



УДК 577.112:577.336

## ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ФОТОКОНВЕРТИРУЕМОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО БЕЛКА ИЗ *Montastraea cavernosa*

© 2021 г. А. Ю. Фролова\*, \*\*, А. А. Пахомов\*, \*\*, В. И. Мартынов\*

\*ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*\*ФГБУН Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Россия, 119334 Москва, ул. Вавилова, 28

Поступила в редакцию 08.06.2020 г.

После доработки 19.06.2020 г.

Принята к публикации 20.06.2020 г.

Среди широкого разнообразия известных на сегодняшний день флуоресцентных зондов особое место занимают фотоконвертируемые флуоресцентные белки (ФКФБ), способные к необратимому изменению положения максимума эмиссии флуоресценции под действием света. Были изучены основные физико-химические свойства ФКФБ, выделенного из *Montastraea cavernosa* (mCavGR). Показано, что mCavGR обладает высокой яркостью и контрастностью фотопревращения, сравнимой с лучшими гомологичными ФКФБ, такими как Kaede, dendFP, Dendra2, EosFP и др., и в то же время обладает значительной фотостабильностью.

*Ключевые слова:* хромофор, фотоконверсия, флуоресцентный белок, mCavGR, mCavRFP, dendFP, Dendra2

DOI: 10.31857/S013234232101005X

### ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные метки – одни из основных инструментов для визуализации процессов в живых системах [1, 2]. Генетически кодируемые зонды на основе флуоресцентных белков (ФБ) обладают рядом уникальных свойств и перекрывают практически весь видимый диапазон от синего до красного цвета [3–7]. Несмотря на определенный “провал” в желтой области (максимумы эмиссии ~545 нм) и невысокую яркость белков с эмиссией в красном диапазоне (>620 нм), ФБ используются для решения самого широкого спектра задач *in vitro* и *in vivo* [8–12]. Отдельный класс представляют собой зонды на основе фотоконвертируемых флуоресцентных белков (ФКФБ), способных к изменению цвета за счет батохромного смещения максимумов возбуждения и эмиссии флуоресценции в ответ на облучение УФ-светом [13, 14]. В основном эти зонды представлены белками семейства Kaede и способны к фотопревращению из зеленого флуоресцентного состояния в красное [15, 16]. Такая фотоконверсия происходит за

счет расширения  $\pi$ -системы хромофора белка в результате реакций фотоэлиминирования [17, 18] (рис. 1). Эти свойства в сочетании с возможностью генетического кодирования позволяют применять ФКФБ для прицельного мечения и наблюдения за перемещением объектов внутри клетки [19–21], а также в рамках целого организма [22, 23]. ФКФБ были использованы также при разработке новых методов суперразрешающей флуоресцентной микроскопии, которые позволяют преодолеть дифракционный барьер и получать снимки с разрешением до нескольких десятков нанометров [24–27]. В то же время ФКФБ имеют ряд характеристик, ограничивающих их применение. В частности, фотоконверсия, как правило, происходит в результате облучения УФ-светом, токсичного для клеток или модельного организма. Тетрамерная природа большинства флуоресцентных белков дикого типа вносит дополнительные ограничения для их использования из-за склонности к агрегации. При помощи направленного мутагенеза были получены мономерные варианты ряда ФКФБ [19, 21, 28–30], однако после мономеризации часто ухудшается эффективность их созревания и фотофизические характеристики, такие как квантовый выход флуоресценции, фотостабильность, степень фотоконверсии. На сегодняшний день поиск и получение ФКФБ с улучшенными свойствами по-прежнему остаются актуальными.

Сокращения: ФБ – флуоресцентный белок; ФКФБ – фотоконвертируемый флуоресцентный белок; dendFP – ФКФБ из *Dendronephthya* sp.; Dendra2 – мономерный мутантный вариант dendFP; Kaede – ФКФБ из *Trachyphyllia geoffroyi*; mCavGR, mCavRFP – ФКФБ из *Montastraea cavernosa*.

# Автор для связи: (тел.: +7 (495) 336-51-11; факс: +7 (495) 336-61-66; эл. почта: alphah@mail.ru).

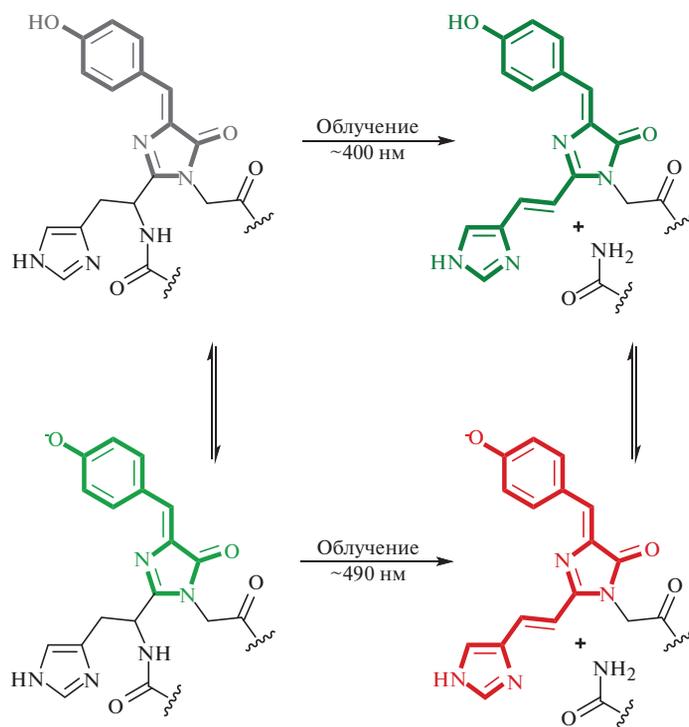


Рис. 1. Фотопревращения хромофора белков семейства Kaede.

Ранее сообщалось, что флуоресцентный белок, выделенный из кораллового полипа *Montastraea cavernosa* (mCavGR), способен к смещению максимумов возбуждения/эмиссии флуоресценции из зеленой области в красную [31], однако полная информация о его физико-химических свойствах с тех пор не появлялась. В настоящей работе мы попытались восполнить этот пробел и подвергли всестороннему изучению физико-химические свойства белка mCavGR в сравнении с другими ФКФБ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно проведенному нами филогенетическому анализу, mCavGR принадлежит к той же группе ФБ, что и ФКФБ Kaede [15], EosFP [32], dendFP [33], а также ФБ Dronpa [34], AzamiGreen [35], kikG [36] и cFP484 [37]. Ближайшими гомологами, помимо других ФБ из *Montastraea cavernosa* [38, 39], являются Kaede и EosFP (степень гомологии 77 и 79% соответственно), а также неприродный белок-предшественник LEA (least evolved ancestor, степень гомологии 88%) [40, 41]. В работе Labas et al. [31] mCavGR, как и другой гомологичный белок rFluRFP, был описан впервые как красный флуоресцентный белок (mCavRFP) из-за наблюдаемой окраски в конечном состоянии после фотопревращения, хотя в отсутствие света белок синтезируется в зеленой форме. Мы не стали переименовывать белок в mCavFP, т.к. под mCavFP

иногда подразумевается другой гомолог, также выделенный из *Montastraea cavernosa* [42, 43].

Как и у других Kaede-подобных белков, хромофор mCavGR образован из аминокислотной последовательности -His-Tyr-Gly- [31]. Способность к фотоконверсии под действием УФ-света, вероятно, обусловлена реакцией фотоэлиминирования, сопровождающейся расширением  $\pi$ -системы исходного хромофора за счет имидазольной группы (рис. 1). В настоящей работе фотоконверсионные свойства mCavGR сравнивали с широко используемым ФКФБ Dendra2, выступающими мономерным, ярким и, в отличие от других гомологов, способным также к ограниченной фотоконверсии под действием цианового (488 нм) света, а также с природным предшественником Dendra2 – dendFP. Для сравнения с другими ФКФБ использовали литературные данные (табл. 1).

Прежде всего мы провели анализ олигомерного состояния mCavGR с помощью гель-фильтрации. С использованием EGFP, dendFP и DsRed в качестве белков сравнения было показано, что mCavGR – тетрамер, как и большинство других природных представителей белков семейства Kaede.

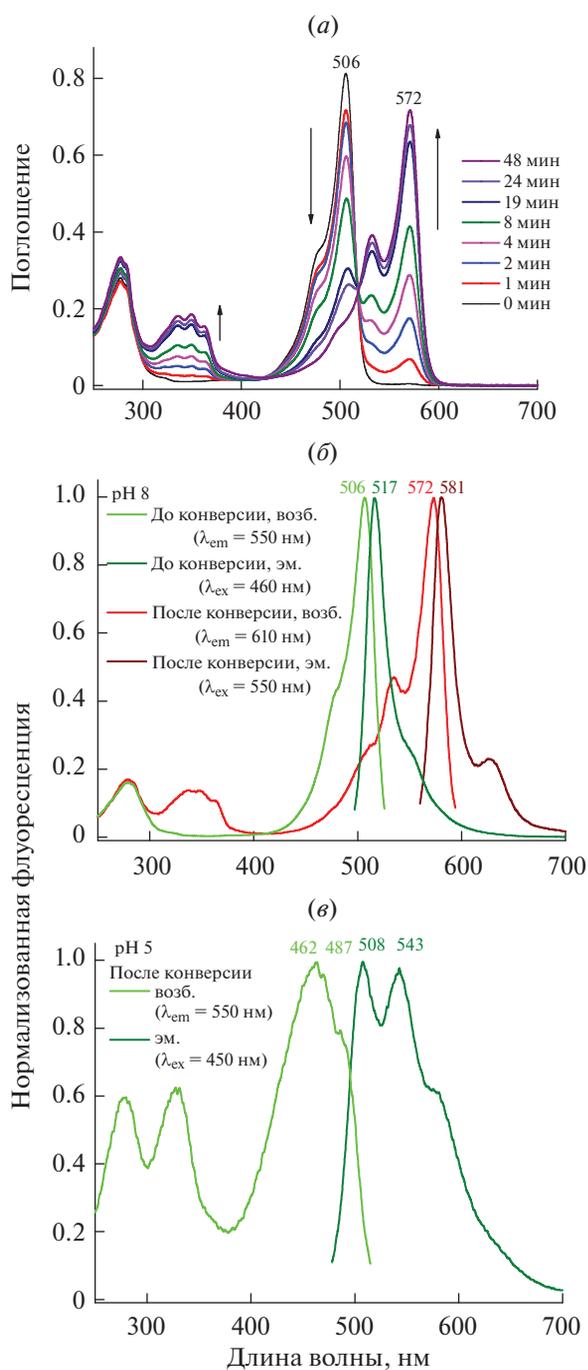
В исходном состоянии mCavGR – типичный зеленый флуоресцентный белок с максимумами возбуждения/эмиссии флуоресценции при 506/517 нм соответственно, которые под действием света

Таблица 1. Физико-химические свойства mCavGR в сравнении с другими фотоконвертируемыми флуоресцентными белками

Флуоресцентный белок	Олигомерное состояние	До фотоконверсии				После фотоконверсии				Ссылки		
		$\lambda$ возб./эм., нм	$\epsilon^*$ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	QY	яркость/1000	$pK_a$	$\lambda$ возб./эм., нм	$\epsilon^*$ , $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	QY		яркость/1000	$pK_a$
mCavGR	Тетрамер	506/517	106000	0.79	83.74	6.7	572/581	87200	0.70	61.04	6.8	Данная работа
Kaede	Тетрамер	508/518	98800	0.80	79.04	5.6	572/580	60400	0.33	19.93	5.7	[15, 16]
dendFP	Димер**	492/508	82600	0.76	62.78	6.5	557/575	73000	0.64	46.72	6.2	[44, 45]
Dendra2	Мономер	490/507	45000	0.50	22.50	6.6	553/573	35000	0.55	19.25	6.9	[19]
KikGR	Тетрамер	507/517	28200	0.70	19.74	7.8	583/593	32600	0.65	21.19	5.5	[36]
KikGRX	Тетрамер	507/517	20300	0.70	14.21	8.0	583/593	28600	0.65	18.20	5.7	[46]
mKikGR	Мономер	505/515	49000	0.69	33.81	6.6	580/591	28000	0.63	17.64	5.2	[28]
mClavGR2	Мономер	488/504	19000	0.77	14.63	8.0	566/583	32000	0.53	16.96	7.3	[21]
mMaple	Мономер	489/505	15000	0.74	11.10	8.2	566/583	30000	0.56	16.80	7.3	[30]
EosFP	Тетрамер	506/516	72000	0.70	50.40	5.8	571/581	41000	0.55	22.55	6.8	[32]
mEosFP	Мономер	505/516	67200	0.64	43.01	5.3	569/581	37000	0.62	22.94	6.5	[29, 32]
mEos4b	Мономер	505/516	78200	0.84	65.69	5.5	570/580	55500	0.71	39.40	5.8	[43, 47]
LEA	Тетрамер	504/513	86800	0.81	70.31	6.3	571/580	ND	ND	ND	ND	[40]

\* Молярный коэффициент экстинкции при длине волны основного пика поглощения.

\*\* Олигомерное состояние dendFP зависит от концентрации. В концентрированных растворах существует в виде тетрамера. ND — не определено.



**Рис. 2.** Фотофизические свойства mCavGR. (а) – Спектры поглощения в ходе фотоконверсии при облучении УФ-светом (365 нм); (б) – спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции до (зеленый цвет) и после (красный цвет) фотоконверсии при pH 8; (в) – спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции фотоконвертированного белка при pH 5. Положение максимумов в нанометрах показано числами над соответствующими пиками.

смещаются на ~65 нм в красную область спектра (рис. 2а, 2б). При понижении pH наблюдается уменьшение поглощения при 506 нм с одновре-

менным ростом при 385 нм зеленой формы белка до фотопревращения (рис. 3а). Ранее было показано, что такое поведение связано с кислотно-основным равновесием фенольной группы хромофора [44, 48].  $pK_a$  этого перехода оказалось равным  $6.66 \pm 0.03$ , что является сопоставимым со значениями  $pK_a$  для других гомологов. Отметим, что фотоконверсия белка запускается светом, возбуждающим протонированную форму хромофора, поэтому низкие значения  $pK_a$  кислотно-основного равновесия хромофора затрудняют конверсию при физиологических pH ~ 7.5 за счет смещения равновесия в сторону анионного хромофора. С другой стороны, при высоких значениях  $pK_a$  яркость белка падает при нейтральных значениях pH за счет снижения концентрации анионного хромофора. В этом ключе mCavGR имеет “средние” значения  $pK_a$  относительно других Kaede-подобных белков (табл. 1). Фотоконвертированный белок при закислении среды, аналогично другим Kaede-подобным белкам, переходит из красной формы в зеленую со сдвигом максимумов поглощения от 572 к 460–490 нм и эмиссии флуоресценции от 581 к 510–540 нм с  $pK_a = 6.78 \pm 0.02$  (рис. 2в, 3б).

Одним из ключевых параметров ФБ, характеризующих их применимость в флуоресцентной микроскопии, выступает яркость, определяемая как произведение квантового выхода и молярного коэффициента экстинкции. Согласно полученным данным, mCavGR имеет коэффициенты экстинкции в максимумах поглощения анионных форм хромофора  $106000$  и  $87200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  и квантовые выходы  $0.79$  и  $0.70$  для исходной и фотоконвертированной форм соответственно. С учетом данных, описанных в литературе (табл. 1), mCavGR – один из самых ярких ФКФБ, имеющих значительные перспективы для дальнейшего применения.

Кинетические параметры фотопревращения ФБ зависят в значительной степени от используемого оборудования и его настройки в конкретном эксперименте, поэтому оценку фотоконверсионных свойств mCavGR проводили в сравнении с другими реперными белками в тех же условиях. Как было отмечено выше, в качестве реперных белков использовали ФКФБ Dendra2 и его природный предшественник dendFP. Анализ кинетики фотопревращения белков под действием синего света (405 нм) в условиях микроскопии показал, что mCavGR конвертируется несколько медленнее dendFP, но быстрее его мономерного варианта Dendra2 (табл. 2, рис. 4а–4в). В то же время из рис. 4а–4в видно, что mCavGR демонстрирует более высокий контраст в ходе фотопревращения. Анализ фотостабильности белков при длительном облучении УФ-светом (365 нм) в одинаковых

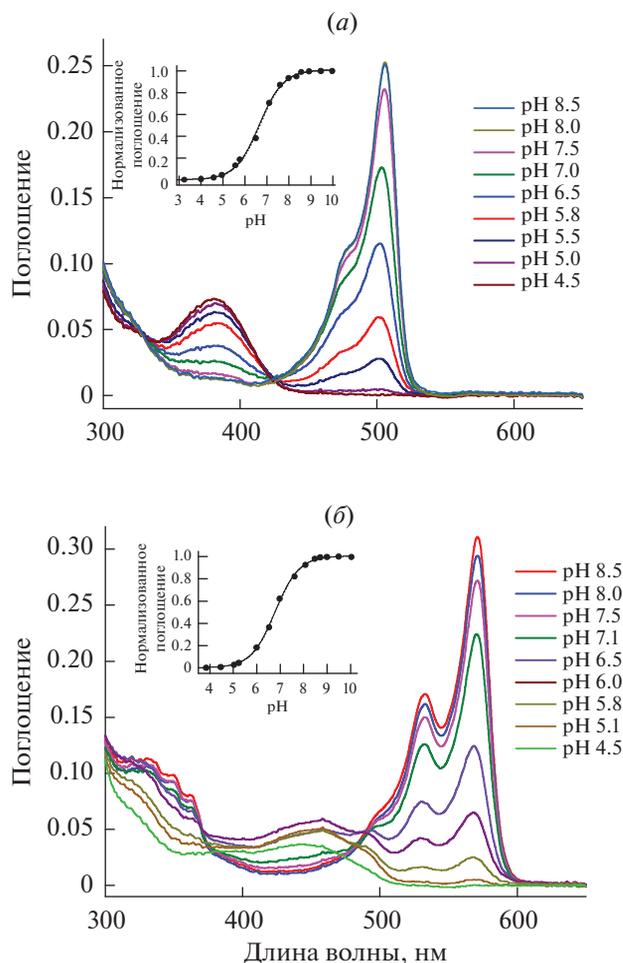
условиях показал, что mCavGR дольше других сохраняет флуоресцентные свойства (рис. 4з, табл. 2).

Таким образом, нами были исследованы основные физико-химические свойства белка mCavGR. Показано, что в растворе он – тетрамер. Изучена кинетика превращения белка mCavGR из зеленого состояния в красное под действием света, а также его фотостабильность. Проанализированы основные фотофизические характеристики, такие как положение максимумов поглощения и флуоресценции, коэффициенты экстинкции, квантовые выходы флуоресценции, яркость. Показано, что в сравнении с другими белками Kaede-семейства mCavGR обладает высокой яркостью в исходном и фотоконвертированном состояниях, а также является фотостабильным. Эти свойства подтверждают, что mCavGR имеет значительный потенциал для дальнейшего применения в качестве фотоконвертируемого генетически кодируемого флуоресцентного зонда, особенно в случае получения его мономерного варианта.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Филогенетический анализ** проводили с использованием последовательностей белков, взятых из базы данных FPbase [43]. Выравнивание последовательностей осуществляли при помощи утилиты MAFFT v.7.467 [49]. Для построения филогенетического дерева использовали программу Seaview4 [50] совместно с программой PhyML 3.0 [51].

**Наработка и выделение белков.** Клетки *Escherichia coli* штамма JM-109 трансформировали плазмидой pQE-30, несущей ген целевого флуоресцентного белка (mCavGR, dendFP, Dendra2, EGFP, DsRed), и выращивали в среде LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл. Клеточную культуру выращивали при постоянном перемешивании (250 об./мин) и температуре 37°C в течение ночи, затем температуру снижали до 22°C и продолжали перемешивание клеточной суспензии в течение суток для максимального созревания белка. Осаждение клеточной биомассы осуществляли центрифугированием (3000 g) в течение 15 мин при 4°C, осадок затем ресуспендировали в промывочном буфере (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 20 mM имидазол, pH 8.0) и охлажда-



**Рис. 3.** Зависимость спектров поглощения mCavGR от pH до (а) и после (б) фотоконверсии. Кривые титрования, рассчитанные по максимуму поглощения анионной формы (506 нм (а) и 572 нм (б)), приведены на вставках.

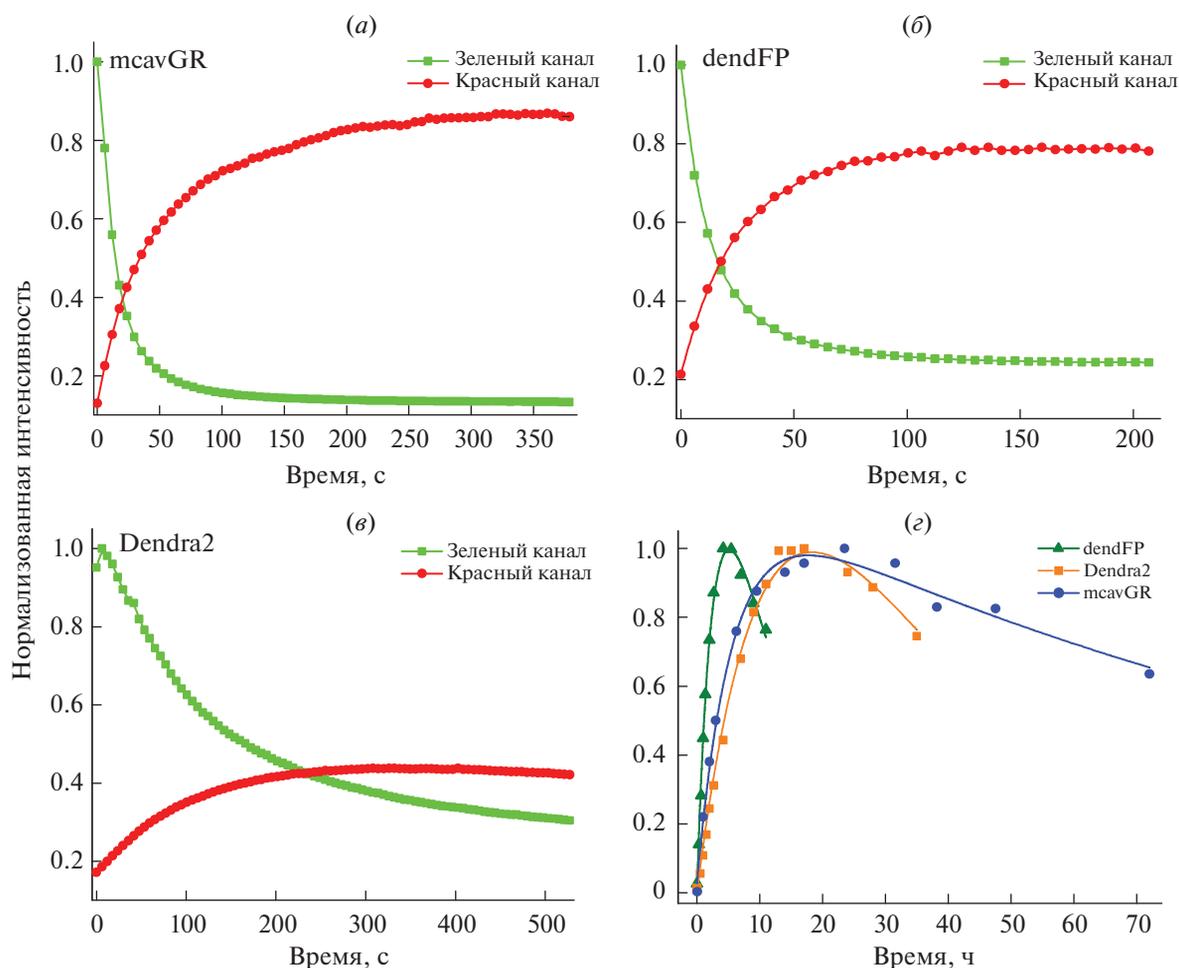
ли во льду. Далее клетки лизировали при помощи френч-пресса (Ashcroft, США) при давлении 2000 psi. Получившийся клеточный лизат центрифугировали при 75000 g в течение 20 мин при 4°C. Целевые белки на своем N-конце содержали гексагистидиновую последовательность, поэтому их выделение осуществляли методом металл-хелатной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (Qiagen,

**Таблица 2.** Фотоконверсионные свойства mCavFP в сравнении с белками dendFP и Dendra2

Флуоресцентный белок	$k (G \rightarrow R, 405 \text{ нм, микро})^*$ , $\text{мин}^{-1}$	$k (G \rightarrow R, 365 \text{ нм})^{**}$ , $\text{ч}^{-1}$	$k (\text{обесцвеч.}, 365 \text{ нм})^{**}$ , $\text{ч}^{-1}$
mCavGR	$1.11 \pm 0.03$	$0.18 \pm 0.01$	$0.008 \pm 0.001$
dendFP	$2.22 \pm 0.04$	$0.40 \pm 0.04$	$0.076 \pm 0.013$
Dendra2	$0.51 \pm 0.04$	$0.12 \pm 0.02$	$0.018 \pm 0.007$

\* Константа зелено-красного превращения в условиях микроскопии.

\*\* Константы зелено-красного превращения и последующей фотодеградации при облучении лампой (365 нм) в пробирке.



**Рис. 4.** Кинетика фотопревращений mscavGR в сравнении с белками dendFP и Dendra2. Представлены кривые зелено-красной фотоконверсии mscavGR (а), dendFP (б) и Dendra2 (в) под действием синего (405 нм) света в условиях широкопольной флуоресцентной микроскопии; (г) — динамика изменения поглощения при 570 нм в ходе зелено-красной конверсии и фотодеградации белков под действием УФ-света (365 нм).

США). После нанесения клеточного лизата на хроматографическую колонку, предварительно уравновешенную промывочным буфером, проводили промывку 4-кратным объемом того же буфера. Элюирование белков осуществляли буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl, 300 мМ NaCl, 250 мМ имидазол, pH 8.0.

**Гель-фильтрационный анализ** проводили с использованием хроматографа АСТА FPLC (GE Healthcare, Швеция) со скоростью потока 0.5 мл/мин. Колонку Superdex 200 (300 × 10 мм; GE Healthcare, Швеция) уравновешивали буфером, содержащим 20 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl (pH 8.0), и наносили образцы белков с концентрацией ~1.5 мг/мл. Детекцию белковых фракций осуществляли при 280 нм. В качестве белков сравнения для определения олигомерного состояния mscavGR использовали мономерный EGFP [52] и тетрамерный DsRed [53], в качестве димера — dendFP [45].

**Фотофизическая характеристика.** Спектры поглощения исследуемых белков регистрировали на спектрофотометре Cary 50 Bio (Varian, США) при комнатной температуре. Флуоресцентные свойства белков изучали в тех же условиях при помощи спектрофлуориметра Cary Eclipse (Varian, США). Определение квантовых выходов и молярных коэффициентов экстинкции белка mscavGR до и после фотоконверсии проводили в соответствии с методикой, использованной в работе Pletneva et al. [45]. В качестве стандартов для определения квантового выхода до и после фотоконверсии использовали EGFP и DsRed соответственно. Для определения коэффициента экстинкции mscavGR до фотопревращения концентрацию полностью созревшего белка рассчитывали методом Ward [54] по поглощению белка после денатурации в щелочной среде и с учетом коэффициента экстинкции GFP-хромофора  $44000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Коэффициент экстинкции красной формы белка определяли с учетом

остаточного количества неконвертированного белка согласно Pletneva et al. [45]. Яркость белка определяли как произведение значений квантового выхода флуоресценции и молярного коэффициента экстинкции.

**Фотометрическое титрование.** Для получения кривых титрования белок с помощью гель-фильтрации на колонке NAP-10 (GE Healthcare, США) переводили в буферный раствор, содержащий 12.5 мМ  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , 12.5 мМ CAPS, 12.5 мМ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 12.5 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, pH 7.5. Титрование осуществляли добавлением аликвот растворов 0.5 М HCl либо 0.5 М NaOH к 100 мкл белка. После каждого добавления раствора кислоты или щелочи образцы белка ресуспендировали, измеряли pH при помощи pH-метра Orion Star A211 (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием микро-pH-электрода Orion 8220BNWP (Thermo Fisher Scientific, США) и снимали спектр поглощения белка. Для определения константы кислотно-основного равновесия хромофора mCavGR строили зависимость поглощения анионной формы хромофора от изменения pH с учетом разбавления анализируемых образцов и проводили аппроксимацию согласно уравнению Henderson–Hasselbalch [55].

**Изучение скорости реакции зелено-красной фотоконверсии** выполняли на белках, иммобилизованных на гранулах Ni-NTA-агарозы, в промысловом буфере при комнатной температуре. Исследование проводили на инвертированном флуоресцентном микроскопе DMI6000 (Leica, Германия). Образец гранул с отдельным белком облучали фиолетовым светом ( $405 \pm 20$  нм). Использовали объектив с 63-кратным увеличением и набор светофильтров для регистрации зеленого и красного флуоресцентных сигналов (GFP и CY3 соответственно). Константы скорости зелено-красной фотоконверсии определяли при помощи программного обеспечения биохимического моделирования кинетики COPASI [56] с использованием схемы необратимых реакций первого порядка  $G \rightarrow R \rightarrow C$ , где G – исходная зеленая форма, R – красная форма, C – продукт фотообесцвечивания красной формы. Параметры реакций были определены по анализу кинетики для красной формы белка при помощи методов дифференциальной эволюции (Differential Evolution).

**Исследование динамики фотоконверсии и фотообесцвечивания** проводили с использованием УФ-трансиллюминатора CL-215 (Ultra-Violet Products, США) при температуре 4°C для минимизации фотообесцвечивания. Эксперименты по изучению фотодеградаций осуществляли при комнатной температуре. Образцы белков с одинаковыми концентрациями (~0.2 мг/мл) облучали светом с длиной волны 365 нм в течение заданного времени, после чего снимали спектры поглощения белков.

Кинетические параметры реакций определяли с использованием программы COPASI, как описано выше.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты № 18-04-00745 и 18-29-09166) и частично Российского научного фонда (проект № 19-73-20194).

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность К.А. Лукьянову, ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН (ИБХ РАН), за предоставление плазмиды, несущей ген флуоресцентного белка mCavGR.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследования.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Physiol. Rev. Am. Physiological Soc.* 2010. V. 90. P. 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
2. Martynov V.I., Pakhomov A.A., Popova N.V., Deyev I.E., Petrenko A.G. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. P. 33–46.
3. Tomosugi W., Matsuda T., Tani T., Nemoto T., Kotera I., Saito K., Horikawa K., Nagai T. // *Nat. Methods.* 2009. V. 6. P. 351–353. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1317>
4. Shinoda H., Ma Y., Nakashima R., Sakurai K., Matsuda T., Nagai T. // *Cell Chem. Biol.* 2018. V. P. 330e7–338e7. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.12.005>
5. Pakhomov A.A., Martynov V.I. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 407. P. 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.004>
6. Pakhomov A.A., Frolova A.Y., Tabakmakher V.M., Chugunov A.O., Efremov R.G., Martynov V.I. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2020. V. 206. P. 111853. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111853>
7. Fabritius A., Ng D., Kist A.M., Erdogan M., Portugues R., Griesbeck O. // *Cell Chem. Biol.* 2018. V. 25. P. 1554e8–1561e8. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.08.008>
8. Kostyuk A.I., Demidovich A.D., Kotova D.A., Belousov V.V., Bilan D.S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. P. 4200. <https://doi.org/10.3390/ijms20174200>

9. *Martynov V.I., Pakhomov A.A., Deyev I.E., Petrenko A.G.* // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 2018. V. 1862. P. 2924–2939.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.013>
10. *Bukhari H., Müller T.* // *Trends Cell Biol.* 2019. V. 29. P. 912–928.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2019.08.004>
11. *Можжаев А.А., Серова О.В., Орса А.Н., Бойко А.А., Горященко А.С., Деев И.Е., Петренко А.Г.* // *Биоорг. химия.* 2019. Т. 45. С. 213–217. [*Mozhaev A.A., Serova O.V., Orsa A.N., Boyko A.A., Goryashchenko A.S., Deyev I.E., Petrenko A.G.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 179–182.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162019020080>
12. *Злобовская О.А., Ширманова М.В., Ковалева Т.Ф., Саркисян К.С., Загайнова Е.В., Лукьянов К.А.* // *Биоорг. химия.* 2019. Т. 45. С. 17–26. [*Zlobovskaya O.A., Shirmanova M.V., Kovaleva T.F., Sarkisyan K.S., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2018. V. 44. P. 645–652.]  
<https://doi.org/10.1134/S1068162018060109>
13. *Adam V.* // *Histochem. Cell Biol.* 2014. V. 142. P. 19–41.  
<https://doi.org/10.1007/s00418-014-1190-5>
14. *Nemet I., Ropelewski P., Imanishi Y.* // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2015. V. 14. P. 1787–1806.  
<https://doi.org/10.1039/C5PP00174A>
15. *Ando R., Hama H., Yamamoto-Hino M., Mizuno H., Miyawaki A.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 12651–12656.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.202320599>
16. *Fron E., Sliwa M., Adam V., Michiels J., Rocha S., Dedecker P., Hofkens J., Mizuno H.* // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2014. V. 13. P. 867–874.  
<https://doi.org/10.1039/c3pp50335f>
17. *Mizuno H., Mal T.K., Tong K.I., Ando R., Furuta T., Ikura M., Miyawaki A.* // *Mol. Cell.* 2003. V. 12. P. 1051–1058.  
[https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00393-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00393-9)
18. *Li X., Chung L.W., Mizuno H., Miyawaki A., Morokuma K.* // *J. Phys. Chem. B.* 2010. V. 114. P. 16666–16675.  
<https://doi.org/10.1021/jp1101779>
19. *Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A.* // *Nat. Protoc.* 2007. V. 2. P. 2024–2032.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.291>
20. *Baker S.M., Buckheit R.W., Falk M.M.* // *BMC Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 15.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-15>
21. *Hoi H., Shaner N.C., Davidson M.W., Cairo C.W., Wang J., Campbell R.E.* // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 401. P. 776–791.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.056>
22. *Moeyaert B., Holt G., Madangopal R., Perez-Alvarez A., Fearey B.C., Trojanowski N.F., Ledderose J., Zolnik T.A., Das A., Patel D., Brown T.A., Sachdev R.N.S., Eickholt B.J., Larkum M.E., Turrigiano G.G., Dana H., Gee C.E., Oertner T.G., Hope B.T., Schreier E.R.* // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. P. 4440.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-06935-2>
23. *Osugi T., Sasakura Y., Satake H.* // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 1892.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-58884-w>
24. *Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F.* // *Science.* 2006. V. 313. P. 1642–1645.  
<https://doi.org/10.1126/science.1127344>
25. *McKinney S.A., Murphy C.S., Hazelwood K.L., Davidson M.W., Looger L.L.* // *Nat. Methods.* 2009. V. 6. P. 131–133.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1296>
26. *Nienhaus K., Ulrich Nienhaus G.* // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. P. 1088–1106.  
<https://doi.org/10.1039/C3CS60171D>
27. *Robert A., Hookway C., Gelfand V.I.* // *BioEssays.* 2016. V. 38. P. 232–243.  
<https://doi.org/10.1002/bies.201500142>
28. *Habuchi S., Tsutsui H., Kochaniak A.B., Miyawaki A., van Oijen A.M.* // *PLoS One.* 2008. V. 3. P. 1–9.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003944>
29. *Adam V., Moeyaert B., David C.C., Mizuno H., Lelimosin M., Dedecker P., Ando R., Miyawaki A., Michiels J., Engelborghs Y., Hofkens J.* // *Chem. Biol.* 2011. V. 18. P. 1241–1251.
30. *McEvoy A.L., Hoi H., Bates M., Platonova E., Cranfill P.J., Baird M.A., Davidson M.W., Ewers H., Liphardt J., Campbell R.E.* // *PLoS One.* 2012. V. 7. P. e51314.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051314>
31. *Labas Y.A., Gurskaya N.G., Yanushevich Y.G., Fradkov A.F., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A., Matz M.V.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 4256–4261.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.062552299>
32. *Wiedenmann J., Ivanchenko S., Oswald F., Schmitt F., Rucker C., Salih A., Spindler K.-D., Nienhaus G.U.* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. P. 15905–15910.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0403668101>
33. *Пахомов А.А., Мартынова Н.Ю., Гурская Н.Г., Балашова Т.А., Мартынов В.И.* // *Биохимия.* 2004. Т. 69. С. 1108–1117. [*Pakhomov A.A.* // *Biochemistry (Moscow).* 2004. V. 69. P. 901–908.]  
<https://doi.org/10.1023/B:BIRY.0000040223.09641.29>
34. *Ando R., Mizuno H., Miyawaki A.* // *Science.* 2004. V. 306. P. 1370–1373.  
<https://doi.org/10.1126/science.1102506>
35. *Karasawa S., Araki T., Yamamoto-Hino M., Miyawaki A.* // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 34167–34171.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M304063200>
36. *Tsutsui H., Karasawa S., Shimizu H., Nukina N., Miyawaki A.* // *EMBO Rep.* 2005. V. 6. P. 233–238.  
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400361>
37. *Ai H.W.* // *Biochem. J.* 2006. V. 400. P. 531–540.
38. *Kelmanson I.V., Matz M.V.* // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20. P. 1125–1133.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msg130>
39. *Field S.F., Bulina M.Y., Kelmanson I.V., Bielawski J.P., Matz M.V.* // *J. Mol. Evol.* 2006. V. 62. P. 332–339.  
<https://doi.org/10.1007/s00239-005-0129-9>
40. *Kim H., Grunkemeyer T.J., Modi C., Chen L., Fromme R., Matz M.V., Wachter R.M.* // *Biochemistry.* 2013. V. 52. P. 8048–8059.  
<https://doi.org/10.1021/bi401000e>

41. Kim H., Zou T., Modi C., Dörner K., Grunkemeyer T.J., Chen L., Fromme R., Matz M.V., Ozkan S.B., Wachter R.M. // *Structure*. 2015. V. 23. P. 34–43. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.11.011>
42. Mazel C.H., Lesser M.P., Gorbunov M.Y., Barry T.M., Farrell J.H., Wyman K.D., Falkowski P.G. // *Limnol. Oceanogr.* 2003. V. 48. P. 402–411. [https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.1\\_part\\_2.0402](https://doi.org/10.4319/lo.2003.48.1_part_2.0402)
43. Lambert T.J. // *Nat. Methods*. 2019. V. 16. P. 277–278. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8>
44. Пахомов А.А., Черткова Р.В., Мартынов В.И. // *Биоорг. химия*. 2015. Т. 41. С. 669–674. [Pakhomov A.A., Chertkova R.V., Martynov V.I. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2015. V. 41. P. 602–606.] <https://doi.org/10.1134/S1068162015060114>
45. Pletneva N.V., Pletnev S., Pakhomov A.A., Chertkova R.V., Martynov V.I., Muslinkina L., Dauter Z., Pletnev V.Z. // *Acta Crystallogr. Sect. D Struct. Biol.* 2016. V. 72. P. 922–932. <https://doi.org/10.1107/S205979831601038X>
46. Tsutsui H., Shimizu H., Mizuno H., Nukina N., Furuta T., Miyawaki A. // *Chem. Biol.* 2009. V. 16. P. 1140–1147. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2009.10.010>
47. Paez-Segala M.G., Sun M.G., Shtengel G., Viswanathan S., Baird M.A., Macklin J.J., Patel R., Allen J.R., Howe E.S., Piszczek G., Hess H.F., Davidson M.W., Wang Y., Looger L.L. // *Nat. Methods*. 2015. V. 12. P. 215–218. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3225>
48. Pakhomov A.A., Martynov V.I., Orsa A.N., Bondarenko A.A., Chertkova R.V., Lukyanov K.A., Petrenko A.G., Deyev I.E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2017. V. 493. P. 1518–1521. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.09.170>
49. Katoh K., Toh H. // *Bioinformatics*. 2007. V. 23. P. 372–374. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl592>
50. Gouy M., Guindon S., Gascuel O. // *Mol. Biol. Evol.* 2010. V. 27. P. 221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>
51. Guindon S., Dufayard J.-F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. // *Syst. Biol.* 2010. V. 59. P. 307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>
52. Orm M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. // *Science*. 1996. V. 273. P. 1392–1395. <https://doi.org/10.1126/science.273.5280.139>
53. Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 11984–11989. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.22.11984>
54. Ward W.W. // *Green Fluorescent Protein: Properties, Applications, and Protocols*. 2nd ed. / Eds. Chalfie M., Kain S.R. John Wiley & Sons, Inc., 2005. P. 39–65. <https://doi.org/10.1002/0471739499.ch3>
55. Sniegowski J.A., Phail M.E., Wachter R.M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 332. P. 657–663. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.04.166>
56. Hoops S., Sahle S., Gauges R., Lee C., Pahle J., Simus N., Singhal M., Xu L., Mendes P., Kummer U. // *Bioinformatics*. 2006. V. 22. P. 3067–3074. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl485>

## Physicochemical Properties of Photoconvertible Fluorescent Protein from *Montastraea cavernosa*

A. Yu. Frolova\*, \*\*, A. A. Pakhomov\*, \*\*, #, and V. I. Martynov\*

#Phone: +7 (495) 336-51-11; e-mail: alpah@mail.ru

\*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

\*\*Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds, ul. Vavilova 28, Moscow, 119334 Russia

Among the wide variety of currently known fluorescent probes, photoconvertible fluorescent proteins (PCFP) that capable to irreversibly change their position of the maximum of fluorescence emission under specific light irradiation, are of special interest. We studied the main physicochemical properties of PCFP isolated from *Montastraea cavernosa* (mcavGR). It was shown that mcavGR has high brightness and contrast of photoconversion, comparable with the best homologous PCFPs, such as Kaede, dendFP, Dendra2, EosFP, etc., and at the same time has significant photostability.

*Keywords:* chromophore, photoconversion, fluorescent protein, mcavGR, mcavRFP, dendFP, Dendra2