



УДК 577.29

ЦИРКУЛЯРНЫЕ ПЕРМУТАНТЫ БЕЛКА BrUSLEE КАК ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ИНДИКАТОРЫ pH

© 2022 г. А. В. Мамонтова*, Т. Р. Симонян*, К. А. Лукьянов**, А. М. Богданов**, #

*Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий,
Россия, 121205 Москва, Большой бульвар, 30, стр. 1**ФГБУН “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН,
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 08.11.2021 г.

После доработки 15.11.2021 г.

Принята к публикации 16.11.2021 г.

Получены два варианта циркулярных пермутантов BrUSLEE – зеленого флуоресцентного белка с коротким временем жизни флуоресценции. Охарактеризована зависимость кинетик затухания флуоресценции этих флуорофоров от pH. Показано, что оба пермутанта (срBrUS и срBrUS-145) демонстрируют трехкомпонентную кинетику затухания флуоресценции, причем время жизни одной из компонент изменяется в диапазоне ~3000–300 пс в ответ на сдвиг pH от 5.5 до 9.0, при этом исходный белок BrUSLEE не показывает существенного изменения кинетики затухания флуоресценции в области pH 6.0–8.5, интересной с физиологической точки зрения. Характер измеренной pH-зависимости позволяет рассматривать полученные пермутанты как индикаторы pH с детекцией сигнала во временном домене.

Ключевые слова: флуоресцентные белки, GFP, время жизни флуоресценции, флуоресцентные индикаторы

DOI: 10.31857/S0132342322040157

ВВЕДЕНИЕ

Один из факторов поддержания гомеостаза и контроля нормальных физиологических функций клеток – специфическая кислотность, характерная для разных субклеточных компартментов [1, 2]. Мониторинг изменений внутриклеточного pH *in situ* может предоставить ценную информацию о клеточном метаболизме и обеспечить более глубокое понимание физиологических и патологических процессов [3, 4]. Большинство традиционных флуоресцентных индикаторов, выступая мощным инструментом для биоимиджинга в реальном времени, способно лишь к относительной оценке изменения исследуемого параметра в клетке [5–7].

Цель настоящей работы – создание генетически кодируемых индикаторов для количественного измерения pH на основе флуоресцентного

белка BrUSLEE [8], который ранее продемонстрировал свой потенциал в качестве метки для FLIM (fluorescence lifetime imaging microscopy), обладающей коротким временем жизни флуоресценции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для повышения чувствительности хромофора флуоресцентного белка к химическому окружению мы провели циркулярную пермутацию BrUSLEE (рис. 1). Принцип метода пермутации состоит в перестановке элементов первичной структуры белка с общим сохранением его трехмерной укладки и перемещением концов в область хромофорного окружения. Точкой пермутации был выбран сайт, включающий 144–149 а.о. (по номенклатуре avGFP – *Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein [9]), по аналогии с существующими пермутантами на основе GFP (Green Fluorescent Protein), хорошо зарекомендовавшими себя в составе флуоресцентных индикаторов (в частности, GCaMP6s [10]). При этом предложены два альтернативных варианта первичной структуры пермутантов: с удалением (срBrUS-145) и с сохранением (срBrUS) остатка в положении 145 (остаток

Сокращения: BrUSLEE – улучшенный яркий маркер со сверхкоротким временем жизни флуоресценции (Bright Ultimately Short Lifetime Enhanced Emitter); ср – циркулярно пермутированный (circularly permuted); avGFP – зеленый флуоресцентный белок из медузы *Aequorea victoria* (*Aequorea victoria* Green Fluorescent Protein); GFP – зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein).

Автор для связи: (тел.: +7 (903) 746-08-49; эл. почта: noobissat@yandex.ru).

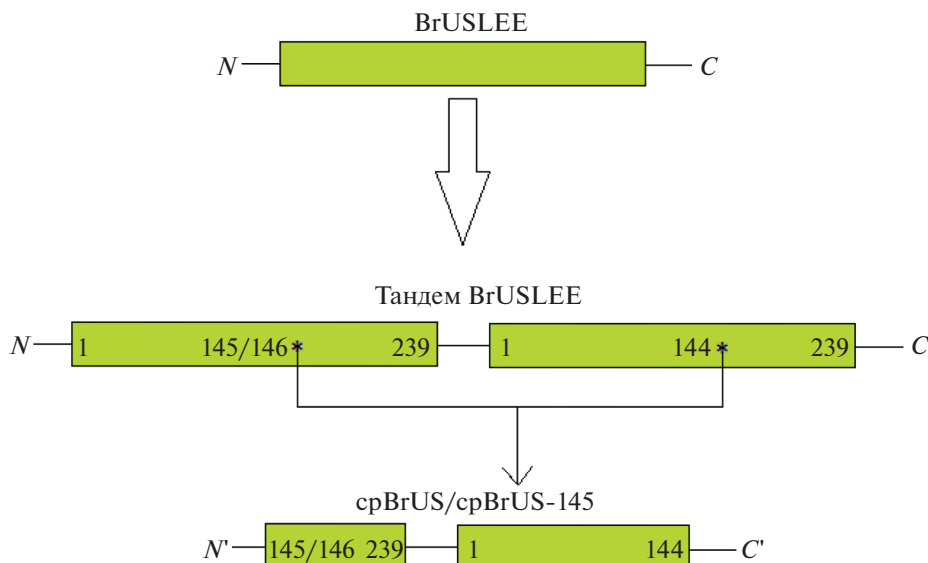


Рис. 1. Схема создания пермутированных вариантов флуоресцентного белка BrUSLEE. Области, кодирующие флуоресцентный белок, показаны зелеными прямоугольниками. Звездочками отмечены точки пермутации. Цифрами обозначены соответствующие аминокислотные остатки по номенклатуре avGFP [9].

Met145 – важная детерминанта флуоресцентных свойств BrUSLEE [11]).

Далее мы исследовали pH-зависимость времени жизни флуоресценции исходного белка BrUSLEE и полученных циркулярных пермутан-

тов срBrUS-145 и срBrUS *in vitro* на очищенных препаратах выделенных белков с помощью времязазрешенной спектроскопии при однофотонном возбуждении пикосекундным лазером с центральной длиной волны испускания ~450 нм (табл. 1, рис. 2).

Таблица 1. Кинетические характеристики затухания флуоресценции белка BrUSLEE и пермутантов срBrUS и срBrUS-145 при возбуждении пикосекундным лазером 450 нм при различных значениях pH

срBrUS/срBrUS-145/BrUSLEE							
pH	τ_1 , пс	A1, %	τ_2 , пс	A2, %	τ_3 , пс	A3, %	χ^2
3.0	80/40/105	31/15/37	1860/1810/1802	27/25/24	6470/5010/6410	42/60/39	1.16/1.207/1.16
3.5	90/38/84	31/15/34	1970/1511/1653	29/20/26	6780/4969/6280	40/65/40	1.186/1.252/1.14
4.0	90/45/40	29/16/39	1890/1694/2077	29/24/27	6580/5515/6855	42/60/34	1.142/1.133/1.164
4.5	80/36/66	28/17/38	1790/1417/1614	29/20/24	6460/5345/6241	43/63/38	1.25/1.198/1.118
5.0	80/57/304	27/16/39	1740/1656/1194	30/24/38	6530/5538/5650	43/60/23	1.17/1.269/1.149
5.5	100/55/374	28/18/39	2030/1653/1367	32/25/38	6760/5697/5997	39/57/23	1.2/1.15/1.239
6.0	90/45/764	25/22/79	1880/1201/3090	33/17/16	6590/5092/6544	42/61/5	1.218/1.235/1.546
6.5	100/71/801	26/26/74	1710/1226/2899	31/20/21	6310/5107/7559	43/54/5	1.18/1.154/0.964
7.0	130/76/802	26/28/83	1730/749/2565	35/18/17	6350/4752/нет	39/54/нет	1.154/1.137/0.98
7.5	170/110/809	27/43/83	1590/817/2598	36/21/17	6130/4582/нет	37/36/нет	1.266/1.078/1.046
8.0	360/117/808	35/47/83	1840/725/2620	40/21/17	5950/4312/нет	25/32/нет	1.188/1.055/1.122
8.5	330/111/770	37/52/79	1770/602/2340	38/27/21	5360/3520/нет	25/21/нет	1.139/0.917/1.031
9.0	610/111/785	50/54/81	2590/474/2388	38/31/19	6960/2192/нет	12/15/нет	1.262/0.819/1.017
9.5	870/111/784	67/48/82	3280/516/2497	30/35/18	8380/2110/нет	3/17/нет	1.214/0.769/1.003
10.0	600/95/780	47/40/79	2270/474/2370	45/35/21	5170/1787/нет	8/25/нет	0.966/0.797/0.989
10.5	610/129/765	45/37/74	1990/586/2346	42/25/16	4430/1685/нет	13/38/нет	0.963/0.876/0.972
11.0	640/113/779	46/26/69	2020/590/2426	43/25/31	3990/1655/нет	11/49/нет	0.941/0.893/1.003

Примечание: τ – время жизни флуоресценции соответствующей экспоненциальной компоненты; A – вклад (амплитуда) экспоненциальной компоненты затухания; χ^2 – критерий Пирсона, характеризующий качество экспоненциальной аппроксимации.

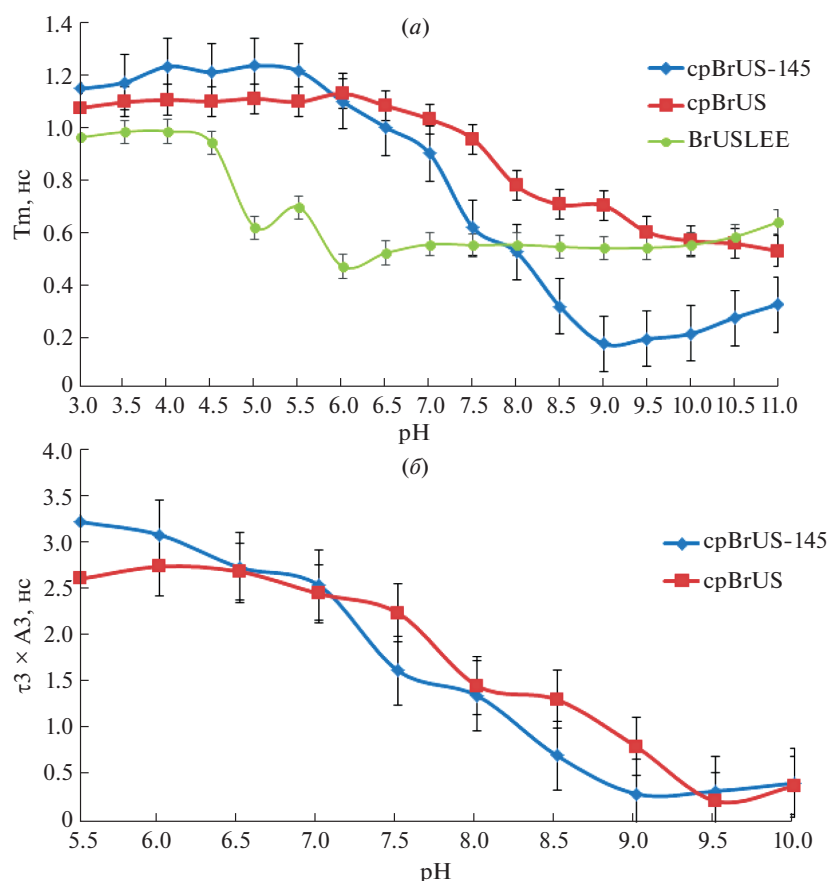


Рис. 2. (а) – Зависимость среднего времени жизни флуоресценции (T_m) от pH для белка BrUSLEE и пермутантов cpBrUS и cpBrUS-145 *in vitro*; (б) – калибровочная кривая, характеризующая зависимость нормированного на амплитуду времени жизни флуоресценции τ_3 пермутантов cpBrUS и cpBrUS-145 от pH *in vitro* ($n = 3$).

Кинетики затухания флуоресценции флуорофоров обоих пермутантов демонстрируют выраженную зависимость от pH раствора (рис. 2а); они адекватно аппроксимируются трехэкспоненциальной моделью, причем время жизни третьей компоненты с учетом амплитуды ($\tau_3 \times A_3$) показывает десятикратное изменение (~3000–300 пс) в диапазоне pH 5.5–9.0 (рис. 2б, табл. 1). Форма зависимости $\tau_3 \times A_3$ от pH близка к линейной, что потенциально облегчает калибровку флуоресцентного сигнала для экспериментального определения величины pH. Следует отметить, что пермутант cpBrUS-145 демонстрирует более значительный динамический диапазон ответа, чем cpBrUS (шестикратное изменение среднего времени жизни флуоресценции против двукратного соответственно), что указывает на способность остатка Met145 ограничивать конформационную подвижность хромофора. При этом наблюдается незначительная чувствительность исходного белка BrUSLEE в узкой области значений pH 4.5–5.5 (рис. 2а), а при многокомпонентной экспоненциальной аппроксимации ни одна из компонент за-

тухания флуоресценции белка BrUSLEE не показывает существенного изменения в области 6.0–8.5, интересной с физиологической точки зрения (табл. 1).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение циркулярных пермутантов BrUSLEE.

Мы сконструировали ДНК-векторы, несущие кодирующие последовательности cpBrUSLEE. Для этого методом ПЦР-амплификации получили тандемные повторы последовательностей генов *BrUSLEE* [8, 12], соединенные олигонуклеотидным линкером, кодирующим аминокислотную последовательность состава (Ser-Gly-Thr)₂; использовали следующие праймеры: 5'-ATGCG-GATCCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3', 5'-ATGCG-GTCGACCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3', 5'-ATGCGTTCGACAGCGGGACTAGCGGGACTATGGT-GAGCAAGGGCGAG-3', 5'-ATGCAAGCTTTTAC-TTGTACAGCTCGTCCATGC-3'; программа ПЦР: 95°C – 5 мин, (95°C – 30 с, 58°C – 30 с, 72°C – 30 с) × 18, 72°C – 7 мин. Эта промежуточная кон-

струкция служила матрицей для ПЦР-амплификации последовательностей ДНК, кодирующих варианты *срBrUSLEE*, с использованием прямого (5'-концевого) праймера, соответствующего последовательности, кодирующей начало С-концевой части первой копии *срBrUSLEE* (начиная с 145 или 146 а.о.) (5'-ATGCGGATCCATGAACAGCCSAACGTC-3' или 5'-ATGCGGATCCSAACAGCCSAACGTC-3'), и обратного (3'-концевого) праймера, комплементарного последовательности ДНК, кодирующей конец N-концевой части второй копии *срBrUSLEE* (1–144 а.о.) (5'-AAGCTTTTAATGCGTTGTAAGTCCAGCTTGTGCC-3'), при следующей программе ПЦР: 95°C – 5 мин, (95°C – 30 с, 55°C – 30 с, 72°C – 30 с) × 18, 72°C – 7 мин.

Экспрессия и очистка белка. Последовательности, кодирующие пермутанты *срBrUS* и *срBrUS-145*, были клонированы в вектор pQE30 (Qiagen, США) с меткой 6His на N-конце, экспрессированы в штамме *E. coli* XL1 Blue (Invitrogen, США) и очищены с использованием металл-аффинной смолы TALON (Clontech, США) [13].

Спектроскопия времени жизни флуоресценции очищенных белков. Измерения производили с помощью времяразрешенного флуоресцентного спектрометра miniTau (Edinburgh Instruments, Великобритания) в окне 50 нс, разделенном на 2048 временных каналов. Возбуждение флуоресценции производили пикосекундным лазером EPL-450 (Edinburgh Instruments) с центральной длиной волны излучения 445.6 нм, частотой повторений 20 МГц; счет фотонов проводили в спектральном диапазоне 475–525 нм. Обработку и визуализацию данных, определение χ^2 (критерий Пирсона) проводили в программе Fluoracle 2.5.1 (Edinburgh Instruments).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены два циркулярных пермутанта BrUSLEE с удалением (*срBrUS-145*) и с сохранением (*срBrUS*) аминокислотного остатка Met в положении 145. В отличие от исходного BrUSLEE, оба пермутанта продемонстрировали выраженную зависимость кинетики затухания флуоресценции от pH в физиологическом диапазоне 6.0–8.5. Таким образом, циркулярная пермутация существенно повышает чувствительность хромофора BrUSLEE к изменениям pH, и оба циркулярных пермутанта BrUSLEE можно рассматривать как перспективные зонды для количественных измерений pH.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-34-60019, руководитель – А.В. Мамонтова).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Casey J.R., Grinstein S., Orlowski J. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. V. 11. P. 50–61. <https://doi.org/10.1038/nrm2820>
2. Demaurex N. // Physiology. 2002. V. 17. P. 1–5. <https://doi.org/10.1152/physiologyonline.2002.17.1.1>
3. Boron W.F. // Adv. Physiol. Educ. 2004. V. 28. P. 160–179. <https://doi.org/10.1152/advan.00045.2004>
4. Lagadic-Gossmann D., Huc L., Lecureur V. // Cell Death Differ. 2004. V. 11. P. 953–961. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401466>
5. Zhu H., Fan J., Xu Q., Li H., Wang J., Gao P., Peng X. // Chem. Commun. 2012. V. 48. P. 11766. <https://doi.org/10.1039/c2cc36785h>
6. 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., Sies H., Belousov V.V. // Chem. Commun. 2018. V. 54. P. 2898–2901. <https://doi.org/10.1039/C7CC08740C>
7. Martynov V.I., Pakhomov A.A., Deyev I.E., Petrenko A.G. // Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subj. 2018. V. 1862. P. 2924–2939. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.09.013>
8. 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>
9. FPbase: avGFP. <https://www.fpbase.org/protein/avgfp/>
10. Chen T.-W., Wardill T.J., Sun Y., Pulver S.R., Renninger S.L., Baohan A., Schreier E.R., Kerr R.A., Orger M.B., Jayaraman V., Looger L.L., Svoboda K., Kim D.S. // Nature. 2013. V. 499. P. 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature12354>
11. Mamontova A.V., Shakhov A.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // Biomolecules. 2020. V. 10. P. 1547. <https://doi.org/10.3390/biom10111547>
12. FPbase: BrUSLEE. <https://www.fpbase.org/protein/bruslee/>
13. TALON® Metal Affinity Resins User Manual. http://wolfson.huji.ac.il/purification/PDF/Tag_Protein_Purification/Ni-NTA/TALON_UserManual.pdf

Circular Permutants of BrUSLEE Protein as Fluorescent pH Indicators

A. V. Mamontova*, T. R. Simonyan*, K. A. Lukyanov**, and A. M. Bogdanov**, #

*Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, Bolshoy bulvar 30/1, Moscow, 121205 Russia

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

Two variants of circularly permuted BrUSLEE, a green fluorescent protein with a short fluorescence lifetime, have been engineered. We characterized the pH-dependence of fluorescence decay kinetics of these fluorophores. It was shown that both permutants (cpBrUS and cpBrUS-145) exhibit three-component fluorescence decay kinetics, with the lifetime of the one component varying within the ~3000–300 ps range upon pH shift from 5.5 to 9.0. At the same time, the original BrUSLEE does not show a significant change in the fluorescence decay kinetics within the physiologically relevant pH-range of 6.0–8.5. The described pH-dependence allows considering the BrUSLEE permutants as pH indicators with the fluorescence lifetime readout.

Keywords: fluorescent proteins, GFP, fluorescence lifetime, fluorescent indicators