокого разрешения и времени жизни флуоресценции (FLIM) на уровне живых клеток [1, 2]. В свою очередь, красные флуоресцентные белки (RFP), полифилетическая группа [3–6] ФБ из кораллов (Anthozoa), флуоресцирующие в красной области спектра, широко применяются для визуализации мишеней в целом организме и/или в глубине биологической ткани. Красные и дальнекрасные ФБ зачастую оказываются оптимальным вариантом выбора в таких исследованиях благодаря снижению поглощению биологическими тканями света на длинах волн ~600–1200 нм (в так называемом «диагностическом окне») [7–9].

FusionRed – один из существующих вариантов RFP [10], часто используется как метка для визуализации живых клеток (включая визуализацию тонких внутриклеточных структур). Способность FusionRed поддерживать высокомономерное состояние даже при высоких локальных концентрациях (характерных для некоторых локализаций в клетках млекопитающих [11, 12]) называется «супермономерностью» и сочетается в этом белке с низкой токсичностью и низкой чувствительностью к pH среды. Благодаря такому набору свойств, FusionRed подходит в качестве флуоресцентного ядра для генетически кодируемых индикаторов, а мечение им других белков не влияет на их функциональную активность и пространственную структуру [13–16]. В то же время у FusionRed есть ряд выраженных недостатков, снижающих его практическую ценность как многоцелевого маркера и создающих предпосылки для дальнейшей оптимизации этого RFP. Так, изящные исследования лаборатории Хименеса позволили с помощью направленной белковой эволюции [17] и полурационального дизайна [18] получить более яркие варианты FusionRed (в частности, FusionRed-MQV [19] показал примерно четырехкратный прирост молекулярной яркости относительно родительского белка, хотя и ценой 20 нм гипсохромного сдвига максимума эмиссии). Кроме того, результаты рентгеноструктурного анализа показали, что примерно половина молекул FusionRed несет хромофор в незрелой форме [20]. Эта особенность значительно снижает эффективную яркость FusionRed как флуоресцентной метки (относительно

ожидаемой на основании измеренной молекулярной яркости флуоресцентного белка) и становится еще одним направлением структурно-обоснованного дизайна новых вариантов RFP.

Важно отметить, что FusionRed ( $\lambda_{em} = 608$  нм) – дочерний вариант наиболее яркого на данный момент мономерного дальнекрасного ФБ mKate2 ( $\lambda_{em} = 633$  нм) [21], от которого он отличается 17 аминокислотными заменами, введенными полурационально при помощи нескольких раундов сайт-направленного и случайного мутагенеза [10]. При этом структурные основы спектральных различий (в коэффициентах экстинкции, квантовых выходах и временах жизни флуоресценции, положениях максимумов поглощения/испускания) между белками FusionRed и mKate2 не установлены. Основываясь на анализе пространственной структуры FusionRed [20], мы сделали предположение о ключевой роли трех остатков в окружении хромофора, Arg-67, Cys-158 и His-197 (Lys-67, Ala-158 и Arg-197 для mKate2 соответственно) как детерминант описанных спектральных различий. В настоящем исследовании мы систематически изучили влияние указанных положений на свойства обоих белков методом сайт-направленного мутагенеза. Среди представителей полученной библиотеки обнаружен вариант, обладающий повышенной яркостью и высоким спектральным сходством с FusionRed – mKate2-K67R/R197H. Этот RFP наследует достоинства обоих родственных белков: моноэкспоненциальное затухание флуоресценции, как у mKate2, и способность эффективно функционировать в составе белков слияния, как у FusionRed. Очищенный mKate2-K67R/R197H продемонстрировал способность к выраженному спонтанному миганию флуоресценции (blinking), открывающую перспективу использования этого белка в микроскопии сверхвысокого разрешения.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ****Сайт-направленный мутагенез**

Сайт-направленные аминокислотные замены в mKate2 и FusionRed вносили с использованием модифицированной процедуры IVA-клонирования [22]. Гены исходных RFP клонировали в векторную основу pQE-30 (Qiagen, США) по сайтам эндонуклеаз рестрикции BamHI и HindIII и использовали в качестве матриц для ПЦР. Прямые праймеры содержали 5'-концевую область длиной 15–20 нуклеотидов, гомологичную матричной ДНК, необходимую для бактериальной рекомбинации. За ней следовал триплет с целевой заменой и 3'-концевая область с расчетной температурой отжига

60°C. Обратные праймеры включали аналогичную последовательность для рекомбинации длиной 15–20 нуклеотидов на 5'-конце и 3'-концевую последовательность, вместе составляющие олигонуклеотид с расчетной температурой отжига 60°C. Если расчетные температуры отжига оказывались выше, то 5'-концевой фрагмент отжигался частично. 3'- и 5'-Концевые нуклеотиды обоих праймеров подбирали так, чтобы избежать комплементарного спаривания и минимизировать гомо- и гетеродимеризацию. 3'-Концы праймеров образовывали сильную комплементарную пару с матричной последовательностью. Олигонуклеотиды не образовывали тупых концов при гомо- и гетеродимеризации. В ПЦР использовали полимеразу Phusion (ThermoFisher, США), протокол, рекомендованный производителем, 35 циклов элонгации. Концентрация матричной ДНК составляла 50 нг на реакцию. Последовательности использованных праймеров:

a) FusionRed-R67K:

Прямой – 5'-agcttcacgtacggcagcaaaccttcacagcaccctccgg-3'

Обратный – 5'-gctgccgtacatgaagctggtag-3'

b) FusionRed-C158A: описан в предыдущем исследовании [20]

Прямой – 5'-cggcggcctggaagcgcagcagacatggccctgaagctcg-3'

Обратный – 5'-tgccctccaggccgccgtcagcgggtacatcgtctcg-3'

c) FusionRed-H197R:

Прямой – 5'-ggcgtctacaactggacagaagactggaaagaatcaaggaggc-3'

Обратный – 5'-gtccacgtttagacgccgggcatcttgaggtcgtagcg-3'

d) mKate2-K67R:

Прямой – 5'-agcttcacgtacggcagcagaaccttcacaaccacacccagg-3'

Обратный – 5'-tgctgccgtacatgaagctggtag-3'

e) mKate2-A158C:

Мутантный вариант получен ранее [21]

Прямой – 5'-ggcctggaaggcagatgacacatggccctgaagctcg-3'

Обратный – 5'-tctgccctccaggccgccgtcagcgggtacag-3'

f) mKate2-R197H:

Прямой – 5'-ggcgtctactatgtggaccacagactggaaagaatcaaggaggc-3'

Обратный – 5'-gtccacatagtagacgccgggcatcttgaggttcttagcg-3'.

Преципитированные продукты ПЦР обрабатывали эндонуклеазой рестрикции DpnI для удаления матриц. При трансформации 100 мкл компетентных клеток *E. coli* XL1-Blue (Evrogen, Россия) брали 700 нг продукта ПЦР.

### Выделение и очистка белка

Варианты ФБ экспрессировали в штамме *E. coli* XL1-Blue в течение 72 ч при 37°C. После центрифугирования бактериальную биомассу ресуспендировали в PBS (GIBCO, ThermoFisher Scientific, США, pH 7.4) и обрабатывали ультразвуком на Sonics Dismembrator (Fisher Scientific, США). Очистку белков проводили на металл-аффинной смоле TALON (Clontech, США), предварительно промытой PBS в соответствии с протоколом производителя. Для элюции использовали 0.3 М раствор имидазола (pH 8.0). Элюаты белков обессоливали и концентрировали методом ультрафильтрации на колонках Amicon Ultra 0.5 10K (Merck Millipore, США). Обессоленный раствор белка (обычно с концентрацией ~5 мг/мл) анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (SDS-PAGE) или спектроскопически, либо кратковременно хранили при 4°C до использования.

### Абсорбционная и флуоресцентная спектроскопия

Спектры поглощения и флуоресценции получали с помощью спектрофотометра Cary100 UV/VIS и спектрофлуориметра Cary Eclipse (Agilent Technologies, США) соответственно. Во всех случаях использовали раствор белка в PBS (pH 7.4). Квантовые выходы флуоресценции и молярные коэффициенты экстинкции определяли как описано ранее [20].

### Исследование мономерности

**Гель-фильтрация.** Колонку Superdex® 200 Increase 10/300 GL (Cytiva, Швеция), уравновешенную 20 мМ натрий-фосфатным буфером (pH 7.4) с концентрацией NaCl 150 мМ, использовали в составе хроматографической системы Agilent 1260 Bio-Inert LC, оснащенной встроенным детектором поглощения и флуоресценции на базе светодиодов (diode array detector) Agilent 1260 и детектором флуоресценции Agilent 1260 при 24°C и со скоростью потока 0.75 мл/мин. Для калибровки использовали цитохром с (12.4 кДа), карбоангидразу (29 кДа), бычий сывороточный альбумин (66 кДа), алкогольдегидрогеназу (150 кДа), β-амилазу (200 кДа) и ферритин (450 кДа). Подробности калибровки представлены на рис. S6 и в табл. S1. Оборудованием управляли с помощью программного обеспечения Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition C.01.07 SR3.

**OSER-тест.** OSER-тест проводили в двух вариантах. Первый, на клетках HeLa, был аналогичен описанному в [12]. Клетки трансфицировали FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega, США) в со-

ответствии с рекомендациями производителя. Микрофотографии получали с помощью флуоресцентной широкопольной микроскопии на модифицированном инвертированном микроскопе Leica 6000LX, оснащенный флуоресцентным фильтркубом для mCherry (см. раздел «Широкопольная флуоресцентная микроскопия»). Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения Fiji ImageJ (версия 2.9.0/1.54b). «Завитки» (whorl-like structures [23]) обнаруживали в соответствии с рекомендациями Constantini и соавт. [23]. Из-за отсутствия этих структур более чем в 80% трансфицированных клеток HeLa и связанной с этим сложности обнаружения достаточного для статистического анализа количества клеток с такими структурами, расчет соотношений интенсивности флуоресценции структур организованного гладкого эндоплазматического ретикулума (organised smooth endoplasmic reticulum, OSER) и ядерных оболочек (nuclear envelope, NE) не проводился.

Второй вариант теста OSER был аналогичен варианту, описанному в [23]. Клетки U2OS трансфицировали с помощью полиэтиленимина (PEI, Sigma-Aldrich, США) и наблюдали спустя 18 ч после трансфекции; изображения анализировали с использованием программного обеспечения Fiji ImageJ для получения средних значений сигналов NE и OSER. Линейные целевые области (ROI) выбирали инструментом обводки «straight»; для ROI OSER использовали инструмент «freehand». Для NE выбирали не менее трех ROI в различных локализациях для каждой клетки. Расчеты проводили в GraphPad Prism10.

*Инженерия конструкций для экспрессии в клетках млекопитающих.* Плазмиды для экспрессии в клетках млекопитающих кодировали слитые белки Diogenes с виментином (Vimentin-Diogenes), лайфактом (lifeact-Diogenes), энсконсином (ensconsin-Diogenes) и цитокератином (Diogenes-cytokeratin), а также с сигнальной последовательностью мембранного якоря белка эндоплазматического ретикулума CytERM (используемого для OSER). Конструкции получали с помощью методики Golden Gate в соответствии со стандартной процедурой MoClo [24–26]. Для обеспечения экспрессии в клетках млекопитающих каждая транскрипционная единица находилась под контролем цитомегаловирусного (CMV) промотора, содержала последовательность, кодирующую белок слияния, и терминатор SV40. Для Golden Gate использовали T4-лигазный буфер (SibEnzyme, Россия). Каждая реакция включала 10 U T4-лигазы и 20 U эндонуклеаз рестрикции BsaI либо BpiI (ThermoFisher) и 100–200 нг ДНК

каждого фрагмента. Условия реакции включали 30 циклов инкубации при 37°C и 16°C (90 с при 37°C, 180 с при 16°C).

### Широкопольная флуоресцентная микроскопия

Флуоресцентную микроскопию проводили на инвертированном микроскопе Leica 6000LX с масляным иммерсионным объективом Leica HCX PL APO 100X/1.40–0.70NA, камерой Zyla sCMOS (Andor, Великобритания) и источником света CoolLED рЕ-300, оснащенным кубическим фильтром для mCherry (Leica, Германия) (фильтр возбуждения: 560/40 нм, фильтр эмиссии: 630/75 нм). Мощность освещения варьировали от 1 до 5 Вт/см<sup>2</sup>, время экспозиции составляло от 50 до 150 мс.

### Измерение рН-стабильности

При подготовке образцов использовали ряд готовых буферных растворов с рН 3–10.55; растворы содержали (мМ): 130 KCl, 30 NaCl, 0.5 MgCl<sub>2</sub>, 0.2 EGTA и 30 HCl–NaH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> (рН 3.0–4.5) или 15 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>–Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (рН 5.0–7.5) или 20 Na<sub>2</sub>V<sub>4</sub>O<sub>7</sub>–HCl/NaOH (рН 8.0–11.0) [27]. Концентрация очищенного и обессоленного RFP в каждом образце составляла 5 мкг/мл. Спектры эмиссии измеряли на флуоресцентном спектрометре Cary Eclipse дважды в трех временных точках (немедленно, 3 и 5 мин спустя, всего 6 измерений на образец) в спектральном диапазоне от 560 до 700 нм при  $\lambda_{\text{ex}} = 540$  нм и ширине щелей возбуждения/эмиссии 5 нм, при одинаковом напряжении на фотоумножителе и скорости сканирования. Значения интенсивности флуоресценции в максимумах эмиссии усредняли по 6 измерениям. Усредненные данные при всех значениях рН для каждого RFP нормировали на максимальное значение и отображали на графике со стандартными отклонениями. Для сигмоидных участков графиков строили кривые аппроксимаций в GraphPad Prism10 (логистическая кривая 4PL, 95% доверительный интервал,  $n = 6$ ). рКа определяли по значению рН, при котором показатель нормированной флуоресценции на аппроксимирующей кривой достигал половины от максимального.

### Измерение времени жизни флуоресценции

*Наносекундный и пикосекундный источники возбуждения.* Коррелированный по времени подсчет одиночных фотонов (TCSPC) проводили на флуоресцентном спектрометре miniTau (Edinburgh Instruments, Великобритания) в окне 20 нс, разделенном на 2048 временных каналов. Флуоресценцию возбуждали с помощью: (i) пикосекундного лазера EPL-450 (Edinburgh Instruments, Великобритания)

с центральной длиной волны эмиссии 445.6 нм и шириной импульса (FWHM) примерно 90 пс при частоте повторения 20 МГц; (ii) наносекундного импульсного светодиода EPLED-590 (Edinburgh Instruments, Великобритания) с центральной длиной волны эмиссии 590 нм, шириной импульса (FWHM) примерно 1.3 нс при частоте повторения 20 МГц.

Фотоны регистрировали в спектральном диапазоне 575–625 нм. Обработку данных, визуализацию и определение  $\chi^2$  (тест Пирсона) проводили с использованием программного обеспечения Fluoracle 2.5.1 (Edinburgh Instruments, Великобритания).

#### *Фемтосекундный источник возбуждения.*

Кинетика затухания флуоресценции RFP была записана с использованием детектора единичных фотонов (SPC) с ультранизким уровнем темного счета (HPM-100-07C, Becker & Hickl, Германия) в спектральном окне 620/10, настроенном с помощью монохроматора ML-44 (Solar, Беларусь). Флуоресценцию возбуждали при 590 нм (частота повторения 80 МГц, ширина импульса 150 фс, оптическая мощность 5 мВт) с использованием второй гармоники (ASG-O, Avesta Project LTD., Россия) фемтосекундного оптического параметрического осциллятора (TOPOL-1050-C, Avesta Project LTD.), накачиваемого фемтосекундным лазером Yb (TEMA-150, Avesta Project LTD.). Сигнал эмиссии собирался перпендикулярно лучу возбуждения. Температуру образца поддерживали на уровне 25°C в течение эксперимента с помощью держателя кюветы (Qpod 2e) с магнитной мешалкой (Quantum Northwest, США). Данные собирали при помощи программного обеспечения SPCM Data Acquisition Software v. 9.89 (Becker & Hickl, Германия). Для экспоненциальной аппроксимации затухания флуоресценции с учетом неполного угасания RFP на высокой частоте повторения использовали ПО SPCImage (Becker & Hickl, Германия). Проводили постобработку и визуализировали данные в Origin Pro 2018 (OriginLab Corporation, США).

#### **Измерения фотостабильности**

*Очищенные белки, низкая интенсивность возбуждения.* Измерения проводили для RFP, иммобилизованных на металл-аффинной смоле TALON, с использованием лазерного сканирующего конфокального инвертированного микроскопа Leica DMIRE2 TCS SP2 (Leica Microsystems, Германия), оснащенного масляным иммерсионным объективом HCX PL APO lbd.BL 63× 1.4NA и HeNe-лазером мощностью 1.2 мВт. Флуоресценцию возбуждали лазером с линией испускания 543 нм и детектировали

в спектральном диапазоне 560–670 нм. Выбранное поле зрения (при увеличении 16×) непрерывно сканировали в режиме time-lapse (between the frames), количество изображений в серии 500–1500. Красный сигнал детектировали при мощности лазера 10–20% и напряжении фотоумножителя (ФЭУ, PMT) 700–800 В. Для фотообесцвечивания флуорофоров применяли максимальную мощность лазера (что обеспечивало плотность мощности около 2 Вт/см<sup>2</sup>). Измерения флуоресценции корректировали на фоновый сигнал, усредняли ( $n = 5$ ) и нормировали по максимальному значению. Общую мощность возбуждающего света на выходе из объектива микроскопа измеряли с использованием измерителя мощности LaserCheck (Coherent, США). Плотность мощности излучения (Вт/см<sup>2</sup>) определяли как частное общей мощности и площади сканируемой области.

#### *Измерения фотостабильности in cellulose, высокая интенсивность возбуждения.*

RFP транзитивно экспрессировали в клетках линии HeLa без сигнала специфической внутриклеточной локализации. Кинетику фотообесцвечивания измеряли на микроскопе Nanoimager S (ONI, Великобритания), оснащенный масляным иммерсионным объективом Olympus UPlanSApo 100× NA 1.40, лазером с длиной волны 561 нм, дихроическим делителем луча 560 нм и камерой Scope8 sCMOS. Плотность мощности при облучении составляла 800 Вт/см<sup>2</sup>. Сигнал записывали непрерывно с минимальными задержками между кадрами. Данные анализировали с использованием Fiji ImageJ версии 1.53f51 [28].

#### **Микроскопия локализации одиночных молекул**

Непосредственно перед визуализацией культуральную среду заменяли на минимальную среду (MEM, Sigma-Aldrich, США), содержащую 20 мМ HEPES. Для локализационной микроскопии с использованием фотообесцвечивания/мигания (BALM) использовали микроскоп Nanoimager S (ONI, Великобритания), оснащенный масляным иммерсионным объективом Olympus UPlanSApo ×100 NA 1.40, лазером 561 нм, дихроическим делителем луча 560 нм и камерой Scope8 sCMOS. Визуализацию выполняли при следующих условиях: лазер 561 нм с мощностью 2 кВт/см<sup>2</sup>, временем регистрации кадра 16.7 мс и скоростью захвата 60 кадров в секунду. Съёмку с использованием вспышек лазера 405 нм проводили при следующих условиях: лазер 561 нм с мощностью 2 кВт/см<sup>2</sup> с 0.4-секундными вспышками лазера 405 нм с плотностью мощности ~215 Вт/см<sup>2</sup> каждые 22 с, временем регистрации кадра 16.7 мс и скоростью захвата 60 кадров/с.

Различие между отношением сигнал/шум локализаций mKate2-K67R/R197H, TagRFP-T и mKate2 проверяли с использованием теста Колмогорова–Смирнова. Мигания одиночных молекул и реконструкцию сверхразрешенных изображений осуществляли с использованием программного обеспечения NimOS 490 версии 1.18.3.15066 (ONI, Великобритания). Для реконструкции изображения использовали стандартные параметры. Данные анализировали с использованием Fiji ImageJ версии 1.53f51 [29] и пользовательских скриптов на Python 3.9.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Положения 67, 158 и 197 ранее были идентифицированы как ключевые, регулирующие поведение хромофора FusionRed [20]. Чтобы конкретизировать вклад отдельных аминокислотных замен в окружении хромофоров FusionRed и mKate2, определяющих различия между физико-химическими свойствами этих белков, мы провели систематический мутационный анализ. Мутантные варианты в полученном наборе отличались от родительских белков по одному, двум либо трем указанным аминокислотным положениям (*рис. S1*).

### Характеристика мутантных вариантов FusionRed и mKate2

*Варианты, несущие одиночные аминокислотные замены.* Показаны различия в эффектах замены в положении 67 (Arg→Lys) в исходных белках. Так, вариант mKate2-K67R практически не поглощал и не излучал в видимом диапазоне спектра. Эта аминокислотная замена, вероятно, существенно повлияла на сворачивание белка и/или созревание его хромофора. Напротив, обнаружено несколько спектральных форм FusionRed-R67K, которые, вероятно, соответствуют различным структурам хромофора (*табл. 1, рис. S2*). Пики поглощения FusionRed-R67K совпадали с пиками возбуждения флуоресценции: 389, 514 и 580 нм. Красная флуоресцентная форма ( $\lambda_{\text{abs/ex}} = 580$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 610$  нм) была близка к таковой в исходном FusionRed, в то время как обе коротковолновые спектральные популяции, предположительно, соответствовали интермедиатам «созревания» хромофора.

Мы предполагаем, что синяя спектральная форма ( $\lambda_{\text{abs/ex}} = 389$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 450$  нм) соответствует нейтральному GFP-подобному хромофору – хорошо описанному промежуточному продукту созревания DsRed-подобного хромофора [30, 31]. Желтая флуоресцентная форма ( $\lambda_{\text{abs/ex}} = 514$  нм,  $\lambda_{\text{em}} = 522$  нм) FusionRed-R67K, спектрально схожая с классиче-

скими желтыми флуоресцентными белками (EYFP, TagYFP) с GFP-подобным хромофором, формирующим  $\pi$ -стекинг-взаимодействие с остатком тирозина-203 [32], менее типична для RFP. Возможно, замена R67K привела к частичному «замораживанию» созревания хромофора FusionRed на предпоследнем этапе окисления, где GFP-подобный интермедиат хромофора в анионной форме (обычно поглощающий на 470–500 нм) мог сформировать стекинг-взаимодействие с имидазольным кольцом гистидина-197, претерпев батохромный спектральный сдвиг.

Влияние замены в позиции 158 (Cys→Ala) на спектральные свойства FusionRed и mKate2 было описано ранее [20]. Хотя эта замена не привела к образованию новых спектральных форм или сильному ингибированию созревания хромофора (или заметным изменениям молекулярной яркости), мы включаем данные о соответствующих мутантах (FusionRed-C158A и mKate2-A158C) в *табл. 1* для единообразия.

Замены в положении 197 (His→Arg) вызывали изменения физико-химических свойств белков, противоположные вызванным заменой R67K/K67R. Подобно mKate2-K67R, FusionRed-H197R практически не поглощал в видимом спектральном диапазоне и почти не флуоресцировал в силу нарушенного созревания хромофора. Максимумы поглощения mKate2-R197H располагались на длинах волн 385, 510 и 582 нм. Последние две соответствовали также максимумам возбуждения флуоресценции с  $\lambda_{\text{em}} = 520$  и 612 нм соответственно (*табл. 1, рис. S3*). Идентичность и происхождение этих спектральных форм предположительно совпадают с таковыми для FusionRed-R67K. Выраженный гипсохромный сдвиг максимумов поглощения/эмиссии красной формы mKate2-R197H по сравнению с исходным белком mKate2 (582/612 нм против 588/633 нм) подтверждает ключевую роль His-197 в детерминировании спектрального своеобразия FusionRed.

*Варианты, содержащие комбинации из двух аминокислотных замен.* Введение двух аминокислотных замен в оба белка в целом снижало эффективность созревания хромофора. Три из шести полученных вариантов с двумя заменами имели либо чрезвычайно слабые, либо не детектируемые полосы поглощения и эмиссии флуоресценции в видимом диапазоне (см. *табл. 1*). У сравнительно яркого варианта FusionRed-R67K/H197R замены в позициях 67 и 197 компенсировали эффекты друг друга. В этом белке замена R67K, по видимому, способствует «разблокированию» созревания хромофора, которое ингибируется заменой H197R. У FusionRed-R67K/H197R обнаружены три

Таблица 1. Спектральные свойства и особенности созревания хромофора, наблюдаемые в наборе одиночных, двойных и тройных реципрокных мутантных вариантов FusionRed и mKate2

Белок	Максимум поглощения, нм	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ , нм	EC <sup>a</sup> (M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )	FQY <sup>b</sup>	Молекулярная яркость (EC×QY/1000)	Комментарий
FusionRed- R67K/C158A/H197R	376; 488; 583	376/409; 488/508; 583/616	н/о	<0.05	н/о	Плохое созревание*
FusionRed- C158A/H197R	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	Плохое созревание*
<b>FusionRed- R67K/H197R</b>	<b>380; 488; 584</b>	<b>380/449; 488/511; 584/616</b>	<b>н/о</b>	<b>0.62</b>	<b>н/о</b>	
FusionRed- R67K/C158A	386; 513; 580	н/о	н/о	н/о	н/о	Плохое созревание*
FusionRed-H197R	н/о	570/607	н/о	<0.01	н/о	Плохое созревание*
<b>FusionRed-C158A</b>	<b>571</b>	<b>571/598</b>	<b>91 000</b>	<b>0.24</b>	<b>21.84</b>	<b>[20]</b>
<b>FusionRed-R67K</b>	<b>389; 514; 580</b>	<b>389/450; 514/522; 580/610</b>	<b>н/о</b>	<b>0.3</b>	<b>н/о</b>	
<b>FusionRed</b>	<b>580</b>	<b>580/608</b>	<b>94 500</b>	<b>0.19</b>	<b>17.9</b>	<b>[10]</b>
<b>mKate2</b>	<b>586</b>	<b>588/633</b>	<b>62 500</b>	<b>0.4</b>	<b>25</b>	<b>[21, 33]</b>
mKate2-K67R	405; 588	н/о	н/о	н/о	н/о	Плохое созревание*
<b>mKate2-A158C</b>	<b>380; 590</b>	<b>590/624</b>	<b>47 300</b>	<b>0.47</b>	<b>22.2</b>	<b>[20]</b>
<b>mKate2-R197H</b>	<b>385; 510; 582</b>	<b>510/520; 582/612</b>	<b>н/о</b>	<b>0.26</b>	<b>н/о</b>	
mKate2-K67R/A158C	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	Плохое созревание*
<b>mKate2-K67R/R197H</b>	<b>579</b>	<b>579/603</b>	<b>90 000</b>	<b>0.44</b>	<b>39.6</b>	
<b>mKate2-A158C/R197H</b>	<b>380; 513; 583</b>	<b>380/435; 583/611</b>	<b>н/о</b>	<b>0.39</b>	<b>н/о</b>	
mKate2-K67R/A158C/R197H	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	Плохое созревание*

Примечание. н/о – не определен.

<sup>a</sup>Коэффициент молярной экстинкции; не определялся для вариантов с несколькими спектральными формами.

<sup>b</sup>Квантовый выход флуоресценции; измерялся только для красной спектральной формы.

\*Пометка применялась в случаях, если через 48 ч после трансформации наблюдалась слабая или не детектируемая флуоресценция биомассы бактерий и/или низкое относительное поглощение в спектральном диапазоне, связанном с поглощением хромофора (например, A280/A580 > 10).

флуоресцентные формы (табл. 1, рис. S4): нейтральная синяя GFP-подобная ( $\lambda_{abs/ex} = 380$  нм,  $\lambda_{em} = 449$  нм), анионная зеленая GFP-подобная ( $\lambda_{abs/ex} = 488$  нм,  $\lambda_{em} = 511$  нм) и красная DsRed-подобная ( $\lambda_{abs/ex} = 584$  нм,  $\lambda_{em} = 616$  нм). Красная флуоресцентная форма FusionRed-R67K/H197R показала выраженный батохромный сдвиг как спектра поглощения, так и спектра эмиссии флуоресценции (на 4 и 8 нм соответственно) по сравнению с исходным FusionRed, что дополнительно указывает на роль заместителя в позиции 197 в детерминировании спектрального своеобразия красных флуоресцентных белков.

Вариант mKate2-A158C/R197H показал сложное спектральное поведение (табл. 1, рис. S5), схожее с наблюдаемым у белков FusionRed R67K и mKate2 R197H. Замена R197H в mKate2-A158C/R197H, веро-

ятно, привела к гипсохромному сдвигу спектра флуоресценции красной формы и вовлечению незрелой «зеленой» формы хромофора в стеккинг-взаимодействие, приводящее к образованию «желтой» нефлуоресцентной спектральной формы с максимумом поглощения при 513 нм. Среди всех полученных реципрокных вариантов только mKate2-K67R/R197H показал высокую скорость созревания хромофора и молекулярную яркость. Квантовый выход флуоресценции 0.44 и коэффициент экстинкции 90 000 делают его в 1.6 раза ярче, чем mKate2, и в 2.2 раза ярче, чем FusionRed. В отличие от исходного белка этот вариант не имел дополнительных коротковолновых пиков поглощения на ~390 и ~450 нм, которые мы приписываем незрелым формам хромофора. У смещенной в синюю область основной полосы поглощения mKate2-K67R/R197H присутствовало

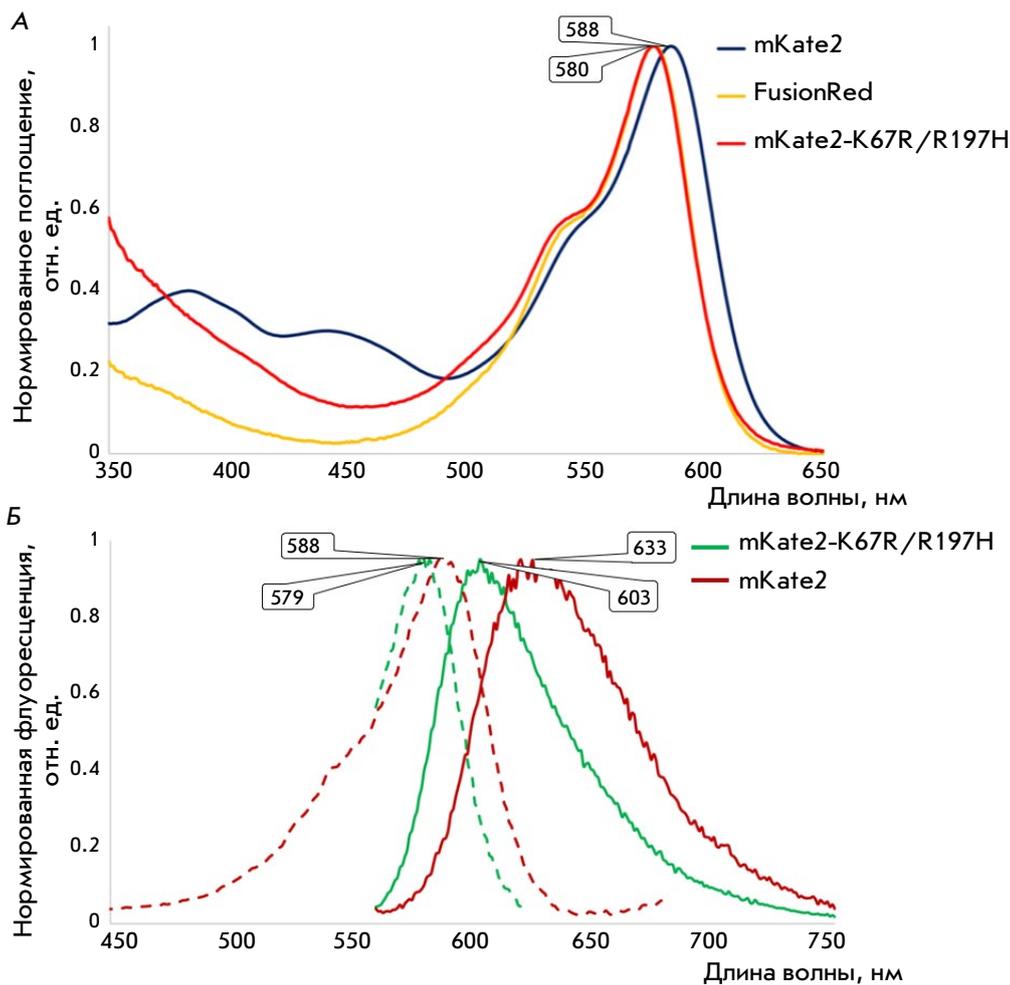


Рис. 1. Сравнение спектров поглощения (А) и флуоресценции (Б) mKate2-K67R/R197H, mKate2 и FusionRed (только поглощение). Длины волн максимумов основных полос показаны в пузырьках. На панели Б пунктирные линии соответствуют возбуждению флуоресценции, а сплошные линии – эмиссии флуоресценции

Таблица 2. Спектральные характеристики mKate2, FusionRed и mKate2-K67R/R197H (Diogenes)

Белок	$\lambda_{ex}$ , нм	$\lambda_{em}$ , нм	EC (M <sup>-1</sup> · см <sup>-1</sup> )	FQY	Молекулярная яркость (EC · FQY/1000)	Время жизни флуоресценции, нс <sup>#</sup>
mKate2	588	633	62500	0.4	25	2.4 <sup>1</sup> /2.05 <sup>1</sup>
FusionRed	580	608	94500	0.19	17.955	1.6 <sup>2</sup>
mKate2-K67R/R197H	579	603	90000	0.44	39.6	2.2 <sup>1</sup>

#Взвешенное по интенсивностям среднее время жизни флуоресценции. Показаны два времени жизни mKate2, полученные при разных режимах съемки (см. раздел «Измерение времени жизни флуоресценции»).

<sup>1</sup>Моноэкспоненциальное затухание с  $\chi^2 \leq 1.3$ .

<sup>2</sup>Бизэкспоненциальное затухание с  $\chi^2 \leq 1.3$ .

ярко выраженное плечо при ~540 нм, характерное для FusionRed (табл. 1 и 2, рис. 1).

*Варианты, содержащие комбинации из трех аминокислотных замен.* Введение полного набора замен в положениях 67/158/197 значительно повлияло на созревание белков. Полосы поглощения и эмиссии флуоресценции в видимом диапазоне обоих вариантов, содержащих замены по трем положениям (mKate2-K67R/A158C/R197H и FusionRed-C158A/H197R/R67K),

не детектировались либо были чрезвычайно слабыми (см. табл. 1), что указывает на «замораживание» созревания хромофора на ранних стадиях. Эти варианты оказались малоинформативными для определения молекулярных детерминант спектрального своеобразия FusionRed/mKate2.

Наш фенотипический анализ указывает на вероятное смещение хромофора внутри  $\beta$ -бочонка в результате внесения замены в положение 67, так как спектроскопические признаки

$\pi$ -стекингового взаимодействия хромофора с гистицином-197 (если обнаруживались) отличались у мутантов по этому положению от родительских белков. Замены в обоих этих положениях (67 и 197) во всех случаях, кроме mKate2-K67R/R197H, либо значительно влияли на созревание хромофора, либо приводили к возникновению коротковолновых спектральных форм, соответствующих промежуточным стадиям созревания хромофора. Замены в положении 197 вызывали спектральные сдвиги: батохромный сдвиг поглощения/эмиссии у производных FusionRed и гипсохромный сдвиг у производных mKate2. Мы предполагаем, что причиной этого может быть  $\pi$ -стекинговое взаимодействие между хромофором и гистицином-197, которое включается/выключается за счет внесенных мутаций. Кроме того, эти мутации оказывают заметное влияние на процесс созревания хромофора.

### Физико-химические свойства mKate2-K67R/R197H и его применение в микроскопии

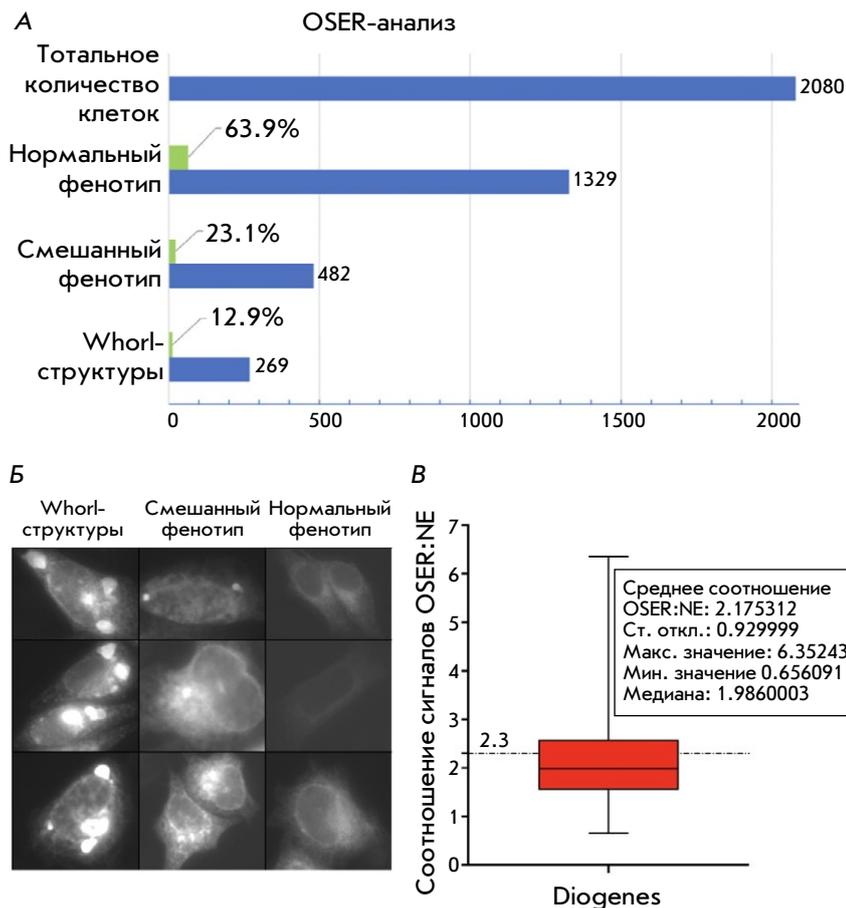
Далее мы детально охарактеризовали физико-химические свойства мутанта mKate2-K67R/R197H, который назвали Diogenes, с акцентом на его применение в клеточной флуоресцентной микроскопии.

*Олигомерное состояние и флуоресцентное мечение.* Так как олигомеризация значительно влияет на инвазивность и эффективность мечения внутриклеточных мишеней, мы в первую очередь проанализировали олигомерный статус Diogenes. При гель-фильтрации (рис. S6, рис. S7) очищенный белок элюировался в виде одного пика с молекулярной массой около 38 кДа (при концентрации по крайней мере до 5 мг/мл). Поскольку эта молекулярная масса не соответствовала ни мономеру (~25 кДа), ни димеру (~50 кДа), результат гель-фильтрации нельзя было однозначно интерпретировать. Предполагается, что в водном растворе концентрированный Diogenes либо строго мономерен, либо формирует исключительно димерную форму – с аномальной хроматографической подвижностью в обоих случаях. Возможно, Diogenes формирует равновесную смесь мономерных и димерных форм.

mKate2 изначально был описан как мономер [21], но в дальнейшем была показана некоторая его склонность к олигомеризации в водных растворах при высокой концентрации [10] и *in cellulose* [12]. Так как Diogenes получен из mKate2, предположили, что он обладает подобной склонностью. Важно было также сравнить Diogenes с его спектральным аналогом FusionRed, который в ходе разработки подвергся значительной оптимизации внешней по-

верхности  $\beta$ -бочонка, направленной на устранение остатков, потенциально важных для димеризации [10]. Действительно, очищенный FusionRed ведет себя как строгий мономер [10] и показывает более высокий ранг мономерности, чем mKate2, при исследовании в живых клетках ( $91.5 \pm 3.0\%$  против  $81.1 \pm 6.1\%$  в анализе OSER [12]). Однако причинно-следственная связь между улучшенными показателями FusionRed *in cellulose* и введенными мутациями остается неясной, поскольку рациональный дизайн этих замен опирался на пространственную структуру mKate [34], а не mKate2. Более того, сворачивание белка и молекулярные взаимодействия в кристаллах могут не полностью соответствовать наблюдаемому в водной фазе [35, 36]. В любом случае неоднозначная хроматографическая картина Diogenes побудила нас оценить его олигомерное состояние также *in cellulose*.

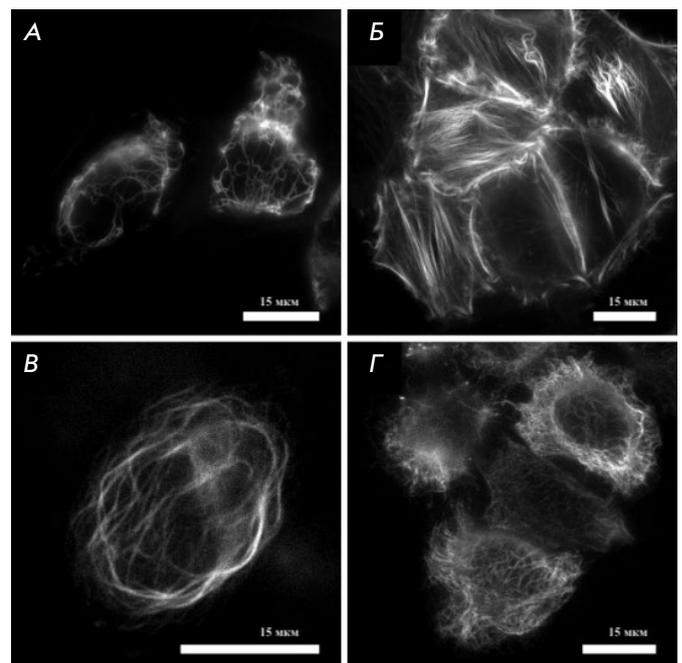
С этой целью мы применили анализ структур организованного гладкого эндоплазматического ретикулума (OSER) [23], который стал фактическим стандартом оценки мономерности флуоресцентных белков при экспрессии в клетках млекопитающих [12, 37]. Мы провели OSER-анализ двумя способами. В клетках линии HeLa применяли широко используемую упрощенную фенотипическую оценку частотности клеточных OSER-фенотипов. В клетках линии U2OS в соответствии с оригинальной методикой, предложенной Costantini и соавт., определяли соотношение флуоресцентных сигналов OSER:NE в каждой клетке. В клетках HeLa выявлено ~87% клеток без завитков (рис. 2A), что указывает на относительно высокую мономерность. Полученное значение упрощенной оценки Diogenes находится между значениями для FusionRed и mKate2, опубликованными ранее [12]. Следует отметить, что помимо очевидных OSER- и не-OSER-фенотипов мы наблюдали фракцию клеток, обладающую фенотипическими признаками, которые, вероятно, не следует относить к типичному фенотипу гладкого ЭР (мелкие точки, гранулы, локальные области с повышенной яркостью). Мы обозначили эту группу, составляющую ~23% от всей популяции клеток, как «смешанный фенотип» (рис. 2B). Обнаруженные нетипичные структуры могут указывать на агрегацию белка или его неспецифические взаимодействия с внутриклеточной средой, что, возможно, ограничивает его применимость для решения некоторых специфических задач. Среднее отношение OSER:NE Diogenes, выявленное при анализе OSER в U2OS, составило 2.175 с медианой 1.986 и стандартным отклонением 0.9299 (рис. 2B). Несмотря на относительно большое стандартное отклонение как среднее OSER : NE, так и медиана позволяют



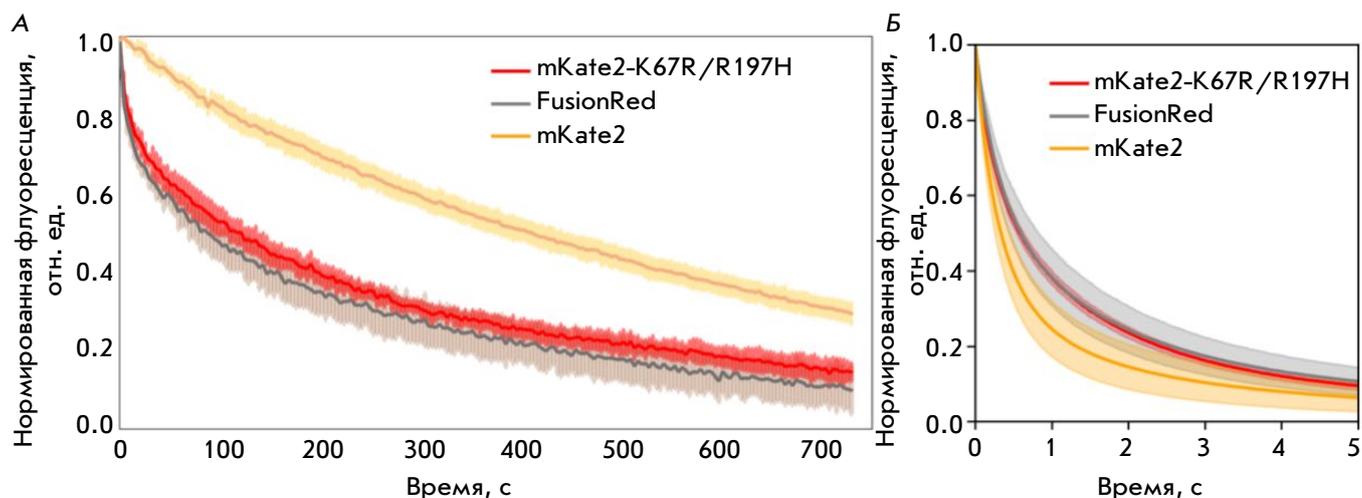
**Рис. 2.** Результаты OSER-анализа Diogenes. **А** – гистограмма, показывающая общее количество клеток (HeLa) и распределение трех фенотипов между ними. Столбец «Whorl-структуры» характеризует клетки, в которых гомоолигомеризация метки привела к образованию типичных структур организованного гладкого эндоплазматического ретикулума (OSER) («завитков», whorls), как они были описаны [12, 23]. Строка «Смешанный фенотип» представляет случаи, где наблюдаются артефакты, отличные от типичных «завитков» (мелкие точки, гранулы, области с локально повышенной яркостью). Строка «Нормальный фенотип» иллюстрирует клетки с равномерно окрашенной трубчатой сетью ЭР. **Б** – иллюстрация фенотипов, наблюдаемых в живых клетках HeLa при OSER-анализе. **В** – количественный анализ соотношения интенсивности OSER : NE в живых клетках U2OS. Красный прямоугольник обозначает 25–75 процентиль; усы обозначают минимальное и максимальное значение выборки. Горизонтальная линия внутри прямоугольника обозначает медиану; штрихпунктирная линия на уровне 2.3 обозначает пороговое значение OSER : NE для мономера [23]. Описательная статистика данных показана на вставке

нам считать Diogenes мономерным белком при установленном ранее пороговом значении OSER : NE  $\leq 2.3 \pm 0.6$  [23]. Наконец, мы подготовили несколько экспрессионных конструкций для визуальной оценки эффективности Diogenes в качестве флуоресцентного ядра в слитых белках в клетках млекопитающих. В качестве мишеней были выбраны белки цитоскелета, качество визуализации которых, согласно нашему опыту, существенно зависит от степени олигомеризации метки (рис. 3). Субъективно мы оцениваем качество мечения как очень высокое.

**pH-стабильность Diogenes.** Сравнение интенсивностей флуоресценции Diogenes и родственных ему mKate2 и FusionRed в диапазоне pH 3–11 (рис. S8, S9) продемонстрировало высокую pH-стабильность Diogenes, аналогичную стабильности mKate2, одного из наиболее pH-стабильных RFP. В частности, Diogenes поддерживает уровень флуоресценции  $\geq 80\%$  от максимального в наиболее физиологически и биохимически значимом диапазоне (pH 6.5–9.5). В кислом диапазоне (pH 3–6) Diogenes показал худшую относительную яркость, чем FusionRed, но немного превзошел mKate2. Значения pKa у Diogenes, FusionRed и mKate2 составили 6.1, 5.76 и 6.16 со-



**Рис. 3.** Флуоресцентные изображения внутриклеточных структур, меченных Diogenes в живых HeLa Kyoto. Виментин (А), лайфакт (Б), энксонсин (В), цитокератин (Г)



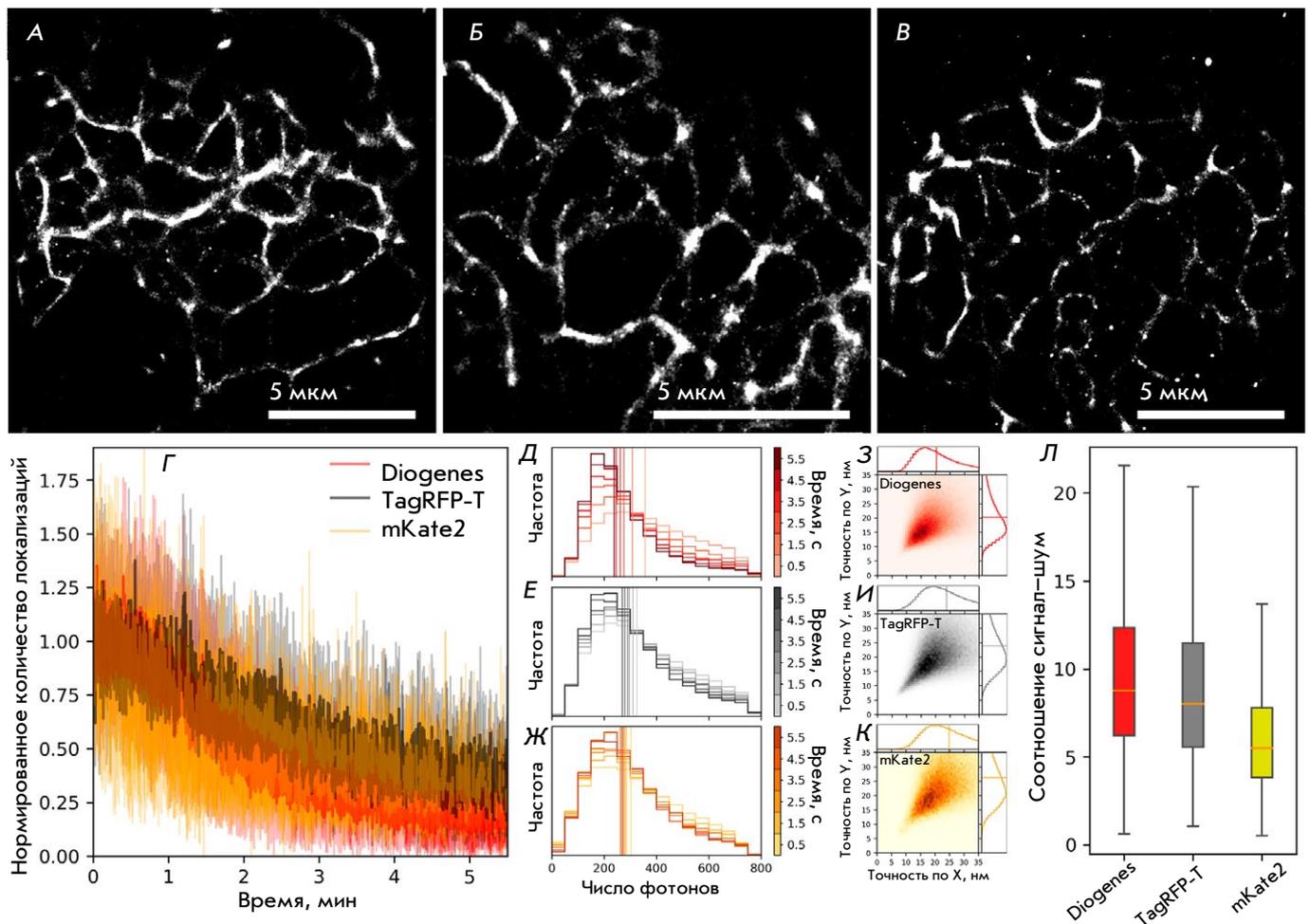
**Рис. 4.** Кинетика фотообесцвечивания RFP mKate2-K67R/R197H (Diogenes), mKate2 и FusionRed в водном растворе очищенного белка при плотности мощности возбуждения  $\sim 2 \text{ Вт/см}^2$  (А) и живых клетках HeLa при  $\sim 1 \text{ кВт/см}^2$  (Б). Сплошные линии указывают среднюю интенсивность флуоресценции во время фотообесцвечивания. Прозрачные области показывают стандартное отклонение (пять покрытых белком частиц металл-аффинной смолы либо 20 клеток для каждого флуоресцентного белка)

ответственно (рис. S9). В отличие от обоих родственных белков, у Diogenes интенсивность флуоресценции резко снижалась в щелочном диапазоне (pH 10–11), не имеющем, однако, большого биологического значения.

**Время жизни флуоресценции.** Мы измерили кинетику затухания флуоресценции очищенного mKate2-K67R/R197H в водном растворе, используя метод коррелированного по времени счета отдельных фотонов (TCSPC) в трех различных аппаратных конфигурациях (рис. S10–S12). Во всех случаях затухание флуоресценции Diogenes было моноэкспоненциальным со значением времени жизни  $\sim 2.2$  нс. Аналогично, во всех аппаратных конфигурациях наблюдалось биэкспоненциальное затухание флуоресценции FusionRed со средним (взвешенным по интенсивности) временем жизни  $\sim 1.6$  нс. Время жизни флуоресценции mKate2, однако, зависело от оборудования. Так, при возбуждении пикосекундным лазером 450 нм (FWHM  $\sim 100$  пс, 20 МГц) и наносекундным импульсным светодиодом 590 нм (FWHM  $\sim 1.5$  нс, 20 МГц) его время жизни составило 2.4 нс (см. рис. S10 и рис. S12), тогда как при возбуждении фемтосекундным лазером 590 нм (FWHM  $\sim 150$  фс, 80 МГц) – 2.05 нс (рис. S11). Причины этого явления остаются неясными. Оно может быть следствием процессов, происходящих в mKate2 и родственных белках в возбужденном состоянии [30, 38]. Принимая во внимание длины волн возбуждения/эмиссии флуоресценции Diogenes, mRuby

[39] или mRuby2 [40] можно рассматривать как его близких конкурентов с точки зрения яркости/времени жизни флуоресценции.

**Фотостабильность Diogenes.** При выборе метки для традиционной флуоресцентной визуализации и микроскопии с высоким пространственным и временным разрешением [41] важно учитывать ее высокую фотостабильность. Однако известно, что динамика фотообесцвечивания метки может нелинейно зависеть от мощности источника возбуждения [12, 41]. Поэтому мы измерили фотостабильность Diogenes в двух различных модельных системах (см. рис. 4). Очищенный Diogenes в водной среде (иммобилизованный на микрочастицах) оказался несколько стабильнее FusionRed при плотности мощности, типичной для широкопольного флуоресцентного микроскопа ( $\sim 2 \text{ Вт/см}^2$ ) (время полуобесцвечивания  $t_{1/2}$  составило 215 с у Diogenes против 165 с у FusionRed). При этом Diogenes оказался значительно менее фотостабильным, чем mKate2 ( $t_{1/2} \sim 590$  с, рис. 4А). Однако при высокоинтенсивном ( $\sim 1 \text{ кВт/см}^2$ ) возбуждении, типичном для микроскопии одиночных молекул (single molecule localization microscopy, SMLM) в живых клетках HeLa, новый RFP показал примерно в 2 раза более высокую фотостабильность, чем mKate2 (рис. 4Б), и мало отличался от FusionRed, обладающего значительно меньшей молекулярной яркостью, что позволяло ожидать большую фотостабильность.



**Рис. 5.** Сравнение результатов микроскопии сверхвысокого разрешения при визуализации живых клеток HeLa, экспрессирующих Diogenes, TagRFP-T и mKate2, слитые с виментином (лазер 2 кВт/см<sup>2</sup> 561 нм, время кадра 16.7 мс, 20 000 кадров). Сверхразрешенные изображения HeLa, временно экспрессирующих виментин-Diogenes, виментин-TagRFP-T и виментин-mKate2 соответственно (А, Б, В). Стабильность плотности локализации Diogenes, TagRFP-T и mKate2 соответственно (Г). Гистограмма изменений числа обнаруженных фотонов на событие с одиночной молекулой Diogenes, TagRFP-T и mKate2 соответственно; вертикальные линии представляют собой медианные значения (Д, Е, Ж). 2D-гистограммы точности локализации на событие с одиночной молекулой Diogenes, TagRFP-T и mKate2 соответственно (З, И, К); медианные значения показаны как вертикальные линии на 1D-гистограммах. Отношение сигнал/шум обнаруженных локализаций (Л); усы показывают стандартное отклонение, оранжевые горизонтальные линии указывают медианные значения

**Поведение mKate2-K67R/R197H в режиме детекции одиночных молекул**

Увеличенная фотостабильность Diogenes при высокой мощности возбуждения, аналогичной применяемой в SMLM, побудила нас исследовать Diogenes на уровне одиночных молекул. Предварительные измерения, выполненные с использованием настроек флуоресцентного микроскопа сверхвысокого разрешения, подобных dSTORM, на каплях очищенного белка, выявили выраженное стохастическое мигание (blinking) Diogenes (данные не показаны). Важно, что красные и дальнекрасные FP, включая mScarlet, mKate2, TagRFP, FusionRed и FusionRed-

MQ, хотя и демонстрируют мигание [28, 42, 43], в основном уступают зеленым флуоресцентным белкам [42] в режиме визуализации одиночных молекул. Поэтому в методах SMLM, в которых спонтанное мигание используется для уточнения локализации меченых молекул, эта способность имеет важное значение для оценки новых вариантов RFP.

Мы изучили спонтанное мигание Diogenes *in cellulo* и его применимость для визуализации внутриклеточных структур с улучшенным разрешением с помощью микроскопии одиночных молекул (SMLM). Для сравнения мы использовали родительский белок mKate2 и обладающий самым

выраженным миганием среди исследованных RFP TagRFP-T [42]. Сравнение поведения одиночных молекул Diogenes, TagRFP-T и mKate2, слитых с виментином, проводили в модельной системе, где они временно экспрессировались в живых клетках HeLa (рис. 5).

При плотности мощности лазерного излучения 2 кВт/см<sup>2</sup> при 561 нм и времени кадра 16.7 мс все белки мигали на уровне одиночных молекул, позволяя получить изображения волокон виментина сверхвысокого разрешения в живых клетках HeLa (рис. 5А–В). Согласно результатам сравнительного анализа, стабильность плотности локализаций была сходной у всех трех белков (рис. 5Г). Кроме того, разница в медианном значении яркости одиночной молекулы сравниваемых белков не была значимой (рис. 5Д–Ж). Точность локализаций Diogenes оказалась выше, чем у mKate2 и TagRFP-T (20.5 нм против 24 нм и 25 нм соответственно, рис. 5З–К), в то время как медианное значение отношения сигнал/шум у Diogenes было примерно в 1.5 раза выше, чем у mKate2, хотя статистически значимые различия в общих наборах значений сигнал/шум отсутствовали (рис. 5Л). Таким образом, эффективность Diogenes в SMLM живых клеток находится на одном уровне или превышает эффективность TagRFP-T, показанную ранее для этого метода микроскопии [42]. Однако он уступает по стабильности плотности локализаций, молекулярной яркости и точности локализаций зеленым флуоресцентным белкам, способным к спонтанному миганию (например, mNeonGreen [44] и mBaoJin [45]). Интересно, что дополнительное облучение лазером с длиной волны 405 нм во время визуализации повлияло на плотность локализаций всех трех белков (рис. S13). Короткие импульсы фиолетового лазера (плотность мощности около 200 Вт/см<sup>2</sup>) значительно увеличили количество зарегистрированных локализаций для всех трех белков. Хотя этих экспериментальных данных недостаточно для однозначного вывода о природе этого явления, можно предположить, что коротковолновое излучение дополнительно влияет на созревание хромофора и/или переключает хромофор из долгоживущего темного во флуоресцентное состояние (например, путем *цис-транс*-изомеризации хромофора).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом исследовании мы систематически проанализировали библиотеку реципрокных мутантов дальнекрасного флуоресцентного белка mKate2 и дочернего FusionRed для определения влияния трех остатков в окружении хромофора (Arg/Lys-67, Cys/Ala-158, His/Arg-197) на фотофизические иден-

тичности этих широко используемых генетически кодируемых меток.

Один из представителей полученной библиотеки, mKate2-K67R/R197H, который мы назвали Diogenes, показал хорошее сочетание физико-химических и спектральных свойств и, по нашему мнению, представляет собой перспективную метку как для традиционных методов флуоресцентной микроскопии, так и для более новых модальностей с высоким временным (FLIM) и пространственным (SMLM) разрешением. Он наследует преимущества обоих родительских RFP, в частности, моноэкспоненциальное затухание флуоресценции, как mKate2, хорошую эффективность в белках слияния, как FusionRed, и высокую молекулярную яркость, превосходящую яркость обоих упомянутых RFP. По мономерности Diogenes превосходит родительский mKate2 и, возможно, приближается к уровню FusionRed. Стоит отметить относительно высокую фотостабильность Diogenes (особенно при нормировке на молекулярную яркость белка) в условиях интенсивного облучения, а также его способность к фотоактивации, индуцированной облучением (405 нм) и потенциально применимой для модуляции его поведения на уровне одиночных молекул в условиях многофотонной микроскопии живых клеток. Наши результаты косвенно указывают на присутствие в популяции молекул Diogenes некоторого количества молекул в переходных темновых состояниях (рис. S10). Вместе с данными абсорбционной спектроскопии (рис. 1А) это может свидетельствовать о более высоком качестве созревания хромофора и его стерической адаптации внутри молекулы белка по сравнению с родственными RFP.

Отметим, что по сравнению со своим спектральным аналогом (FusionRed) Diogenes несет минимальное количество мутаций относительно родительского mKate2. Более того, комбинация замен (K67R/R197H), обнаруженная при анализе реципрокной библиотеки, ранее была независимо перенесена из яркого, но склонного к олигомеризации белка TagRFP, в практически нефлуоресцентный мономер mKate2.5 для получения FusionRed [10]. Как и FusionRed [18, 46], Diogenes может стать отправной точкой дальнейших полурациональных улучшений красных флуоресцентных белков, в частности, использующих современные высокопроизводительные подходы. ●

Работа поддержана грантом Российского  
научного фонда (РНФ) № 23-24-00011.

Приложения доступны на сайте  
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.27545>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cardarelli F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 11. P. 4164.
2. Rodriguez E.A., Campbell R.E., Lin J.Y., Lin M.Z., Miyawaki A., Palmer A.E., Shu X., Zhang J., Tsien R.Y. // *Trends Biochem. Sci.* 2017. V. 42. № 2. P. 111–129.
3. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 10. P. 969–973.
4. Wiedenmann J., Schenk A., Röcker C., Girod A., Spindler K.-D., Nienhaus G.U. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 18. P. 11646–11651.
5. Schnitzler C.E., Keenan R.J., McCord R., Matysik A., Christianson L.M., Haddock S.H.D. // *Mar. Biotechnol. N. Y. N.* 2008. V. 10. № 3. P. 328–342.
6. Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A., Gadella T.W.J., et al. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. № 7. P. 555–557.
7. Weissleder R. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 4. P. 316–317.
8. Frangioni J.V. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. V. 7. № 5. P. 626–634.
9. Smith A.M., Mancini M.C., Nie S. // *Nat. Nanotechnol.* 2009. V. 4. № 11. P. 710–711.
10. Shemiakina I.I., Ermakova G.V., Cranfill P.J., Baird M.A., Evans R.A., Souslova E.A., Staroverov D.B., Gorokhovatsky A.Y., Putintseva E.V., Gorodnicheva T.V., et al. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 1204.
11. Costantini L.M., Balaban M., Markwardt M.L., Rizzo M.A., Guo F., Verkhusha V.V., Snapp E.L. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7670.
12. Cranfill P.J., Sell B.R., Baird M.A., Allen J.R., Lavagnino Z., de Gruiter H.M., Kremers G.-J., Davidson M.W., Ustione A., Piston D.W. // *Nat. Methods.* 2016. V. 13. № 7. P. 557–562.
13. Kost L.A., Nikitin E.S., Ivanova V.O., Sung U., Putintseva E.V., Chudakov D.M., Balaban P.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 9. P. e0184225.
14. Shen Y., Dana H., Abdelfattah A.S., Patel R., Shea J., Molina R.S., Rawal B., Rancic V., Chang Y.-F., Wu L., et al. // *BMC Biol.* 2018. V. 16. № 1. P. 9.
15. Kost L.A., Ivanova V.O., Balaban P.M., Lukyanov K.A., Nikitin E.S., Bogdanov A.M. // *Sensors.* 2019. V. 19. № 13. P. 2982.
16. Yoon S., Pan Y., Shung K., Wang Y. // *Sensors.* 2020. V. 20. № 17. P. 4998.
17. Manna P., Hung S.-T., Mukherjee S., Friis P., Simpson D.M., Lo M.N., Palmer A.E., Jimenez R. // *Integr. Biol. Quant. Biosci. Nano Macro.* 2018. V. 10. № 9. P. 516–526.
18. Mukherjee S., Hung S.-T., Douglas N., Manna P., Thomas C., Ekrem A., Palmer A.E., Jimenez R. // *Biochemistry.* 2020. V. 59. № 39. P. 3669–3682.
19. Lambert T.J. // *Nat. Methods.* 2019. V. 16. № 4. P. 277–278.
20. Muslinkina L., Pletnev V.Z., Pletneva N.V., Ruchkin D.A., Kolesov D.V., Bogdanov A.M., Kost L.A., Rakitina T.V., Agapova Y.K., Shemyakina I.I., et al. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2020. V. 155. P. 551–559.
21. Shcherbo D., Murphy C.S., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Chepurnykh T.V., Shcheglov A.S., Verkhusha V.V., Pletnev V.Z., Hazelwood K.L., Roche P.M., et al. // *Biochem. J.* 2009. V. 418. № 3. P. 567–574.
22. García-Nafria J., Watson J.F., Greger I.H. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 27459.
23. Costantini L.M., Fossati M., Francolini M., Snapp E.L. // *Traffic Cph. Den.* 2012. V. 13. № 5. P. 643–649.
24. Engler C., Gruetzner R., Kandzia R., Marillonnet S. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 5. P. e5553.
25. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. // *PLoS One.* 2008. V. 3. № 11. P. e3647.
26. Engler C., Marillonnet S. // *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 2011. V. 729. P. 167–181.
27. Ermakova Y.G., Pak V.V., Bogdanova Y.A., Kotlobay A.A., Yampolsky I.V., Shokhina A.G., Panova A.S., Marygin R.A., Staroverov D.B., Bilan D.S., et al. // *Chem. Commun.* 2018. V. 54. № 23. P. 2898–2901.
28. Manna P., Jimenez R. // *J. Phys. Chem. B.* 2015. V. 119. № 15. P. 4944–4954.
29. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., et al. // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 7. P. 676–682.
30. Protasova E.A., Mishin A.S., Lukyanov K.A., Maksimov E.G., Bogdanov A.M. // *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 2021. V. 20. № 6. P. 791–803.
31. Subach F.V., Verkhusha V.V. // *Chem. Rev.* 2012. V. 112. № 7. P. 4308–4327.
32. Wachter R.M., Elsliger M.A., Kallio K., Hanson G.T., Remington S.J. // *Struct. Lond. Engl.* 1998. V. 6. № 10. P. 1267–1277.
33. Bindels D.S., Haarbosch L., van Weeren L., Postma M., Wiese K.E., Mastop M., Aumonier S., Gotthard G., Royant A., Hink M.A., et al. // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. № 1. P. 53–56.
34. Pletnev S., Shcherbo D., Chudakov D.M., Pletneva N., Merzlyak E.M., Wlodawer A., Dauter Z., Pletnev V. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 43. P. 28980–28987.
35. Janin J., Rodier F. // *Proteins.* 1995. V. 23. № 4. P. 580–587.
36. Luo J., Liu Z., Guo Y., Li M. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 14214.
37. Kim B.B., Wu H., Hao Y.A., Pan M., Chavarha M., Zhao Y., Westberg M., St-Pierre F., Wu J.C., Lin M.Z. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 3678.
38. Kremers G.-J., Hazelwood K.L., Murphy C.S., Davidson M.W., Piston D.W. // *Nat. Methods.* 2009. V. 6. № 5. P. 355–358.
39. Kredel S., Oswald F., Nienhaus K., Deuschle K., Röcker C., Wolff M., Heiker R., Nienhaus G.U., Wiedenmann J. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 2. P. e4391.
40. Lam A.J., St-Pierre F., Gong Y., Marshall J.D., Cranfill P.J., Baird M.A., McKeown M.R., Wiedenmann J., Davidson M.W., Schnitzer M.J., et al. // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. № 10. P. 1005–1012.
41. Mamontova A.V., Grigoryev A.P., Tsarkova A.S., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // *Rus. J. Bioorganic Chem.* 2017. V. 43. № 6. P. 625–633.
42. Klementieva N.V., Pavlikov A.I., Moiseev A.A., Bozhanova N.G., Mishina N.M., Lukyanov S.A., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. // *Chem. Commun. Camb. Engl.* 2017. V. 53. № 5. P. 949–951.
43. Mukherjee S., Thomas C., Wilson R., Simmerman E., Hung S.-T., Jimenez R. // *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP.* 2022. V. 24. № 23. P. 14310–14323.
44. Gavrikov A.S., Baranov M.S., Mishin A.S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2020. V. 522. № 4. P. 852–854.
45. Zhang H., Lesnov G.D., Subach O.M., Zhang W., Kuzmicheva T.P., Vlaskina A.V., Samygina V.R., Chen L., Ye X., Nikolaeva A.Y., et al. // *Nat. Methods.* 2024. V. 21. № 4. P. 657–665.
46. Mukherjee S., Douglas N., Jimenez R. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2024. V. 15. № 6. P. 1644–1651.