



УДК 547.782

## ЛАБИЛЬНОСТЬ СТАЦИОНАРНЫХ И ВРЕМЯРАЗРЕШЕННЫХ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ КОНФОРМАЦИОННО ФИКСИРОВАННОГО ПРОИЗВОДНОГО ХРОМОФОРА CFP

© 2021 г. А. М. Богданов\*, Д. А. Горбачев\*, Э. Р. Зайцева\*, \*\*, А. Ю. Смирнов\*,  
Н. С. Балеева\*., #, М. С. Баранов\*., \*\*\*

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

\*\*Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева,  
Россия, 125047 Москва, Миусская площадь, 9

\*\*\*Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова,  
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1

Поступила в редакцию 16.09.2020 г.

После доработки 26.09.2020 г.

Принята к публикации 29.09.2020 г.

Исучено сольватохромное поведение модельного соединения, имитирующего хромофор цианового флуоресцентного белка (CFP), в спектральном и временном доменах. Анализ времяразрешенного флуоресцентного сигнала, проведенный в 40 растворителях, принадлежащих к различным классам, показал, что липофильное окружение способствует увеличению, а ароматические растворители и третичные амины – уменьшению времени жизни флуоресценции этого соединения. На основании проведенного исследования сделаны предположения о возможностях рационального дизайна CFP-подобных белков.

*Ключевые слова:* имидазолы, хромофоры, циановый флуоресцентный белок, CFP, оптические свойства

DOI: 10.31857/S0132342321030040

Традиционные методы флуоресцентной визуализации опираются на детекцию и анализ сигнала в спектральном домене, где основной характеристикой служит длина волны. Поскольку полосы поглощения и испускания большинства флуорофоров имеют заметную ширину, такой подход позволяет проводить раздельную детекцию флуоресцентного сигнала лишь в 3–5 спектральных каналах одновременно. Альтернативным подходом к разделению флуоресцентных сигналов становится их детекция во временном домене, где отдельные фотоны регистрируются относительно момента возбуждения флуоресценции. Этот принцип позволяет в одном спектральном канале визуализировать несколько маркеров, контрастных по времени жизни флуоресценции.

Сокращения: CFP – циановый флуоресцентный белок; КВФ – квантовый выход флуоресценции; ФБ – флуоресцентный белок.

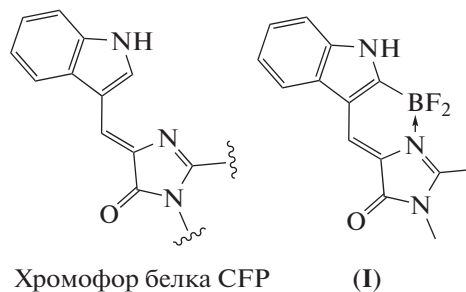
# Автор для связи: (тел.: +7 (926) 704-13-72; эл. почта: nsbaleeva@gmail.com).

На сегодняшний день методы времяразрешенной флуоресцентной визуализации (FLIM и схожие) находят все большее применение в области биомедицинских исследований.

Флуоресцентные белки (ФБ) выступают одной из важнейших меток в биологической флуоресцентной микроскопии и уже более 20 лет используются для многоцветного мечения. В то же время поведение ФБ во временном домене изучено менее подробно. Как правило, время жизни флуоресценции ФБ жестко привязано к величине квантового выхода флуоресценции (КВФ) и в пределах спектральной группы ФБ варьирует достаточно слабо, однако существует ряд исключений из этого правила – выявлены белки с увеличенным [1–5] или укороченным [6] временем жизни. В этих случаях увеличение или уменьшение времени жизни не приводит к пропорциональному изменению величины КВФ, что свидетельствует о том, что взаимосвязь этих характери-

стик может различаться не только для химически отличающихся хромофоров, но и для идентичного хромофора в разном белковом окружении [7]. Таким образом, открываются возможности для дизайна ярких ФБ, имеющих одинаковый хромофор, но различающихся по времени жизни флуоресценции. На данный момент не существует модели, достоверно предсказывающей время жизни флуоресценции флуорофоров в зависимости от их окружения, а поиск новых ФБ с разными временами жизни с помощью случайного мутагенеза представляется достаточно трудоемким. В связи с этим перспективным представляется изучение поведения модельных веществ, имитирующих строение хромофоров ФБ, в различных средах, в свою очередь, моделирующих ближайшее аминокислотное окружение хромофора в составе белка.

В настоящей работе мы изучили влияние среды на оптические характеристики модельного хромофора белка CFP (соединение (I), схема 1, табл. 1) и выявили ряд закономерностей. В использованную выборку растворителей вошли различные полярные протонные и апротонные вещества, вещества различной степени гидрофобности и вязкости, а также ароматические соединения, фторированные производные и различные амины. В большинстве случаев время жизни флуоресценции колебалось в области 5.0–5.7 нс и практически не зависело от полярности растворителя. Заметное отличие наблюдалось в ряду различных ароматических растворителей (производных бензола), у которых эта величина снижалась на 0.5–1.0 нс. Еще ниже она оказывалась в различных аминах (до 1.5 нс), а в сильно липофильных средах фторированных растворителей наблюдался ее рост (>6 нс). Также мы показали, что для данного хромофора нет прямой корреляции между КВФ и временем жизни. Так, наибольшие значения КВФ наблюдались для вышеупомянутых ароматических растворителей, в которых время жизни флуоресценции было сравнительно коротким. Значительное падение одновременно КВФ и среднего времени жизни флуоресценции наблюдалось в аминах, однако в этом случае кинетика затухания флуоресценции описывалась биэкспоненциальной моделью, что, как мы предполагаем, связано с наличием отдельного процесса гашения флуоресценции, например, за счет переноса электрона от растворителя [8]. Неожиданным наблюдением стало очень слабое влияние вязкости на оптические свойства – в ряду различных спиртов характеристики оказались схожими.



Хромофор белка CFP (I)

Схема 1. Хромофор белка CFP и модельное соединение (I).

Среди аминокислотных остатков близкого хромофорного окружения флуоресцентных белков семейства CFP можно выделить Arg96, Gln183, Tyr/Ala145, His/Asp148, Thr203, Glu222 [1, 9]. Первые два остатка консервативны и вовлечены в созревание хромофора [10], остатки в положениях 145 и 148 фиксируют планарную конформацию хромофора [9], а остатки в положениях 203 и 222 могут рассматриваться как потенциальные мишени для мутагенеза при создании в хромофорном окружении условий, аналогичных исследованным в настоящей работе.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры поглощения в УФ- и видимом диапазоне регистрировали на спектрофотометре Cary 100 Bio (Varian, США), спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian, США).

(*Z*)-4-((2-(Дифторборил)-1*H*-индол-3-ил)метил)-1,2-диметил-1*H*-имидазол-5(4*H*)-он (I) синтезировали по методике, предложенной ранее [11].

Измерение времени жизни флуоресценции производили на специально сконструированной для съемки макрообъектов установке, основанной на fdFLIM-системе LIFA (Lambert Instruments, Нидерланды). Для возбуждения флуоресценции использовали импульсный источник модулированного излучения из набора Multi-LED (Lambert Instruments, Нидерланды;  $\lambda = 471$  нм, частота повторения импульсов 20 МГц). Для детекции сигнала использовали камеру Toggel (Lambert Instruments, Нидерланды) с присоединенным к ней светосильным фотообъективом 50–100/1.8 (Sigma, Япония), снабженным эмиссионным фильтром HQ510lp (Chroma, США). Калибровку системы производили с помощью калибровочного образца “зеленая акриловая пластина” ( $\tau = 4.2$  нс) из набора FSK5 (Thorlabs, США). Настройку параметров детекции и математическую обра-

Таблица 1. Оптические свойства модельного соединения (I) в различных растворителях

Растворитель	Время жизни флуоресценции, нс	Максимум поглощения, нм	Коэффициент экстинкции	Максимум эмиссии, нм	КВФ, %
Вода	5.55	476	26000	520	59
Ацетонитрил	5.71	460	25000	507	68
Этилацетат	5.28	468	27000	504	64
Диэтиловый эфир	5.50	475	29500	501	88
Диметилацетамид	5.13	470	27000	510	63
Диоксан	5.15	472	26000	502	65
Метилэтилкетон	5.32	469	26000	509	59
Циклогексанон	5.16	470	24500	514	64
NMP	5.07	468	27000	510	41
Диметилсульфооксид	5.08	479	29500	512	62
Уксусная кислота	5.61	479	28000	515	66
Октан	5.70		Плохо растворим		
Метанол	5.64	475	29000	512	54
Этанол	5.51	482	29000	516	66
Пропанол-1	5.46	486	29000	514	62
Бутанол-1	5.41	486	27500	515	70
Гексанол-1	5.40	487	29000	515	75
Деканол-1	5.46	488	28500	515	69
Додеканол-1	5.38	489	24500	512	72
Изоамиловый спирт	5.47	489	27500	512	71
Изопропанол	5.53	485	29500	507	69
Бутанол-2	5.37	484	29000	514	65
Октанол-2	5.40	489	29500	507	74
Третбутанол	5.52	486	31500	515	64
Хлороформ	5.48	481	29000	514	74
Дихлорэтан	5.44	472	28500	508	71
Дихлорметан	5.51	474	30000	509	80
Триэтиламин	1.44	485	24000	504	11
TMEDA	1.62	478	28000	504	10
N-Этилморфолин	3.21	479	27000	510	30
Трифторэтанол	6.43	478	28000	519	60
Перфторбензол	6.34	470	22000	505	61
Фтортолуол	6.63	474	25500	505	61
Фторацетон	5.65	484	28000	530	35
Тетрафторпропан	5.92	476	24500	519	59
Октафторпентанол	6.04	473	28000	519	61
Дихлорбензол	4.95	482	26500	510	76
Хлорбензол	4.89	480	28500	509	74
Бензол	4.73	480	28500	504	75
Толуол	4.74	480	28500	502	78
Пиридин	4.70	478	27000	515	66

Примечание: NMP – N-метилпирролидон, TMEDA – тетраметилэтилендиамин.

ботку данных производили с помощью программы LIFA Tau Software 1.2.0 (Lambert Instruments, Нидерланды).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перспективной модификацией белка CFP служит введение липофильных остатков (например, Leu, Ile в положения 203 и 222 полипептидной цепи) в белковое окружение хромофора для увеличения времени жизни флуоресценции или ароматических и амин-содержащих остатков (например, Trp или Phe в положение 203 и Lys в положение 222 полипептидной цепи) для его снижения.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-14-00255).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Goedhart J., Stetten D., Noirclerc-Savoye M., Lelimosin M., Joosen L., Hink M.A., van Weeren L., Gadella T.W.J., Royant A.* // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 751–755.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms1738>
2. *Sarkisyan K.S., Goryashchenko A.S., Lidsky P.V., Gorbachev D.A., Bozhanova N.G., Gorokhovatsky A.Y., Perezveva A.R., Ryumina A.P., Zherdeva V.V., Savitsky A.P., Solntsev K.M., Bommarius A.S., Sharonov G.V., Lindquist J.R., Drobizhev M., Hughes T.E., Rebane A., Lukyanov K.A., Mishin A.S.* // *Biophys. J.* 2015. V. 109. P. 380–389.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.06.018>
3. *Bindels D.S., Haarbosch L., van Weeren L., Postma M., Wiese K.E., Mastop M., Aumonier S., Gotthard G., Royant A., Hink M.A., Gadella T.W.J.* // *Nat. Methods.* 2017. V. 14. P. 53–56.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4074>
4. *Matela G., Gao P., Guigas G., Eckert A., Nienhaus K., Nienhaus G.* // *Chem. Commun.* 2017. V. 53. P. 979–982.  
<https://doi.org/10.1039/C6CC09081H>
5. *Piatkevich K.D., Malashkevich V.N., Morozova K.S., Nemkovich N.A., Almo S.C., Verkhusha V.V.* // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 1847.  
<https://doi.org/10.1038/srep01847>
6. *Mamontova A.V., Solovyev I.D., Savitsky A.P., Shakhov A.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M.* // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. P. 13224.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-31687-w>
7. *Плетнева Н.В., Горячева Е.А., Артемьев И.В., Архипова С.Ф., Плетнев В.З.* // *Биоорг. химия.* 2019. Т. 45. С. 339–347. [*Pletneva N.V., Goryacheva E.A., Artemyev I.V., Arkhipova S.F., Pletnev V.Z.* // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. P. 187–194].  
<https://doi.org/10.1134/S0132342319030047>
8. *Inada T.N., Kikuchi K., Takahashi Y., Ikeda H., Miyashi T.* // *J. Photochem. Photobiol. A.* 2000. V. 137. P. 93–97.  
[https://doi.org/10.1016/S1010-6030\(00\)00352-X](https://doi.org/10.1016/S1010-6030(00)00352-X)
9. *Malo G.D., Pouwels L.J., Wang M., Weichsel A., Montfort W.R., Rizzo M.A., Piston D.W., Wachter R.M.* // *Biochemistry.* 2007. V. 46. P. 9865–9873.  
<https://doi.org/10.1021/bi602664c>
10. *Wood T.I., Barondeau D.P., Hitomi C., Kassmann C.J., Tainer J.A., Getzoff E.D.* // *Biochemistry.* 2005. V. 44. P. 16211–16220.  
<https://doi.org/10.1021/bi051388j>
11. *Baleeva N.S., Tsarkova A.S., Baranov M.S.* // *Tet. Lett.* 2016. V. 57. P. 3043–3045.  
<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.06.006>

## Lability of Stationary and Time-Resolved Optical Properties of the Conformationally-Locked CFP Chromophore Derivative

A. M. Bogdanov\*, D. A. Gorbachev\*, E. R. Zaitseva\*, \*\*, A. Yu. Smirnov\*, N. S. Baleeva\*, #, and M. S. Baranov\*, \*\*\*

#Phone: +7 (926) 704-13-72; e-mail: nsbaleeva@gmail.com

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

\*\*Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

\*\*\*Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

The solvatochromic behavior of a model compound mimicking the chromophore of cyan fluorescent protein (CFP) in the spectral and time domains has been studied. Analysis of the time-resolved fluorescent signal, carried out in 40 solvents belonging to different classes, showed that the lipophilic environment promotes an increase, while aromatic solvents and tertiary amines — a decrease in the fluorescence lifetime of the chromophore. Based on this study, the possible rational design of CFP-like proteins was proposed.

*Keywords: imidazolones, chromophores, cyan fluorescent protein, CFP, optical properties*