



УДК 577.29

ОПТИМИЗАЦИЯ СВОЙСТВ ФЛУОРОГЕН-АКТИВИРУЮЩЕГО БЕЛКА picoFAST С ПОМОЩЬЮ СЛУЧАЙНОГО МУТАГЕНЕЗА

© 2026 г. Д. А. Мустафин*, С. А. Краснова*, М. С. Баранов*, **, Ю. А. Богданова*, **, #

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

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

Поступила в редакцию 02.06.2025 г.

После доработки 24.06.2025 г.

Принята к публикации 26.06.2025 г.

С использованием случайного мутагенеза получены и изучены библиотеки мутантных форм предложенного нами ранее наименьшего из существующих флуороген-активирующих белков picoFAST в комплексе с флуорогеном HBR-DOM2. Анализ последовательностей полученных вариантов и построение моделей их структур позволили определить аминокислотные позиции, перспективные для проведения направленного рационального мутагенеза для дальнейшего улучшения свойств флуороген-активирующего белка.

Ключевые слова: арилиден-азолон, флуороген-активирующие белки, флуорогены, флуоресцентное мечение

DOI: 10.7868/S1998286026010043

ВВЕДЕНИЕ

Открытие зеленого флуоресцентного белка (GFP) в 1962 г. [1] положило начало революции в области визуализации биологических объектов и протекающих в них процессов. GFP продемонстрировал высокую стабильность, яркость и удобство использования в гетерологичных системах. К настоящему времени разработана широкая палитра флуоресцентных белков с различными спектрами возбуждения и эмиссии флуоресценции, квантовым выходом и временами жизни флуоресценции [2–4]. Несмотря на успехи в разработке флуоресцентных белков, все представители этого класса имеют ряд ограничений. Во-первых, нарушения структуры хромофора вследствие фотоиндуцированных процессов приводят к постепенной потере флуоресценции белком (фотообесцвечиванию) [5]. Во-вторых, ограничением выступает необходимость созревания хромофора. Этот процесс препятствует использованию флуоресцентных белков для мониторинга некоторых процессов, таких как

изучение быстрых динамик экспрессии генов [6], а активно делящиеся клетки демонстрируют сниженную яркость, затрудняющую наблюдение за ними [7]. Кроме того, созревание хромофора требует присутствия кислорода и не может протекать в анаэробных условиях, что ограничивает область применения флуоресцентных белков [8]. В-третьих, значительная молекулярная масса GFP (26 кДа) может влиять на структуру и функциональную активность исследуемого белка в составе химерных конструкций [9–11]. Было показано, что компактные метки оказывают меньшее воздействие на целевые белки [12]. Размер флуоресцентного белка становится критическим ограничением и при создании векторных систем на основе рекомбинантных аденоассоциированных вирусов, которые способны эффективно упаковывать не более 4900 п.н. [13]. Кодированная последовательность флуоресцентных белков содержит ~750 п.н., и в силу консервативности структуры белков данного класса значительное уменьшение их размера не представляется возможным [14].

Сокращения: GFP – зеленый флуоресцентный белок.

Автор для связи: (+7 (965) 315-15-19; эл. почта: zashiki.vvarashi@gmail.com).

Перечисленные ограничения обуславливают необходимость разработки новых компактных генетически кодируемых меток для микроскопии, лишенных основных недостатков флуоресцентных белков.

Перспективное направление развития флуоресцентного мечения – флуороген-активирующие белки. Принцип их действия основан на использовании флуорогенов – органических молекул, которые практически не флуоресцируют в свободном состоянии. Флуоресценция этих соединений значительно возрастает только при связывании с белком вследствие ограничения подвижности молекулы в связывающем кармане белка. Среди флуороген-активирующих белков особую популярность приобретает FAST (Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag) и его производные [15]. FAST обладает рядом преимуществ по сравнению со стандартными флуоресцентными белками. FAST значительно компактнее (14 кДа, 125 а.о.), при этом он не требует процесса созревания или присутствия кислорода в среде и способен активировать флуоресценцию флуорогена в момент окончания синтеза на рибосоме. FAST демонстрирует повышенную устойчивость к фотообесцвечиванию благодаря обратимому характеру связывания с флуорогеном – при фотоповреждении молекула флуорогена быстро замещается новой [15].

В рамках исследований нашего коллектива был создан еще более компактный флуороген-активирующий белок nanoFAST, полученный путем делеции 26 а.о., составлявших неупорядоченный *N*-концевой участок исходного белка FAST [16]. Данный модифицированный вариант сохраняет все функциональные преимущества полноразмерного FAST. В ходе разработки сплит-варианта nanoFAST было установлено, что *N*-концевой фрагмент белка обладает способностью активировать флуоресценцию флуорогена класса арилиден-азолонов HBR-DOM2. Этот фрагмент, содержащий всего 88 а.о., получил название picoFAST [17]. Нами была продемонстрирована возможность его успешного применения для флуоресцентного мечения живых эукариотических клеток, однако требуемые концентрации флуорогена (40 мкМ) оказались достаточно высокими. В данной работе мы поставили перед собой цель оптимизировать свойства picoFAST путем внесения точечных аминокислотных замен методом случайного мутагенеза с использованием ПЦР.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание библиотек мутантных вариантов picoFAST было начато с подбора условий случайного мутагенеза на основе известных протоколов [18, 19]. Цель этого этапа работы заключалась во внесении в кодирующую последовательность picoFAST не менее 3–4 нуклеотидных замен, приводящих к 1–2 аминокислотным заменам. Поскольку кодирующая последовательность picoFAST составляет 267 п.н., необходимо было достичь частоты мутаций 11–15 замен на 1000 п.н. Для достижения требуемой частоты мутаций мы использовали несбалансированные концентрации отдельных дезоксирибонуклеотидов, что приводило к внесению в ПЦР-продукт повышенного количества мутаций. Дополнительное увеличение частоты мутаций достигалось добавлением в реакционную смесь $MnCl_2$, снижающего точность синтеза ДНК-полимеразой. Использовали Taq-полимеразу, характеризующуюся отсутствием 3'-5'-экзонуклеазной (корректирующей) активности. В результате мы подобрали условия, при которых вносился в среднем 3.75 замен на кодирующую последовательность picoFAST (точные условия описаны в разделе “Эксперим. часть”).

Для получения библиотек большого объема применяли клонирование Golden Gate по стандарту MoClo, позволяющее с высокой эффективностью осуществлять лигирование ПЦР-вставок в целевую плазмиду. Мы использовали плазмиду pBAD, оптимизированную для проведения MoClo. Добавление в агаризованную среду для культивирования индуктора экспрессии белка (арабинозы) в данном случае позволяло получить бактериальные колонии с низким разбросом уровня экспрессии (рис. 1а). Для активации флуоресценции в агар также добавляли флуороген HBR-DOM2. Скрининги проводили при помощи системы документирования ChemiDoc. Таким образом нами было получено и проанализировано 1.5×10^4 бактериальных колоний, экспрессирующих мутантные варианты picoFAST (рис. 1). Для дальнейшего анализа было отобрано 10 вариантов picoFAST (табл. 1), интенсивность флуоресценции которых превышала среднюю интенсивность исходного picoFAST не менее чем на два среднеквадратичных отклонения.

Был проведен анализ характера распределения точечных замен в полученных вариантах picoFAST, а также построены модели их структур с использованием сервиса AlphaFold Server (<https://alphafoldserver.com/>). Полученные модели

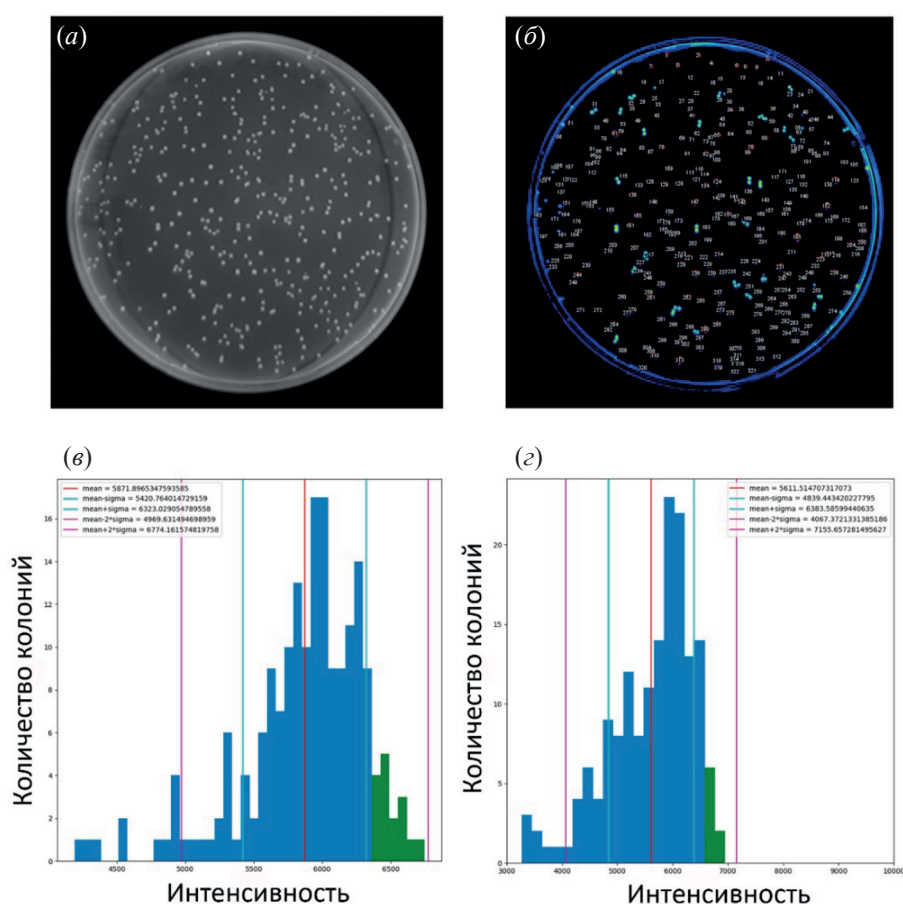


Рис. 1. Определение перспективных мутантных вариантов флуороген-активирующего белка picoFAST. (a) – Фотография флуоресцирующих колоний на одной из чашек библиотеки, получена на системе для визуализации ChemiDoc; (б) – результат обработки фотографии (a) в программе FIJI. Все одиночные колонии выделены в отдельные пронумерованные ROI, в каждом ROI далее посчитана нормированная на площадь яркость колонии; (в) и (г) – распределения яркости отдельных колоний на контрольной чашке, бактерии которой экспрессируют picoFAST (в), и на чашке библиотеки (г).

Таблица 1. Аминокислотные замены, выявленные у наиболее ярких вариантов picoFAST

Мутантный вариант picoFAST	Замены
R1	L33P, G69S, M95V, H108Y
R2	D34N, V66A
R3	K80E
R4	D36G, N43D, D53G, K78R, E93G, K110R
R5	I31V, L40P, I49T, F63I, T90R
R6	K110R
R7	G59D, N61D
R8	F75S, M95V, K106R
R9	I49F, E81G
R10	K111R

Примечание: нумерация замен соответствует полноразмерному белку FAST.

сравнивали с ЯМР-структурой nanoFAST в комплексе с HBR-DOM2, полученной ранее [20] (рис. 2).

При моделировании структуры picoFAST учитывали наличие глицин-серинового линкера (GGSGGSGGS), добавленного в процессе клонирования между белком и тагом, состоящим из шести гистидинов. В данном случае для белка было предсказано замыкание β -листа, *N*- и *C*-концевые участки при этом формируют параллельную укладку. Согласно полученной модели, picoFAST имеет меньший объем, чем nanoFAST, что может ухудшать активацию флуоресценции флуорогенов вследствие сопутствующего снижения объема флуороген-связывающего кармана. Модель также предсказывает отдаление остатка E46 (нумерация соответствует нумерации полноразмерного FAST) от Y42 в кармане связывания. Данные остатки играют ключевую роль в активации флуоресценции флуорогенов. Для трех из полученных вариантов picoFAST (R2, R3 и R6) с помощью AlphaFold было предсказано размещение E46 развернутым внутрь кармана связывания, что могло вызвать увеличение яркости формируемого комплекса (рис. 3). За-

мены, которые к этому привели, расположены в *C*- и *N*-концевых цепях β -листа. В этих же участках белковой цепи расположены замены и большинства других улучшенных мутантов. На основании этого наблюдения мы предположили, что внесение дополнительных замен в *C*- и *N*-концевые цепи β -листа picoFAST может повысить интенсивность флуоресценции его комплекса с HBR-DOM2. Мы провели насыщающий случайный мутагенез по положениям 82 и 84–87. Положение M83 было оставлено без изменений как важное для взаимодействия с флуорогеном. К сожалению, в данном случае нам не удалось обнаружить новых вариантов picoFAST с возросшей яркостью комплекса с HBR-DOM2.

Было установлено, что положения I49 (встречается у двух улучшенных вариантов picoFAST) и V66 (вариант R2) могут представлять интерес для внесения замен. Эти позиции располагаются в непосредственной близости от флуороген-связывающего кармана и могут влиять на связывание флуорогена с белком. Подтверждение данной гипотезы требует проведения дальнейших исследований.

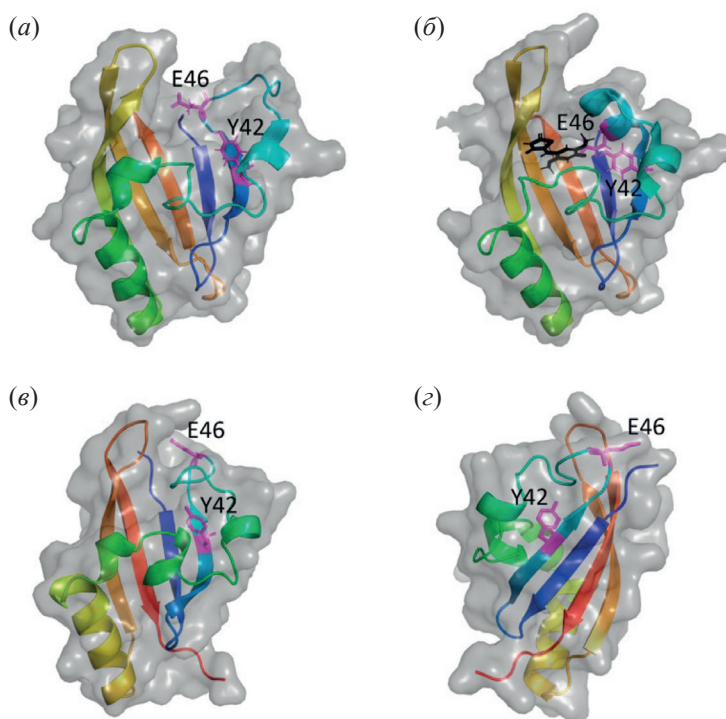


Рис. 2. Структуры флуороген-активирующих белков nanoFAST (определена с использованием ЯМР) и picoFAST (модель, получена в AlphaFold). Розовым обозначены остатки E46 и Y42, участвующие в связывании флуорогенов. (а) – Структура nanoFAST, апоформа (PDB: 8AO1); (б) – структура nanoFAST в комплексе с флуорогеном HBR-DOM2 (PDB: 8AO0); (в) и (г) – модель picoFAST, полученная с использованием сервиса AlphaFold.

Получение моделей структур picoFAST. Модели структур вариантов picoFAST были получены с использованием сервера AlphaFold Server (<https://alphafoldserver.com/>). Визуализацию полученных структур проводили при помощи программы PyMOL (v3.1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием случайного мутагенеза методом ПЦР получены библиотеки мутантных форм флуороген-активирующего белка picoFAST, отобраны 10 мутантных вариантов, продемонстрировавших наибольшую яркость в проведенных скринингах. Определены аминокислотные позиции, перспективные для проведения насыщающего случайного мутагенеза для дальнейшего улучшения этого самого маленького из всех существующих флуороген-активирующего белка.

Улучшенный вариант picoFAST может найти свое применение в визуализации чувствительных к добавлению меток белков и плотноупакованных клеточных структур.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-74-00013).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

Информированное согласие не требовалось.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

ДАМ и ЮАБ проводили эксперименты, подготовили иллюстративные материалы. ДАМ, МСБ и ЮАБ написали текст статьи.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. // *J. Cell Comp. Physiol.* 1962. V. 59. P. 223–239. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>
2. Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N.G., Palmer A.E., Tsien R.Y. // *Nat. Biotechnol.* 2004. V. 22. P. 1567–1572. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>
3. Nagai T., Ibata K., Park E.S., Kubota M., Mikoshiba K., Miyawaki A. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. P. 87–90. <https://doi.org/10.1038/nbt0102-87>
4. Subach O.M., Gundorov I.S., Yoshimura M., Subach F.V., Zhang J., Grünwald D., Souslova E.A., Chudakov D.M., Verkhusha V.V. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. P. 1116–1124. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.08.006>
5. Henderson J.N., Ai H.-W., Campbell R.E., Remington S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 6672–6677. <https://doi.org/10.1073/pnas.0700059104>
6. Balleza E., Kim J.M., Cluzel P. // *Nat. Methods.* 2018. V. 15. P. 47–51. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4509>
7. Guerra P., Vuilleminot L.-A., Rae B., Ladyhina V., Miliars-Argeitis A. // *ACS Synth. Biol.* 2022. V. 11. P. 1129–1141. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.1c00387>
8. Tsien R.Y. // *Annu. Rev. Biochem.* 1998. V. 67. P. 509–544. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.509>
9. Yang J., Wang N., Chen D., Yu J., Pan Q., Wang D., Liu J., Shi X., Dong X., Cao H., Li L., Li L. // *Stem. Cells Int.* 2017. V. 2017. P. 3167985. <https://doi.org/10.1155/2017/3167985>
10. Huang Z., Zhang C., Chen S., Ye F., Xing X.-H. // *Microb. Cell Fact.* 2013. V. 12. P. 25. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-25>
11. Dave K., Gelman H., Thu C.T.H., Guin D., Gruebele M. // *J. Phys. Chem. B.* 2016. V. 120. P. 2878–2885. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b11915>
12. Gelman H., Wirth A.J., Gruebele M. // *Biochemistry.* 2016. V. 55. P. 1968–1976. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01336>
13. Dong J.Y., Fan P.D., Frizzell R.A. // *Hum. Gene Ther.* 1996. V. 7. P. 2101–2112. <https://doi.org/10.1089/hum.1996.7.17-2101>
14. Ormö 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.273.5280.1392>
15. Plamont M.-A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., Moncoq K., Morellet N., Volovitch M., Lescop E., Chen Y., Triller A., Vriz S., Le Saux T., Jullien L., Gautier A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. P. 497–502. <https://doi.org/10.1073/pnas.1513094113>

16. Mineev K.S., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Povarova N.V., Sokolov A.I., Baleeva N.S., Smirnov A.Y., Myasnyanko I.N., Ruchkin D.A., Bukhdruker S., Remeeva A., Mishin A., Borshchevskiy V., Gordeliy V., Arseniev A.S., Gorbachev D.A., Gavrikov A.S., Mishin A.S., Baranov M.S. // *Chem. Sci.* 2021. V. 12. P. 6719–6725.
<https://doi.org/10.1039/d1sc01454d>
17. Baleeva N.S., Goncharuk M.V., Ivanov I.A., Baranov M.S., Bogdanova Y.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2025. V. 51. P. 721–728.
<https://doi.org/10.1134/s1068162024605536>
18. Vartanian J.P., Henry M., Wain-Hobson S. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 2627–2631.
<https://doi.org/10.1093/nar/24.14.2627>
19. Wilson D.S., Keefe A.D. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2001. Chapter 8. Unit 8.3.
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb0803s51>
20. Lushpa V.A., Baleeva N.S., Goncharuk S.A., Goncharuk M.V., Arseniev A.S., Baranov M.S., Mineev K.S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 11361.
<https://doi.org/10.3390/ijms231911361>
21. Weber E., Engler C., Gruetzner R., Werner S., Marillonnet S. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e16765.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016765>
22. Engler C., Kandzia R., Marillonnet S. // *PLoS One.* 2008. V. 3. P. e3647.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>

Random Mutagenesis-Based Optimization of the Fluorogen-Activating Protein picoFAST

M. A. Mustafin*, S. A. Krasnova*, M. S. Baranov*, **, and Yu. A. Bogdanova*, **

Phone: +7 (965) 315-15-19; e-mail: zashiki.vvarashi@gmail.com

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

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

Using random mutagenesis, libraries of mutant variants of the smallest known fluorogen-activating protein, picoFAST, in complex with the fluorogen HBR-DOM2 were generated and screened. Sequence analysis of the obtained protein variants and structural modeling enabled the identification of rational, targeted mutagenesis strategies for further optimization of the fluorogen-activating protein.

Keywords: arylidene-azolones, fluorogen-activating proteins, fluorogens, fluorescent labelling