



## ИНФРАКРАСНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК iRFP КАК АКЦЕПТОР ДЛЯ РЕЗОНАНСНОГО ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ

© 2015 г. О. А. Злобовская\*, К. С. Саркисян\*, К. А. Лукьянов\*, \*\*, \*\*

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

\*\*Научно-исследовательский институт биомедицинских технологий Нижегородской  
государственной медицинской академии, 603005, Нижний Новгород, пл. Минина, 10/1

Поступила в редакцию 24.11.2014 г. Принята к печати 08.12.2014 г.

Исследована возможность использования инфракрасного флуоресцентного белка iRFP на основе бактериофитохрома в качестве акцептора для ферстеровского резонансного переноса энергии (Förster resonance energy transfer, FRET). В качестве доноров энергии использовали GFP-подобные дальнекрасные флуоресцентные белки mKate2, eqFP650 и eqFP670. С целью тестирования FRET создали генно-инженерные конструкции для экспрессии в бактериях, кодирующие донорный и акцепторный белки, соединенные гептадекапептидным линкером. Эффективность FRET оценивали *in vitro* на выделенных белках по росту эмиссии донора после разрезания линкера. Из трех тестируемых конструкций наиболее эффективный перенос энергии (приблизительно 30%) показала пара eqFP650-iRFP.

*Ключевые слова:* флуоресцентный белок, GFP, iRFP, генетически кодируемый сенсор, FRET.

DOI: 10.7868/S0132342315030136

### ВВЕДЕНИЕ

Благодаря способности к автокаталитическому образованию хромофорной группы флуоресцентные белки семейства зеленого флуоресцентного белка (Green Fluorescent Protein, GFP) широко используются в качестве генетически кодируемых меток в биологических исследованиях [1]. На основе природных GFP-подобных белков с помощью направленной молекулярной эволюции *in vitro* была создана целая панель улучшенных флуоресцентных белков, охватывающая почти весь видимый спектр. Особый интерес для фундаментальных и биомедицинских исследований на модельных животных представляют белки, флуоресцирующие в дальнекрасной и ближней инфракрасной областях спектра, из-за низкой автофлуоресценции и относительно высокой прозрачности тканей позвоночных в этом диапазоне [2]. На основе GFP-подобных белков были получены дальнекрасные флуоресцентные белки с максимумами возбуждения при 590–610 нм и

максимумами эмиссии при 630–670 нм [3–8]. Дальнейшего продвижения в красную область удалось добиться путем создания флуоресцентных белков на основе бактериофитохромов [9]. Эти белки ковалентно связывают биливердин IX<sub>a</sub> в качестве простетической группы. С помощью направленной молекулярной эволюции удалось получить варианты бактериофитохромов, флуоресцирующие в ближней инфракрасной области спектра (возбуждение при 660–690 нм, эмиссия при 680–720 нм) [9–12].

Спектральное разнообразие флуоресцентных белков используют для многоцветного мечения, позволяющего визуализировать различные структуры в одних и тех же клетках. Кроме того, подходящие пары флуоресцентных белков используют для анализа белок-белковых взаимодействий и создания флуоресцентных сенсоров на основе эффекта ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET) [13, 14]. FRET заключается в том, что возбужденный флуорофор-донор вместо эмиссии света резонансно передает свою энергию флуорофору-акцептору, который излучает квант света или расходует энергию в тепло.

Для эффективного протекания FRET между двумя флуорофорами необходимо соблюдение нескольких ключевых условий [13, 14]. Во-первых, спектр эмиссии одного флуорофора (донора)

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); FRET – ферстеровский резонансный перенос энергии (Förster (or fluorescence) resonance energy transfer); iRFP – инфракрасный флуоресцентный белок, (infrared fluorescent protein).

# Автор для связи (тел.: +7 (499) 742-81-22; эл. почта: kluk@ibch.ru).

Свойства флуоресцентных белков, использованных в работе

Название белка	Максимум возбуждения, нм	Максимум эмиссии, нм	Молярный коэффициент поглощения, $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$	Квантовый выход флуоресценции	Олигомерное состояние
iRFP	690	713	105000	0.06	Димер
mKate2	588	633	62500	0.40	Мономер
eqFP650	592	650	65000	0.24	Димер
eqFP670	605	670	70000	0.06	Димер

должен существенно перекрываться со спектром поглощения другого (акцептора). Во-вторых, молекулы донора и акцептора должны располагаться близко друг к другу (обычно не дальше 5–8 нм), т.к. эффективность FRET падает пропорционально шестой степени расстояния между флуорофорами. Кроме того, эффективность переноса энергии зависит от взаимной ориентации дипольного момента эмиссии донора и дипольного момента поглощения акцептора. Максимальная эффективность достигается при параллельной ориентации диполей и минимальная – при перпендикулярной. Об эффективности FRET можно судить по уменьшению интенсивности флуоресценции донора, уменьшению времени жизни возбужденного состояния донора, увеличению интенсивности флуоресценции акцептора при возбуждении донора и некоторым другим спектральным характеристикам.

iRFP – димерный инфракрасный флуоресцентный белок, созданный в 2011 году на основе бактериального фитохрома RpVphP2 из *Rhodospseudomonas palustris* [10]. iRFP имеет максимумы возбуждения и излучения при 690 и 713 нм; соответственно, молярный коэффициент поглощения  $105000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  и квантовый выход флу-

оресценции 0.06 (таблица). iRFP является одним из самых ярких и стабильных белков этого типа, и поэтому активно используется для биомиметизации на целых животных [15–18]. Теоретически, iRFP и другие инфракрасные флуоресцентные белки являются удобными акцепторами для FRET. Однако на сегодняшний день это не было проверено экспериментально.

В данной работе мы изучили возможность использования iRFP в качестве FRET-акцептора в паре с некоторыми дальнекрасными флуоресцентными белками семейства GFP.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для тестирования в качестве FRET-доноров мы выбрали три дальнекрасных флуоресцентных белка, для которых iRFP подходит в качестве акцептора: мономерный mKate2, димерный eqFP650 и димерный eqFP670 (таблица). Для всех трех белков наблюдается существенное перекрывание их спектров эмиссии со спектром поглощения iRFP (рис. 1), что позволяло ожидать эффективный перенос энергии между ними.

В качестве модели для тестирования FRET мы использовали стандартную конструкцию генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров активности каспазы-3. В таких конструкциях два флуоресцентных белка, составляющих FRET-пару, соединены пептидным линкером, несущим сайт узнавания каспазы-3 [19–23]. Такой дизайн удобен по нескольким причинам. Во-первых, имеется два четко определяемых состояния (до и после разрезания линкера каспазой), характеризующихся эффективным FRET или полным отсутствием FRET из-за необратимой диссоциации донора и акцептора; соответственно. Во-вторых, модульная конструкция сенсора позволяет сравнивать различные флуоресцентные белки. В-третьих, анализ сенсора можно проводить как *in vitro* на выделенных белках, так и в живых клетках при активации в них апоптоза. Помимо этого, создаваемые новые сенсоры каспазы-3 могут дополнить палитру имеющихся молекулярных инструментов изучения апоптоза.

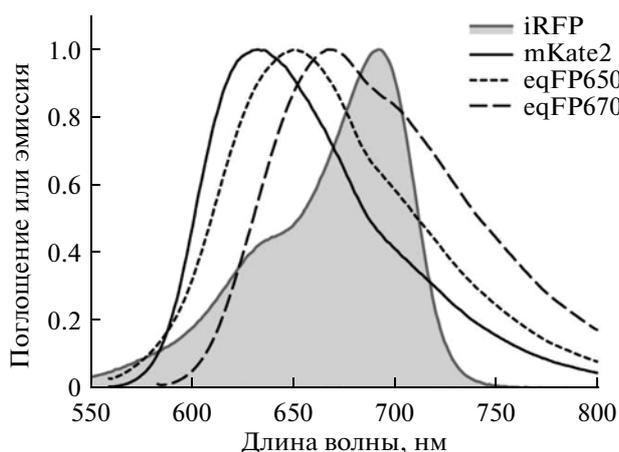


Рис. 1. Нормированные спектры эмиссии белков mKate2, eqFP650 и eqFP670, и спектр поглощения белка iRFP.

Дальнекрасные варианты сенсора активности каспазы-3 сконструировали, взяв за основу каспазный сенсор Casper3-GR (Evrogen), который включает белки TagGFP и TagRFP в качестве FRET-пары [22]. В новых конструкциях донор TagGFP заменили на дальнекрасные белки mKate, eqFP650 или eqFP670, а акцептор TagRFP – на iRFP, оставляя между белками FRET-пары линкер “с3” с сайтом узнавания каспазой-3. В качестве вектора использовали плазмиду pQE-30.

Полученные конструкции каспазных сенсоров, обозначенные mKate2-с3-iRFP, eqFP650-с3-iRFP и eqFP670-с3-iRFP, были экспрессированы в бактериях. В норме, в клетках *E. coli* не содержится достаточной концентрации биливердина IX $\alpha$ , чтобы обеспечить флуоресценцию экспрессируемых бактериофитохромов. Для экспрессии полученных нами конструкций мы оптимизировали протокол [24], разработанный для генно-инженерных работ с бактериофитохромами. Вкратце, клетки *E. coli* котрансформировали плазмидой, несущей вариант сенсора, и плазмидой, кодирующей гем-оксигеназу – фермент, превращающий присутствующий в клетках *E. coli* гем в биливердин IX $\alpha$ . Для усиления продукции гема бактерии выращивали в присутствии предшественника гема –  $\delta$ -аминолевулиновой кислоты.

Для конструкции каспазного сенсора mKate2-с3-iRFP наблюдали плотно растущие колонии синего цвета, флуоресцирующие в красной области спектра при анализе с использованием флуоресцентного стереомикроскопа. На чашках с конструкциями сенсоров eqFP650-с3-iRFP и eqFP670-с3-iRFP при тех же условиях трансформации плотность колоний была существенно ниже и колонии не проявляли окраски. Флуоресценцию наблюдали только для отдельных колоний. Предположительно, из-за димерных свойств как обоих белков-доноров, так и акцептора, сенсоры могли частично агрегировать и формировать тельца включения, препятствуя росту бактерий.

Для анализа спектральных свойств полученных сенсоров, проводили их очистку из фракции растворимых белков с помощью металл-аффинной хроматографии. Флуоресцентная спектроскопия показала, что в составе полученных каспазных сенсоров для каждого донора и акцептора сохраняются их естественные максимумы возбуждения и эмиссии (рис. 2). Для акцепторного белка в спектре возбуждения всех трех вариантов сенсора дополнительно присутствует пик, соответствующий максимуму возбуждения белка-донора (рис. 2, правые спектры). Соответственно, при возбуждении донорного белка (в области его максимума возбуждения) в спектре флуоресценции присутствует пик, соответствующий максимуму флуоресценции акцепторного белка (рис. 2, левые спектры).

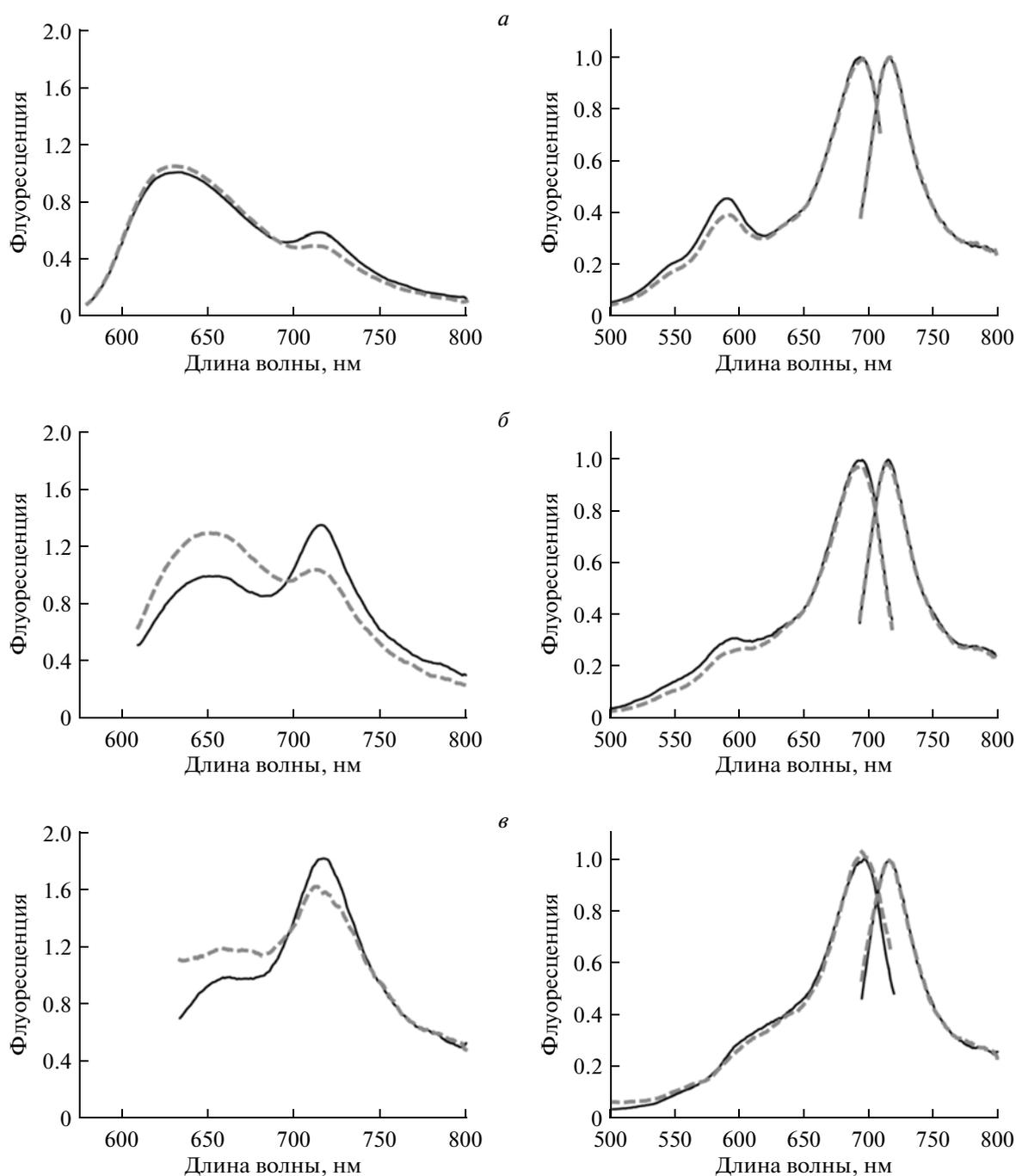
Для определения эффективности FRET мы измеряли спектры флуоресценции сенсоров до и после обработки каспазой-3. Три варианта сенсора показали общую тенденцию изменения сигнала, однако амплитуда изменений была разной (рис. 2). При возбуждении донорного белка после обработки каспазой интенсивность его эмиссии увеличилась, в то время как интенсивность эмиссии акцепторного белка снижалась. Соответственно, в спектрах возбуждения акцептора наблюдалось уменьшение вклада пика возбуждения донора. Самые значительные изменения спектров возбуждения и эмиссии наблюдали для сенсора eqFP650-с3-iRFP, минимальные – для mKate2-с3-iRFP.

Таким образом, из протестированных нами трех дальнекрасных флуоресцентных белков, самый эффективный FRET (приблизительно 30%) в паре с iRFP проявлял eqFP650. Вместе с тем, конструкция для сенсора mKate2-с3-iRFP демонстрировала лучшую эффективность экспрессии в бактериях.

Полученные в данной работе сенсоры обладают четко выраженным спектральным ответом на обработку каспазой-3, однако динамический диапазон этих изменений заметно уступает таковому для лучших описанных в литературе сенсоров этого класса, например Casper3-GR. Вместе с тем, используемые в настоящее время FRET-пары белков занимают наиболее популярные каналы для флуоресцентной микроскопии (синий и зеленый или зеленый и красный). Кроме того, для работы *in vivo* на млекопитающих оптимальным спектральным диапазоном является дальнекрасная-ближнеинфракрасная часть спектра, поскольку в ней происходит минимальное поглощение и рассеяние света в тканях животных [2]. Таким образом, новые сенсоры на основе iRFP могут найти применение как для многопараметрической микроскопии (с одновременной детекцией активности каспазы-3 в дальнекрасной области и других структур или активностей в каналах детекции от синего до оранжевого), так и для биоимиджинга на уровне целых животных.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Генно-инженерные манипуляции.** На основе плазмид iRFP-pBAD (любезно предоставленной проф. В.В. Верхушей, Медицинский колледж им. А. Эйнштейна, Иешива-Университет, Бронкс, США) и pmKate2-N, pTurboFP650-N, pNirFP-N (Evrogen) были созданы конструкции каспазных сенсоров mKate2-с3-iRFP, eqFP650-с3-iRFP, eqFP670-с3-iRFP. Для этого ПЦР-амплифицированный фрагмент ДНК, кодирующий соответствующий флуоресцентный белок, клонировали в вектор pQE-30 (Qiagen, Германия), используя сайты рестрикции Kpn1/Sal1 (для iRFP) и BamH1/Sac1 (для каждого из донорных флуоресцентных белков). Использовали следующие праймеры (в названии



**Рис. 2.** Спектры флуоресценции химерных белков mKate2-c3-iRFP (а), eqFP650-c3-iRFP (б), eqFP670-c3-iRFP (в). На каждой панели слева показаны спектры эмиссии при возбуждении донора, справа – спектры возбуждения и эмиссии акцептора. Сплошными линиями показаны спектры образцов до обработки каспазой-3, пунктирными – после обработки.

праймеров указаны сайты рестрикции, флуоресцентные белки и индексы F или R для прямых и обратных праймеров; соответственно): BamH1-mKate2-F (TTGGATCCATGGTGAGCGAGCTGATTAAGG, сайт рестрикции подчеркнут) и Sac1-mKate2-R (TTGAGCTCTCTGTGC-

CCCAGTTTGCTAGG); BamH1-eqFP650/670-F (TTGGATCCATGGGAGAGGATAGCGAGCTGATC) и Sac1-eqFP650/670-R (TTGAGCTCGCTGTGCCCCAGTTTGCTAGG); Kpn1-c3-F1 (TTGTACCGAATTCGGTGGTTCTGGTTCTGATGAAGTTGATAAGCTTGGTGGTTCTGGTTC),

c3-iRFP-F2 (GTTGATAAGCTTG-TGGTTCTG-GTTCTATGGCTAGCATGACTGGTGGAC) и Sall1-iRFP-R (TTTGTCTGACTCACT-CTTCCAT-CACGCCGATC).

Последовательность ДНК GAATTCGGTG-GTTCTGGTTCTGATGAAGTTGATAAGCTTGG-TGGTTCTGGTTCTGGTACC, кодирующую линкер "c3" GGNSGDEVDGTSVATGS (идентичный используемому в плазмиде pCasper3-BG, Евроген), содержащий узнаваемую каспазой-3 последовательность DEVD, вносили в целевые конструкции в составе праймеров при двухстадийной амплификации гена iRFP (сначала праймерами c3-iRFP-F2 и Sall1-iRFP-R, затем праймерами Kpn1-c3-F1 и Sall1-iRFP-R). Правильность последовательностей подтверждали секвенированием.

**Гетерологическая экспрессия.** Экспрессию полученных генетических конструкций проводили в клетках *E. coli* (штамм BW25113). Клетки трансформировали в два этапа. На первом этапе получали клетки, трансформированные плазмидой pwa23-НО (любезно предоставлена проф. В.В. Верхушей), экспрессирующей ген гем-оксигеназы под контролем промотора из рамнозного оперона *E. coli* (гем-оксигеназа необходима для синтеза биливердина IX $\alpha$  – кофактора iRFP) и ген канамициновой устойчивости. Из этих клеток готовили компетентные клетки для электропорации, и на втором этапе их трансформировали плазмидой, кодирующей один из трех вариантов каспазного сенсора.

Бактерии растили на чашках Петри, содержащих рамнозу (0.0024% по массе), канамицин (0.1 мг/мл), ампициллин (0.5 мг/мл) и предшественник гема –  $\delta$ -аминолевулиновую кислоту (0.2 мМ) в LB-агаре (10 г триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl, 15 г агара на 1 л) в течение ночи при 37°C, затем при комнатной температуре в течение суток.

Бактериальные культуры ресуспендировали в буфере PBS (рН 7.4, Helicon, Россия) и разрушали ультразвуком. Функциональные растворимые рекомбинантные белки очищали на металл-аффинном сорбенте TALON (Clontech, США) согласно рекомендациям производителя. Элюцию проводили в растворе PBS с добавлением имидазола (0.25 М).

**Измерение спектров флуоресценции.** Использовали флуоресцентный спектрофотометр Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Varian, США). Для всех каспазных сенсоров измеряли спектр возбуждения акцептора, детектируя флуоресценцию при длине волны 740 нм; а также спектры эмиссии при возбуждении донора (длина волны возбуждающего света – 550 нм для mKate2-c3-iRFP, 580 нм для eqFP650-c3-iRFP, 590 нм для eqFP670-c3-iRFP) и при возбуждении акцептора (длина волны возбуждающего света – 670 нм).

Спектры измеряли в одинаковых условиях до и после инкубации сенсоров с каспазой-3 (1 ед. акт.) (Abscam, Великобритания) при 37°C в течение часа. Дальнейшая инкубация с каспазой не приводила к существенному изменению спектров. Денатурирующий электрофорез образцов в ПААГ с 10% SDS подтвердил эффективное (>90%) разрезание каспазой каспазных сенсоров (не показано), как это было описано ранее для Casper3-GR [22].

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФ 14-25-00129. Оптимизация экспрессии iRFP поддержана грантом РФФИ 14-04-31600.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 1103–1163.
2. Deliolanis N.C., Kasmieh R., Wurdinger T., Tannous B.A., Shah K., Ntziachristos V. // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. P. 044008.
3. Gurskaya N.G., Fradkov A.F., Terskikh A., Matz M.V., Labas Y.A., Martynov V.I., Yanushevich Y.G., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // *FEBS Lett.* 2001. V. 507. P. 16–20.
4. Shkrob M.A., Yanushevich Y.G., Chudakov D.M., Gurskaya N.G., Labas Y.A., Poponov S.Y., Mudrik N.N., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Biochem. J.* 2005. V. 392. P. 649–654.
5. Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V., Fradkov A.F., Ermakova G.V., Solovieva E.A., Lukyanov K.A., Bogdanova E.A., Zاراisky A.G., Lukyanov S., Chudakov D.M. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. P. 741–746.
6. 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., Lukyanov S., Zاراisky A.G., Davidson M.W., Chudakov D.M. // *Biochem. J.* 2009. V. 418. P. 567–574.
7. Shcherbo D., Shemiakina I.I., Ryabova A.V., Luker K.E., Schmidt B.T., Souslova E.A., Gorodnicheva T.V., Strukova L., Shidlovskiy K.M., Britanova O.V., Zاراisky A.G., Lukyanov K.A., Loschenov V.B., Luker G.D., Chudakov D.M. // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. P. 827–829.
8. Chu J., Haynes R.D., Corbel S.Y., Li P., González-González E., Burg J.S., Ataie N.J., Lam A.J., Cranfill P.J., Baird M.A., Davidson M.W., Ng H.L., Garcia K.C., Contag C.H., Shen K., Blau H.M., Lin M.Z. // *Nat. Methods.* 2014. V. 11. P. 572–578.
9. Shu X., Royant A., Lin M.Z., Aguilera T.A., Lev-Ram V., Steinbach P.A., Tsien R.Y. // *Science.* 2009. V. 324. P. 804–807.
10. Filonov G.S., Piatkevich K.D., Ting L.M., Zhang J., Kim K., Verkhusha V.V. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. P. 757–761.
11. Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V. // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. P. 751–754.
12. Piatkevich K.D., Subach F.V., Verkhusha V.V. // *Chem. Soc. Rev.* 2013. V. 42. P. 3441–3452.

13. Pietraszewska-Bogiel A., Gadella T.W. // *J. Microsc.* 2011. V. 241. P. 111–118.
14. Arai Y., Nagai T. // *Microscopy (Oxf)*. 2013. V. 62. P. 419–428.
15. Filonov G.S., Krumholz A., Xia J., Yao J., Wang L.V., Verkhusha V.V. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. V. 51. P. 1448–1451.
16. Hock A.K., Lee P., Maddocks O.D., Mason S.M., Blyth K., Vousden K.H. // *Cell Cycle*. 2014. V. 13. P. 220–226.
17. Paulus-Hock V., Cheung E.C., Roxburgh P., Vousden K.H., Hock A.K. // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e98399.
18. Tran M.T., Tanaka J., Hamada M., Sugiyama Y., Sakaguchi S., Nakamura M., Takahashi S., Miwa Y. // *Exp. Anim.* 2014. V. 63. P. 311–319.
19. Mahajan N.P., Harrison-Shostak D.C., Michaux J., Herman B. // *Chem. Biol.* 1999. V. 6. P. 401–409.
20. Bardet P.L., Kolahgar G., Mynett A., Miguel-Aliaga I., Briscoe J., Meier P., Vincent J.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008. V. 105. P. 13901–13905.
21. Subach O.M., Gundorov I.S., Yoshimura M., Subach F.V., Zhang J., Gruenwald D., Souslova E.A., Chudakov D.M., Verkhusha V.V. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. P. 1116–1124.
22. Shcherbo D., Souslova E.A., Goedhart J., Chepurnykh T.V., Gaintzeva A., Shemiakina I.I., Gadella T.W., Lukyanov S., Chudakov D.M. // *BMC Biotechnol.* 2009. V. 9. P. 24.
23. Kominami K., Nagai T., Sawasaki T., Tsujimura Y., Yashima K., Sunaga Y., Tsuchimochi M., Nishimura J., Chiba K., Nakabayashi J., Koyamada K., Endo Y., Yokota H., Miyawaki A., Manabe N., Sakamaki K. // *PLoS One*. 2012. V. 7. P. e50218.
24. Gambetta G.A., Lagarias J.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 10566–10571.

## Infrared Fluorescent Protein iRFP as an Acceptor for Förster Resonance Energy Transfer

O. A. Zlobovskaya\*, K. S. Sarkisyan\*, K. A. Lukyanov\*,\*\*

\*Phone: +7 (499) 742-81-22; e-mail: kluk@ibch.ru

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

\*\*Institute of Biomedical Technologies, Nizhny Novgorod State Medical Academy,  
pl. Minina, 10/1, Nizhny Novgorod, 603005 Russia

Bacteriophytochrome-based infrared fluorescent protein iRFP was tested as an acceptor for Förster resonance energy transfer (FRET). Far-red GFP-like fluorescent proteins mKate2, eqFP650, and eqFP670 were used as donors. Bacterial expression vectors encoding donor and acceptor proteins fused by a 17-amino acid linker were constructed. FRET for purified proteins in vitro was estimated from increase of the donor emission after digestion of the linker. Among the three constructs tested, the most efficient FRET (approximately 30%) was detected for the eqFP650-iRFP pair.

*Keywords: fluorescent protein, GFP, iRFP, genetically encoded sensor, FRET*