

Искусственные электрон-транспортные цепи на основе зеленого флуоресцентного белка*

© А.М. Богданов, А.В. Мамонтова, А.В. Тительмаер, К.А. Лукьянов, А.С. Мишин[†]

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Москва, Россия

[†] e-mail: mishin@ibch.ru

Поступила в редакцию 24.09.2018 г.

Фотоиндуцируемый донор электронов — улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP) — соединен с окислителями белковой природы в составе химерной полипептидной цепи. Сравнение фотостабильности EGFP и химерных белков как в отсутствие, так и в присутствии не связанных с белками окислителей в растворе показало работоспособность созданных модельных электрон-транспортных цепей.

DOI: 10.21883/OS.2019.01.47062.265-18

Введение

Окислительная фотоконверсия флуоресцентных белков [1] является фотохимической реакцией, в которой в присутствии внешних окислителей некоторые зеленые флуоресцентные белки (прежде всего EGFP) выступают в качестве доноров электронов. При этом хромофор зеленого флуоресцентного белка окисляется и переходит в форму, флуоресцирующую в красной области спектра. С момента своего открытия это явление привлекло интерес многих биофизиков и специалистов по квантовой химии [2–8], поскольку механизм окислительно-восстановительной реакции между хромофором, защищенным бета-бочонком флуоресцентного белка, и внешними окислителями, в том числе белковой природы, был совершенно неясен. Наиболее убедительным на сегодняшний день выглядит объяснение, включающее целую цепочку участников, которая начинается с первичного акцептора электрона — боковой цепи остатка тирозина [6], находящегося в непосредственном контакте с хромофором. Появление красной флуоресценции — это лишь второй и, по-видимому, необязательный этап окислительной фотоконверсии. Первичным проявлением процесса окислительной фотоконверсии является исчезновение зеленой флуоресценции. Как было показано в многочисленных работах [9–11], окислительная фотоконверсия является одним из основных путей, приводящих к необратимому фотообесцвечиванию зеленых флуоресцентных белков при микроскопии живых клеток за счет реакции с редокс-активными молекулами как внутриклеточными, так и добавленными в питательные среды (прежде всего рибофлавином и пиридоксальфосфатом [9–11]).

В первых описанных экспериментах эффективная фотоконверсия EGFP наблюдалась в присутствии многократного избытка окислителей (~ 1 mM окислителя,

~ 1 μ M EGFP) — феррицианида калия, бензохинона, цитохрома *c*. Перечисленные окислители являются одноэлектронными и, по-видимому, такой избыток необходим для прохождения фотоконверсии до стадии образования формы с красной флуоресценцией [1]. Следует отметить, что фотообесцвечивание зеленой формы заметно усиливалось при значительно меньших концентрациях окислителей. Так, уже при концентрации 10 μ M феррицианида калия фотообесцвечивание происходит заметно быстрее, чем в его отсутствие [1].

В настоящей работе с помощью геной инженерии объединили восстановитель (EGFP) и окислитель белковой природы в составе одного химерного белка и сравнили фотообесцвечивание зеленой формы EGFP в различных условиях, в том числе в присутствии дополнительных внешних окислителей. Скорость фотообесцвечивания служила, таким образом, критерием эффективности протекания светоиндуцированного переноса электрона в исследуемых белках.

Методика эксперимента

Генетические конструкции

Генноинженерные конструкции pQE-FE, pQE-EF, pQE-R2E, pQE-ER2, pQE-EM, pQE-BE, кодирующие химерные белки флаводоксин-EGFP, EGFP-флаводоксин, малая субъединица рибонуклеотид-редуктазы (R2)-EGFP, EGFP-малая субъединица рибонуклеотид-редуктазы (R2), EGFP-моноаминоксидаза A, EGFP-синий флуоресцентный белок бактерии *Vibrio fischeri* (vBFP), были созданы на основе экспрессионного вектора pQE30. Отдельные части химерных белков соединены линкером из 12 аминокислот (GHGTGSGTSGSS).

Экспрессия и выделение белков

Для экспрессии химерных конструкций был использован вектор pQE30 (Qiagen), содержащий в одной рамке считывания с генами целевых белков на 5'-конце

* XIII International Conference on Hole Burning, Single Molecule, and Related Spectroscopies: Science and Applications (HBSM-2018), August 6–12, 2018, Suzdal–Moscow, Russia.

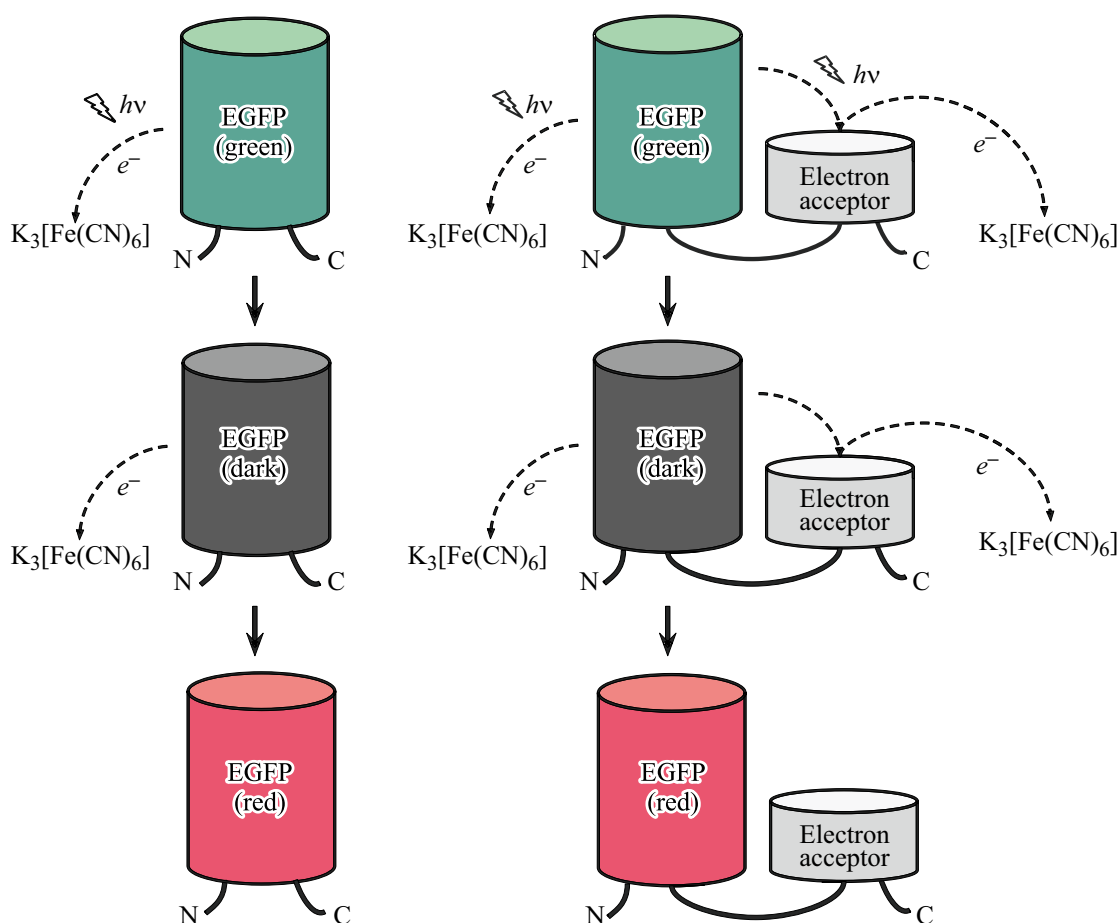


Рис. 1. Схема искусственных электрон-транспортных цепей на основе флуоресцентного белка EGFP и редокс-активных белков. Зеленый флуоресцентный белок под воздействием синего света (~ 470 nm) способен передавать электрон на молекулу-окислитель в растворе (левая колонка) и/или на молекулу-окислитель в составе той же полипептидной цепи (правая колонка), при этом зеленая флуоресценция исчезает. Образование хромофора с красной флуоресценцией требует еще одной стадии окисления.

последовательность, кодирующую 6 гистидинов. Гексагистидиловая последовательность используется для очистки белков методом аффинной хроматографии. Соответствующими генно-инженерными конструкциями трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL-1Blue. Бактериальную культуру инкубировали в питательной среде LB при термостатировании (37°C) и покачивании в течение ночи. Далее клетки разрушали с помощью ультразвукового дезинтегратора 60 Sonic Dismembrator (Fisher Scientific), а осветленный клеточный лизат, содержащий целевые белки, смешивали с металлоаффинной смолой Talon (Clontech). Аффинную хроматографию проводили в соответствии с рекомендациями производителя.

Микроскопия и измерение фотостабильности

Для микроскопии использовалась система Leica AF6000LX, основанная на инвертированном микроскопе DMI 6000 B, оборудованном иммерсионным масляным объективом HCX PL APO lbd. BL $63 \times 14\text{NA}$, цифровым ПЗС-регистратором Photometrics CoolSNAP HQ и ртут-

ной лампой 120W HXP (Osram) в качестве источника света. Сигналы зеленой и красной флуоресценции детектировались с помощью стандартного набора светофильтров GFP (возбуждение BP470/40, эмиссия BP525/50). Измерение фотообесцвечивания включало в себя следующие стадии, повторяющиеся циклически: регистрацию зеленой флуоресценции (слабое облучение) и обесцвечивание (интенсивное облучение удельной мощностью около $0.5\text{--}10\text{ W/cm}^2$). Количество циклов подбирали таким образом, чтобы интенсивность флуоресценции в конечном счете снижалась чуть больше, чем на 50%.

Результаты и их обсуждение

Химерные белки, объединяющие молекулу светоиндуцируемого восстановителя (EGFP) и окислителя можно рассматривать как элементарную электрон-транспортную цепь (рис. 1). При этом наряду с окислительной фотоконверсией EGFP с участием внешних окислителей, доступность которых вблизи молекулы белка ограничена диффузией, становится возможен альтернативный

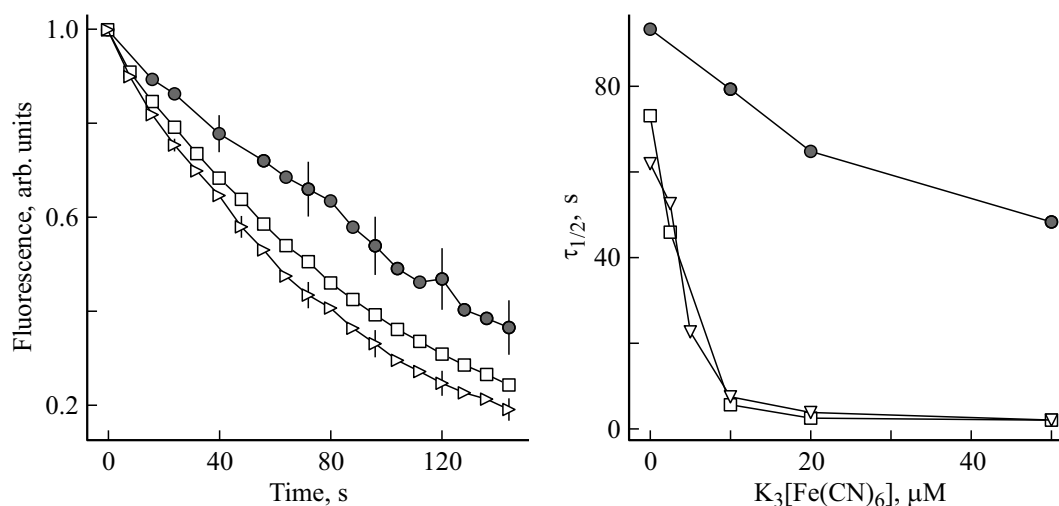


Рис. 2. Фотостабильность химерных белков (одноэлектронные окислители). Слева: кинетика фотообесцвечивания зеленого флуоресцентного белка EGFP (серые круги) и химерных белков EGFP-флаводоксин (квадраты), EGFP-малая субъединица бактериальной рибонуклеотид редуктазы (треугольники), вертикальные линии показывают стандартное отклонение сигнала; справа: зависимость времени полуобесцвечивания от концентрации окислителя в растворе.

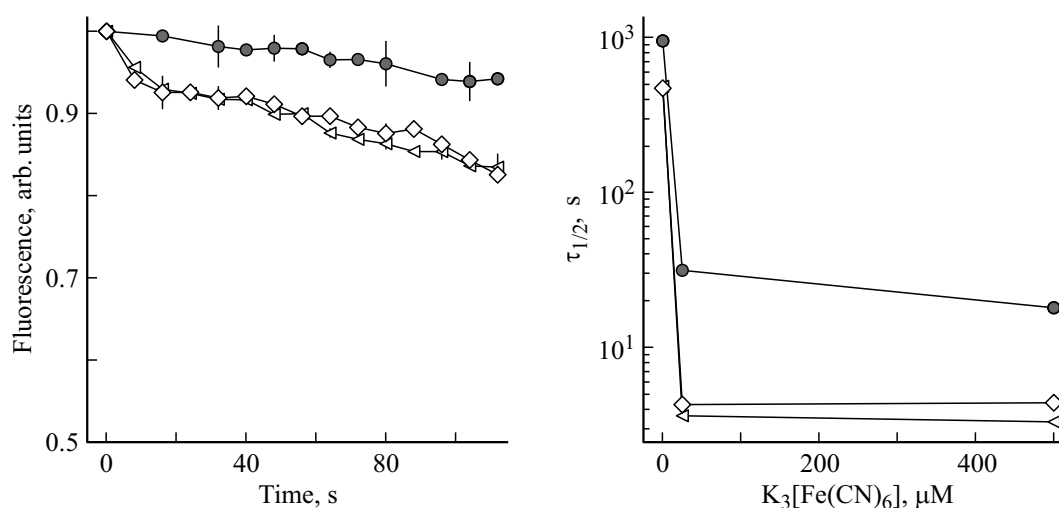


Рис. 3. Фотостабильность химерных белков (двухэлектронные окислители). Слева: кинетика фотообесцвечивания зеленого флуоресцентного белка EGFP (серые круги), EGFP-vfBFP (ромбы), EGFP-моноаминоксидаза А (треугольники). Справа: зависимость времени полуобесцвечивания от концентрации окислителя в растворе.

путь — перенос электрона на молекулу-окислитель, связанную с EGFP в составе единой полипептидной цепи. Для создания белков мы выбрали одноэлектронные (флаводоксин, малая субъединица бактериальной рибонуклеотид редуктазы) и двухэлектронные (моноаминоксидаза А, синий флуоресцентный белок бактерий) окислители белковой природы. Флаводоксины — электронтранспортные белки бактерий (в данном случае *E. coli*), содержащие нековалентно связанную молекулу флавиномононуклеотида (ФМН) в качестве редокс-активного кофактора. Малая субъединица рибонуклеотид редуктазы первого класса из бактерии *E. coli* представляет собой гомодимер (так называемый R2), содержащий по два связанных атома железа в каждой из полипептидных

цепей, т.е. всего 4 атома железа на гомодимер. Моноаминоксидаза А — митохондриальный фермент, содержащий ковалентно связанный флавинадениндинуклеотид (ФАД). Синий флуоресцентный белок бактерии *Vibrio fischeri* способен нековалентно связывать одну молекулу рибофлавина. Все четыре белка в естественном контексте являются участниками электрон-транспортных цепей, обеспечивающих клеточный метаболизм.

Форма с красной флуоресценцией, образующаяся в результате окислительной фотоконверсии (рис. 1), обладает крайне низкой фото- и химической стабильностью [1], поэтому не может быть использована для достоверной оценки эффективности фотоконверсии в различных условиях. Поэтому в качестве измеримо-

го экспериментального параметра было использовано фотообесцвечивание зеленой формы, сопровождающее первую стадию фотоконверсии.

Все варианты химерных белков, содержащие одноэлектронные белки-окислители, а именно флаводоксин-EGFP, EGFP-флаводоксин, R2-EGFP, EGFP-R2, демонстрировали увеличенную по сравнению с EGFP скорость фотообесцвечивания. При этом в различных ориентациях (порядке полипептидных цепей) наблюдались незначительные отличия фотостабильности. Химерные белки флаводоксин-EGFP и R2-EGFP были охарактеризованы подробнее. В частности, мы охарактеризовали кинетики их фотообесцвечивания при добавлении в раствор сильного одноэлектронного акцептора, феррицианида калия. Оказалось, что характерное падение фотостабильности, наблюдаемое при увеличении концентрации феррицианида, у химерных белков выражено существенно сильнее, чем у EGFP (рис. 2).

Все варианты химерных белков, содержащие двухэлектронные белки-окислители, также показали увеличенную по сравнению с EGFP скорость фотообесцвечивания (рис. 3). Аналогично одноэлектронным белкам-окислителям даже при добавлении феррицианида калия в больших концентрациях (500 μ M) химерные белки показывают меньшую фотостабильность по сравнению с EGFP. Таким образом, в случаях как одно-, так и двухэлектронных белков-окислителей эффективность переноса электрона возрастает.

Заключение

Созданы светоиндуцируемые искусственные электрон-транспортные цепи (ЭТЦ) на основе EGFP. Следующие факты свидетельствуют в пользу работоспособности созданных ЭТЦ: ускоренное фотообесцвечивание без добавления внешних окислителей, снижение концентрационного порога чувствительности фотоконверсии/фотообесцвечивания к внешним окислителям.

Полагаем, что охарактеризованные нами ЭТЦ могут найти интересные варианты применения в современной микроскопии, в частности, в мультиплексной микроскопии, основанной на различиях в фотостабильности меток [12], микроскопии сверхвысокого разрешения, а также оптогенетике, группе методов оптического управления биохимическими процессами. Кроме того, ЭТЦ, аналогичные рассмотренным в данной работе, могли бы стать основой молекулярных флуоресцентных индикаторов окислительно-восстановительных процессов в клетке. Также эффективность переноса электрона между EGFP и белком-акцептором может быть использована для оценки расстояния между ними.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 17-00-00404 (17-00-00401).

Список литературы

- [1] Bogdanov A.M., Mishin A.S., Yampolsky I.V., Belousov V.V., Chudakov D.M., Subach F.V., Verkhusha V.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // Nat. Chem. Biol. 2009. V. 5. N 7. P. 459.
- [2] Subach O.M., Patterson G.H., Ting L.-M., Wang Y., Condeelis J.S., Verkhusha V.V. // Nat. Methods. 2011. V. 8. N 9. P. 771.
- [3] Saha R., Verma P.K., Rakshit S., Saha S., Mayor S., Pal S.K. // Sci. Rep. 2013. V. 3. P. 1580.
- [4] Ai M., Mills H., Kanai M., Lai J., Deng J., Schreiter E., Looger L., Neubert T., Suh G. // PLoS One. 2015. V. 10. N 9. P. e0138127.
- [5] Sattarzadeh A., Saberianfar R., Zipfel W.R., Menassa R., Hanson M.R. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 11771.
- [6] Bogdanov A.M., Acharya A., Tietlmayer A.V., Mamon-tova A.V., Bravaya K.B., Kolomeisky A.B., Lukyanov K.A., Krylov A.I. // J. Am. Chem. Soc. 2016. V. 138. N 14. P. 4807.
- [7] Acharya A., Bogdanov A.M., Grigorenko B.L., Bravaya K.B., Nemukhin A.V., Lukyanov K.A., Krylov A.I. // Chem. Rev. 2017. V. 117. N 2. P. 758.
- [8] Byrdin M., Duan C., Bourgeois D., Brettel K. // J. Am. Chem. Soc. 2018. V. 140. N 8. P. 2897. doi 10.1021/jacs.7b12755
- [9] Bogdanov A.M., Bogdanova E.A., Chudakov D.M., Gorod-nicheva T.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // Nat. Methods. 2009. V. 6. N 12. P. 859.
- [10] Bogdanov A.M., Kudryavtseva E.I., Lukyanov K.A. // PLoS One. 2012. V. 7. N 12. P. e53004.
- [11] Mamon-tova A.V., Bogdanov A.M., Lukyanov K.A. // Biotechniques. 2015. V. 58. N 5. P. 258.
- [12] Orth A., Ghosh R.N., Wilson E.R., Doughney T., Brown H., Reineck P., Thompson J.G., Gibson B.C. // Biomed. Opt. Express. 2018. V. 9. N 7. P. 2943.