



АНАЛИЗ ВРЕМЕН ЖИЗНИ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИИ МОДЕЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ КАК ПОДХОД К ФОТОФИЗИЧЕСКОЙ ИНЖЕНЕРИИ ФЛЮОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ¹

© 2023 г. Н. С. Балеева*, М. С. Баранов*, **, А. М. Богданов*, #

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

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

Поступила в редакцию 29.11.2022 г.

После доработки 10.12.2022 г.

Принята к публикации 12.12.2022 г.

Изучение структурно-функциональных взаимосвязей между хромофором и его белковым окружением — ключевой аспект при фотофизической инженерии флуоресцентных белков (ФБ), в частности в направленном получении их новых вариантов с высоким квантовым выходом флуоресценции (КВФ). Описаны подходы к увеличению КВФ, основанные на подавлении безызлучательных процессов в возбужденном состоянии, однако не выработан инструментарий направленного изменения константы флуоресценции (k_f), которая также выступает потенциально “настраиваемой” величиной. Мы предлагаем экспериментальный подход, в рамках которого синтетический хромофор ФБ моделирует “фиксацию” наиболее значимых безызлучательных констант и дает представление о пластичности времени жизни флуоресценции (как индикатора k_f). Для подтверждения работоспособности данного подхода мы проанализировали времяразрешенное флуоресцентное поведение аналогов хромофора зеленого и синего ФБ в разнообразном химическом окружении. Конформационно-фиксированный аналог хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP) в большинстве случаев показывал монофазные кинетики затухания флуоресценции со временем жизни 2.7–3.0 нс, адекватно моделируя типичное поведение GFP с наиболее высокими КВФ. В условиях же принудительной ионизации этого хромофора мы наблюдали увеличенные (до 4.3–4.6 нс) времена жизни флуоресценции, которые могут быть интерпретированы в терминах увеличения константы флуоресценции (k_f). Конформационно-фиксированный аналог хромофора Sirius показал биэкспоненциальные кинетики затухания флуоресценции, отчасти моделирующие свойства синих ФБ. В растворе уксусной кислоты это соединение проявило отличающиеся флуоресцентные свойства (интенсивную флуоресценцию с мажорной долгоживущей популяцией ~4 нс), которые можно интерпретировать как эмиссию необычной катионной формы хромофора.

Ключевые слова: флуоресцентный белок, GFP, Sirius, время жизни флуоресценции, модельный хромофор, сольватохромизм, константа флуоресценции

DOI: 10.31857/S0132342323030065, EDN: PDL0LW

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресцентные белки (ФБ) из морских организмов и их разнообразные генно-инженерные

варианты формируют важный класс генетически кодируемых флуоресцентных меток с автокаталитически формирующимся хромофором [1, 2]. Оптические свойства флуорофоров этого класса детерминированы не только химическим строением их хромофора (который представляет собой производные арилиден-имидазолонов [3]), но и его белковым окружением [3–5]. Так, прямые синтетические аналоги хромофоров ФБ практически не флуоресцируют в свободном растворенном виде [6, 7] в силу преобладания безызлучательных процессов их возбужденного состояния (прежде всего, вращения вокруг арил-алкеновой связи) над излучательными. Роль белкового матрикса, однако, не сводится к фиксации хромофор-

¹ Статья посвящается памяти академика РАН Иванова Вадима Тихоновича.

Сокращения: dbu — диазабициклоундецен; EGFP — улучшенный зеленый флуоресцентный белок (enhanced green fluorescent protein); ESPT — перенос протона в возбужденном состоянии (excited state proton transfer); fdFLI — визуализация времени жизни флуоресценции в частотном домене (frequency domain fluorescence lifetime imaging); GFP — зеленый флуоресцентный белок; k_f — константа флуоресценции; КВФ — квантовый выход флуоресценции; ФБ — флуоресцентные белки.

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

ной группы в (около)планарной конформации. Многочисленные гидрофобные и электростатические взаимодействия с хромофором аминокислотных остатков, экспонированных внутрь β -бочонка и расположенных на разном удалении от сопряженной π -электронной системы, оказывают определяющее влияние на энергетику основного и возбужденного состояний хромофора и тем самым на его спектральное своеобразие, квантовую эффективность, фотохимическую активность [4, 5, 8]. Таким образом, понимание структурно-функциональных взаимосвязей между хромофором и его белковым окружением – ключевой аспект при фотофизической инженерии ФБ, т.е. направленном получении их новых вариантов с усовершенствованными оптическими свойствами [9, 10].

Одна из центральных задач модификации ФБ – увеличение яркости их флуоресценции [5, 11]. В свою очередь, молекулярная яркость напрямую зависит от квантового выхода флуоресценции (КВФ), который базовыми уравнениями спектроскопии выражается через константы скорости релаксации возбужденного состояния хромофора:

$$\text{КВФ} = \frac{k_f}{(k_f + k_{nr})},$$

где k_f – константа скорости излучательной релаксации, k_{nr} – сумма констант всех безызлучательных процессов в возбужденном состоянии.

Для анализа структурных детерминант высокого КВФ с целью инженерии улучшенных ФБ применяется разнообразный методический арсенал [5, 12]. К его инструментам относятся молекулярное моделирование [13–16], структурный анализ [8, 17–19], направленная белковая эволюция [20, 21] и исследования изолированных хромофоров [9, 22–24]. Особенно результативным показывает себя комбинирование перечисленных подходов, позволяющее в отдельных случаях строить обобщенные модели функционирования хромофора конкретного типа [9, 10, 25]. Отметим, однако, что при всем разнообразии стратегии фотофизической инженерии ФБ предполагают в основном снижение эффективности безызлучательных процессов (т.е. уменьшение k_{nr}) [5]. В то же время не описано системных подходов к направленному изменению константы флуоресценции (k_f), которая, как свидетельствуют экспериментальные данные [26–28], также выступает переменной, потенциально “настраиваемой” величиной. Основой для исследования пластичности излучательной константы хромофора ФБ могли бы стать скрининги объемных библиотек их мутантных вариантов с анализом времени жизни флуоресценции (τ), величина которой связана с КВФ через k_f . Действительно, такой подход показал свою эффективность для поиска вариан-

тов ФБ с увеличенной яркостью [20, 29–31], но при высокой технической сложности и стоимости скринингов их информативность с точки зрения оценки константы флуоресценции, по всей видимости, невелика, поскольку разброс величины τ в данном случае детерминирован в основном лабильностью k_{nr} [5].

Мы предполагаем, что перспективной системой для изучения времен жизни флуоресценции хромофора ФБ в контексте исследования пластичности его излучательной константы выступит синтетический конформационно-фиксированный аналог этого хромофора. Если такое соединение адекватно моделирует “фиксацию” безызлучательных констант (а их вариативность, вероятно, сильно снижена), то его поведение в различном физико-химическом окружении может дать представление о пластичности константы флуоресценции (и времени жизни флуоресценции) хромофора и, соответственно, о теоретических пределах/перспективах ее последующей “настройки” в молекуле белка. Базовый методический вопрос, который мы ставили в настоящем исследовании, – соответствует ли времяразрешенное поведение конформационно-фиксированных аналогов хромофора зеленого и синего ФБ в разнообразном химическом окружении таковому у описанных в литературе генно-инженерных вариантов соответствующих белков с различающимися КВФ (прежде всего, близкими к единице). В ходе экспериментов также предстояло выяснить, наблюдаются ли в каких-либо из созданных физико-химических условий заметно увеличенные времена жизни флуоресценции (которые могли бы быть интерпретированы как увеличенные излучательные константы).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В качестве модельных соединений мы выбрали конформационно-фиксированные аналоги хромофора зеленого флуоресцентного белка (GFP) и сине-фиолетового ФБ Sirius (рис. 1, соединения (I) и (II) соответственно). Первый был выбран как модель наиболее широкого распространения и хорошо изученного хромофора, формирующегося из трипептида состава XYG [32, 33]; второй – напротив, как пример сравнительно экзотического и слабо охарактеризованного с фотофизической точки зрения хромофора состава QFG [34]. Синтез указанных соединений был произведен в соответствии с ранее предложенными и описанными нами методиками [23, 35]. Для формирования разнообразного окружения изучаемых хромофоров был привлечен представительный (~50 наименований) набор органических растворителей. Отметим, что похожий набор мы использовали в предыдущей работе, в которой анализировали корреляции ста-

ционарных и времяразрешенных свойств хромофора голубого ФБ [36].

Выбранные растворители можно разделить на шесть групп на основании их физико-химического своеобразия. Первую группу составляют алканы различного строения, которые создают липофильное окружение, не способствуют формированию электростатических взаимодействий хромофора с растворителем и слабо влияют на дипольный момент хромофора. Важно, что выбранные алканы существенно различаются по вязкости ($\eta = 0.3\text{--}3.0 \times 10^3 \text{ Па с}$) и показателю преломления, а воздействие этих параметров на характер затухания флуоресценции модельных хромофоров представляет значительный интерес, поскольку обе величины влияют на время жизни флуоресценции ФБ [37–39], а квадрат показателя преломления напрямую определяет величину излучательной константы (согласно уравнению Штриклер–Берга [40]). Вторую группу растворителей формируют одноатомные спирты, которые позволяют одновременно варьировать полярность и вязкость окружения хромофора, имитируя поведение полярных и гидрофобных остатков в белковом ядре. Третья группа – ароматические растворители, моделирующие влияние на излучательную константу соседствующих с хромофором остатков фенилаланина, тирозина и триптофана. Четвертая группа – основные растворители, позволяющие изучить роль электростатических взаимодействий в хромофорном окружении (в частности, смоделировать влияние на поведение хромофора остатков аргинина или лизина), влияющие на дипольный момент хромофора. К пятой группе относятся полярные растворители, которые имитируют соответствующие аминокислотные остатки и позволяют оценивать влияние полярного окружения на кинетику затухания флуоресценции отдельно от вязкости/показателя преломления. Наконец, шестую группу составляют специальные галогенсодержащие растворители, которые моделируют экстремально липофильное окружение хромофора, а также (в случае хлор- и бром-производных) позволяют изучать действие на затухание флуоресценции соседних с хромофором тяжелых атомов. Такое окружение хромофора может быть реализовано, например, в ФБ с неканоническими галогенированными аминокислотными остатками в окружении хромофора [41, 42].

Систематический анализ времяразрешенного флуоресцентного поведения модельных соединений мы начали с конформационно-фиксированного аналога хромофора GFP (рис. 1, соединение (I)). Ввиду значительного числа экспериментальных образцов мы приняли решение измерять кинетику затухания флуоресцентного сигнала разработанным нами высокопроизводительным методом с использованием макроимиджера, детектирующего времена жизни в частотном домене (frequency do-

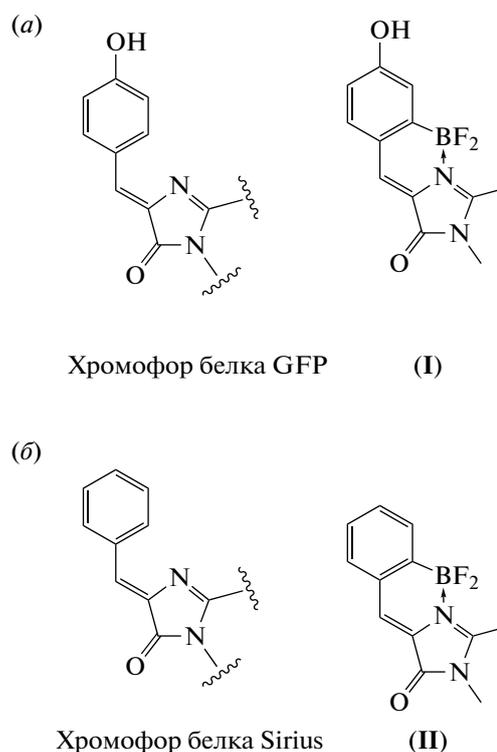


Рис. 1. Структуры хромофоров флуоресцентных белков и их синтетических аналогов: (а) – хромофор белка GFP и его конформационно-фиксированный аналог (соединение (I)); (б) – хромофор белка Sirius (слева) и его конформационно-фиксированный аналог (соединение (II)).

main fluorescence lifetime imaging, fdFLI). В результате удалось зарегистрировать сигналы высокого качества в большинстве растворов (табл. 1).

Все измеренные кинетики отличались однородностью флуоресцентных популяций и исключительно монофазным характером затухания (так, фазовые и модуляционные времена жизни, τ_f и τ_m , практически совпадали в большинстве измерений; в этой связи в табл. 1 для краткости мы приводим только значение τ_m). Наиболее значимое наблюдение по итогам эксперимента состояло в том, что время жизни флуоресценции конформационно-фиксированного GFP колебалось в сравнительно узком диапазоне 2.7–3.0 нс, не проявляя выраженной зависимости от свойств растворителя (полярности, вязкости, показателя преломления). Анализ крупнейшей базы данных физико-химических свойств ФБ FPbase [43] показал, что наиболее яркие зеленые флуоресцентные белки с хромофором состава XYG (прототип изучаемого здесь синтетического хромофора) обладают схожими кинетиками затухания флуоресценции. Так, популярный белок EGFP (КВФ ~ 0.6) имеет $\tau = 2.6\text{--}2.8 \text{ нс}$ [26], у белка Clover (КВФ ~ 0.76) $\tau = 3.2 \text{ нс}$ [44], а у наиболее ярко-

Таблица 1. Времена жизни флуоресценции конформационно-фиксированного аналога хромофора белка GFP в различных растворителях

Растворитель	Время жизни флуоресценции, нс	Растворитель	Время жизни флуоресценции, нс
Ацетонитрил	2.95	Дихлорэтан	2.84
Этилацетат	2.86	Дихлорметан	2.92
Диэтиловый эфир	2.82	Триэтиламин	–
Диметилацетамид	2.82	Тетраметилэтилендиамин (TMEDA)	–
Диоксан	2.86	<i>N</i> -Этилморфолин	–
Метилэтилкетон	2.85	Трифторэтанол	3.38
Циклогексанон	2.82	Октанол-2	2.91
<i>N</i> -Метилпирролидон	–	Тетрагидрофуран	2.82
Диметилсульфоксид	2.66	Хлороформ	2.88
Уксусная кислота	3.01	Дихлорбензол	2.70
Октан	–	Хлорбензол	2.69
Метанол	3.02	Бензол	2.71
Этанол	2.95	Толуол	2.63
Пропанол-1	2.82	Пиридин	2.82
Бутанол-1	2.93	Ундеканол-1	2.83
Гексанол-1	2.92	Пентанол-1	2.95
Деканол-1	2.89	Нитрометан	0.98
Додеканол-1	2.85	<i>Трет</i> -бутанол	3.04
Изоамиловый спирт	2.77	Циклогексанол	2.74
Изопропанол	2.71	Дибромметан	2.67
Бутанол-2	2.85	Метоксифторбутан	2.89

Примечание: прочерк – слишком слабая флуоресценция для детекции достоверного сигнала. Полужирным шрифтом выделены растворители, в которых зарегистрированы наиболее короткие и длинные времена жизни флуоресценции модельного соединения.

го из известных GFP mNeonGreen (КВФ ~ 0.8) $\tau = 3.1$ нс [45]. Фактически заметное отклонение от среднего значения времени жизни наблюдалось лишь в экстремально липофильном трифторэтанол (~ 3.4 нс) и в нитрометане (~ 1 нс). Мы полагаем, что в последнем случае наблюдается гашение флуоресценции за счет протекания в этом растворителе конкурентного безызлучательного процесса, переноса электрона возбужденного состояния на растворитель [46].

В целом результаты этого эксперимента свидетельствуют о том, что времяразрешенное поведение модельного соединения хорошо соответствует таковому у описанных ранее зеленых ФБ с высоким КВФ, а значит, наши методические предпосылки (о “фиксации” безызлучательных констант) верны. Вместе с тем мы усомнились, что наблюдаемые колебания времен жизни отражают полный диапазон изменения константы флуоресценции модельного соединения. Возможно, в значительной части растворителей испускание конформационно-фиксированного хромофора GFP происходит через перенос протона в возбужденном

состоянии (ESPT) [47], т.е. из нейтральной формы хромофора с существенной потерей части энергии возбуждения. В этой связи мы дополнительно изучили поведение принудительно ионизованного модельного соединения (I) в части растворителей.

Для дополнительного эксперимента были взяты растворы конформационно-фиксированного хромофора GFP в химическом окружении, имитирующем важнейшие условия, реализующиеся внутри молекулы ФБ (табл. 2). Ко всем растворителям перед измерениями добавляли диазабициклоундецен (dbu) – сильное органическое основание, обеспечивающее ионизацию хромофора. Таким образом, в этом случае мы анализировали исключительно прямую флуоресценцию из анионной формы хромофора, которая служит основным источником эмиссии практически значимых вариантов GFP. В этом эксперименте мы предпочли использовать для измерения кинетики затухания флуоресценции времяразрешенную спектрометрию с времякоррелированным счетом фотонов. Это менее производительный, но более высоко-

Таблица 2. Анализ кинетики затухания анионного хромофора GFP в растворителях основных классов (+ 0.05% dbu)

Растворитель	Число компонент	Время жизни флуоресценции, нс (вклад, %)*
Трифторэтанол	1	4.3
Изопропанол	1	4.0
Этилацетат	1	3.35
Диметилформамид	2	2.30 (21), 4.67 (68)
Диметилсульфоксид	2	2.35 (59), 4.2 (34)
Ацетонитрил	2	1.70 (32), 3.10 (63)
Хлороформ	1	3.94
Диоксан	2	1.26 (18), 3.43 (54)
Пиридин	2	1.24 (28), 3.6 (36)
Метанол	1	3.89
Толуол	1	3.10

* Указаны только относительные вклады (%) компонент затухания флуоресценции, относящиеся к изучаемому веществу. Вклад короткоживущих компонент, относящихся к аппаратной функции, не показан (по этой причине для двухкомпонентных кинетик сумма амплитуд значимых флуоресцентных компонент, как правило, менее 100%).

разрешающий метод флуоресцентного анализа, позволяющий, в частности, адекватнее характеризовать многокомпонентные затухания и выявлять возможные признаки протекания безызлучательных процессов в возбужденном состоянии.

Как и в предыдущем эксперименте, флуоресценция хромофора GFP демонстрировала преимущественно моноэкспоненциальную кинетику затухания, однако характерные времена жизни здесь оказались существенно выше, находясь в диапазоне 3.1–4.3 нс и достигая 4.67 нс у отдельных флуоресцентных популяций (табл. 2). С известной долей осторожности этот результат можно интерпретировать в терминах пластичности излучательной константы хромофора GFP. Иными словами, можно ожидать получения вариантов зеленых ФБ с хромофором состава XYG и временем жизни флуоресценции 4.0–4.5 нс. Природа гетерогенности флуоресцентной популяции в некоторых типах окружения (биэкспоненциальное затухание флуоресценции в диоксане, пиридине, диметилформамиде и пр.) остается неясной и требует дополнительных исследований, выходящих за рамки данной работы.

Для конформационно-фиксированного аналога хромофора синего флуоресцентного белка Sirius (рис. 1, соединение (II)) попытки времяразрешенного флуоресцентного анализа высокопроизводительным методом fdFLI оказались неудачными. Мы связываем неудовлетворительное качество сигнала с двумя факторами: сравнительно плохой растворимостью модельного соединения и неоптимальным режимом возбуждения флуоресценции ($\lambda_{ex} \sim 400$ нм), диктуемым конфигурацией установки. Однако методом спектрометрии с времякоррелированным счетом фотонов нам

удалось проанализировать наносекундные кинетики затухания флуоресценции этого флуорофора в большинстве выбранных растворителей (табл. 3). Измерения показывают, что флуоресценция Sirius характеризуется двухкомпонентным затуханием с характерными временами $\tau_1 \sim 2.0$ – 2.8 нс и $\tau_2 \sim 6.0$ – 8.5 нс (табл. 3). В целом оказалось затруднительным выявить выраженные закономерности зависимости времен жизни и амплитуд флуоресцентных популяций от свойств растворителя, однако наблюдается некоторая тенденция к увеличению времени жизни и вклада долгоживущей компоненты (τ_2) в гидрофобных неполярных вязких растворителях (например, додекане, пентадекане, гексадекане). Важно отметить, что флуоресцентная кинетика ФБ Sirius в литературе не описана, а близкие по стационарным спектральным свойствам синие флуоресцентные белки (EBFP, TagBFP) характеризуются монофазным затуханием флуоресценции со временами жизни 2.5–3.2 нс [43, 48], которые хорошо соответствуют таковым для короткоживущей (τ_1) формы хромофора Sirius (рис. 1, соединение (II)).

Интерпретировать долгоживущую флуоресцентную форму модельного соединения (τ_2) можно двояко. С одной стороны, привлекательной представляется гипотеза, что данная флуоресцентная форма соответствует субпопуляции хромофора с повышенной излучательной константой, и что полурациональное введение в хромофорное окружение ФБ Sirius неполярных (лейцин, изолейцин) и/или длинноцепочечных слабополярных (аргинин) аминокислотных остатков могло бы способствовать доминированию этой флуоресцентной формы в белке (что сделало бы соответствующий

Таблица 3. Анализ кинетики затухания конформационно-фиксированного аналога хромофора Sirius в растворителях разных классов

Растворитель	Хромофор Sirius, время жизни флуоресценции*			
	τ_1 , нс	A1, %	τ_2 , нс	A2, %
Гексанол-1	2.44	36	7.00	44
Пентанол-1	2.60	48.5	7.00	29.5
Циклогексанон	2.48	40	7.43	42
Циклогексанол	2.57	40	7.25	26
Изоамиловый спирт	2.18	51	6.70	28
Трет-бутанол	—	—	—	—
2-Метилбутанол-2	2.35	37	7.06	47
Бутанол-1	2.49	32	7.47	50
Бутанол-2	2.78	53	6.73	38
Октанол-1	2.80	45	7.78	50
Изобутиловый спирт	2.63	39	8.14	32
Трифторэтанол	2.85	37	6.25	34
Ундеканол-1	2.53	33	7.60	38
Додеканол-1	2.52	49	6.29	21
Нитробензол	2.26	25	8.50	11
Диизопропилэтиламин	2.35	57	6.98	27
Изопропанол	2.72	28	6.76	50
Этанол	2.60	26	7.75	38
Октанол-2	2.80	48	7.65	45
Деканол-1	2.45	29	7.93	33
Пропанол-1	2.46	29	8.04	40
Этилацетат	2.62	33	7.60	52
Диметилформамид	1.90	34	6.05	39
Тетрагидрофуран	2.66	33	7.90	44
Диэтиловый эфир	2.70	36	7.94	57
Дихлорметан	2.10	33.5	6.78	54.5
Диметилацетамид	2.28	35	6.13	50
Диметилсульфоксид	2.27	35	6.35	47
Ацетонитрил	2.83	65	6.37	21
Хлороформ	2.79	47	6.87	42
Диоксан	2.80	33	8.57	54
Октан	2.63	39	7.40	45
Пентадекан	2.60	35	8.40	52
Гексадекан	2.60	33	8.55	51
Декан	2.50	33	7.72	52
Уксусная кислота	1.20	31	4.02	64
Гексан	2.48	33.5	7.24	54.5
Додекан	2.70	34	8.37	49
Дихлорэтан	2.76	39	7.57	45
Нитрометан	2.25	35	6.39	20
Метилэтилкетон	2.50	45	6.83	42
Триэтиламин	2.23	29	6.25	52
N-Метилпирролидон	2.56	27	8.86	68
Дибромметан	2.50	38	6.13	46
Пиридин	2.21	35	6.16	43.5
Метанол	2.20	30	7.43	34
Толуол	2.55	33	7.17	51
Хлорбензол	2.85	42	7.82	45
Дихлорбензол	2.74	37	7.80	56
Бензол	2.68	39	6.94	43
Метоксиперфторбутан	2.84	33	6.24	35

* Указаны только амплитуды (A), или относительные вклады компонент затухания флуоресценции, относящиеся к изучаемому веществу. Вклад идентичных для всех измерений короткоживущих компонент, относящихся к аппаратной функции, не показан (по этой причине сумма амплитуд значимых флуоресцентных компонент, как правило, менее 100%).

вариант Sirius ценной меткой для времяразрешенной микроскопии). С другой стороны, экспериментальное подтверждение находит предположение, что происхождение τ_2 связано с (авто)флуоресценцией растворителя, которая в условиях плохой растворимости модельного соединения сравнима по амплитуде с сигналом последнего.

Интересно, что мы выявили аномальное поведение хромофора Sirius в уксусной кислоте — батохромный сдвиг максимума эмиссии (данные не приведены) и существенно укороченные времена жизни обеих флуоресцентных компонент этого флуорофора ($\tau_1 = 1.2$ нс (31%), $\tau_2 = 4.02$ нс (64%)). При этом интенсивность сигнала (средний счет фотонов при заданной мощности источника возбуждения) была практически на 2 порядка величины выше, чем в других условиях (вероятно, за счет существенно лучшей растворимости модельного соединения (II)). Можно предположить, что в уксусной кислоте мы наблюдаем флуоресценцию катионной формы хромофора [49, 50], а введение в хромофорное окружение ФБ Sirius сильно полярных и электрически заряженных аминокислотных остатков способно привести к похожему эффекту.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез модельных соединений (I) и (II). Синтез модельных соединений (I) и (II) проводили согласно методикам, разработанным ранее [23, 35]. На первом этапе были получены хромофоры-предшественники без конформационной фиксации (не флуоресцирующие в растворе). Для синтеза предшественников хромофоров типа GFP и Sirius использовали подход, связанный с применением имидатов, получаемых из ацетонитрила и эфира глицина. На втором этапе синтеза с помощью последовательного действия трибромид бора и плавиковой кислоты хромофоры-предшественники были превращены в конформационно-фиксированные аналоги (флуоресцирующие в растворе).

Подготовка растворителей. Всего для целей исследования было подготовлено 63 органических растворителя, относящихся к шести группам по физико-химическим свойствам.

Алканы были представлены гексаном, октаном, додеканом, пентадеканом и гексадеканом. Растворители этой группы были очищены перегонкой над гидридом кальция для удаления следов влаги и продуктов окисления.

Спирты были представлены изопропанолом, бутанолом-2, октанолом-2, циклогексанолом, 2-метил-бутанолом-2, *трет*-бутанолом, бутанолом-2, метанолом, этанолом, пропанолом-1, бутанолом-1, пентанолом-1, гексанолом-1, октанолом-1, деканолом-1, ундеканолом-1, додеканолом-1,

лом-1, изоамиловым спиртом и изобутанолом. Растворители этой группы также были очищены перегонкой над гидридом кальция для удаления следов влаги и продуктов возможного окисления.

Ароматические растворители были представлены дихлорбензолом, хлорбензолом, бензолом, толуолом, крезолом и мезитиленом. Растворители этой группы дополнительно не очищали, поскольку они были коммерчески доступны в вариантах с высокой степенью очистки.

Основные растворители были представлены триэтиламино, пиридином, тетраметилэтилендиамином, этилморфолином, диизопропиламино, этилдиизопропиламино, бутиламино и анилином. Некоторые из этих растворителей были коммерчески доступны в вариантах с высокой степенью очистки, а другие подготовлены с помощью перегонки над гидридом кальция.

Полярные растворители были представлены ацетонитрилом, ацетоном, этилацетатом, диэтиловым эфиром, тетрагидрофураном, диметилформамидом, диметилацетамидом, диоксаном, метилэтилкетон, циклогексанолом, *N*-метилпирролидоном, диметилсульфоксидом, уксусной кислотой и нитрометаном. Некоторые из этих растворителей были коммерчески доступны в вариантах с высокой степенью очистки, а другие подготовлены с помощью перегонки над гидридом кальция.

Специальные (экстремально липофильные) растворители были представлены трифторэтанолом, метилперфторбутиловым эфиром, перфторбензолом, перфтортолуолом, фторацетоном, фторпропанолом, фторпентанолом, дибромметаном, хлороформом, дихлорэтаном и дихлорметаном. Растворители этой группы дополнительно не очищали, поскольку они были коммерчески доступны в вариантах с высокой степенью очистки.

Для ионизации хромофора GFP добавляли в растворитель диазабициклоундец (dbu) в количестве 0.05% по объему.

Визуализация времени жизни флуоресценции в частотном домене. Измерение времен жизни флуоресценции нейтральной формы конформационно-фиксированного хромофора GFP производили путем последовательной флуоресцентной визуализации по 4–5 образцов в режиме анализа времени жизни флуоресценции в частотном домене (frequency domain fluorescence lifetime imaging) на модифицированной для визуализации макрообъектов установке, основанной на fdFLIM-системе LIFA (Lambert Instruments, Нидерланды). Для возбуждения флуоресценции использовали импульсные источники модулированного излучения из набора Multi-LED (Lambert Instruments, Нидерланды; $\lambda = 407$ и 471 нм, частота повторения импульсов 20 и 40 МГц, в зависимости от интенсивности флуоресценции конкретного образ-

ца). 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 проводили с помощью калибровочного образца “зеленая акриловая пластина” ($\tau = 4.2$ нс) из набора FSK5 (Thorlabs, США). Настройку режима детекции (время экспозиции, частоту повторения импульсов, число фаз и число повторений) и математическую обработку данных производили с помощью программы LIFA Tau Software 1.2.0 (Lambert Instruments, Нидерланды).

Времяразрешенная флуоресцентная спектроскопия. Времяразрешенный флуоресцентный сигнал ионизованного хромофора GFP и хромофора Sirius детектировали во временном домене (time domain fluorescence lifetime spectroscopy) методом времякоррелированного счета фотонов. Измерения производили с помощью времяразрешенного флуоресцентного спектрометра miniTau (Edinburgh Instruments, Великобритания) в кварцевой флуориметрической кювете (объем образца ~ 1 мл) во временном окне 50 нс, разделенном на 2048 временных каналов. Возбуждение флуоресценции производили пикосекундными лазерами EPL-375 (для Sirius) и EPL-450 (для GFP) (Edinburgh Instruments, Великобритания) с центральной длиной волны излучения 372 и 445.6 нм соответственно, частотой повторений 20 МГц; счет фотонов осуществляли в спектральном диапазоне 425–475 нм (Sirius) и 475–525 нм (GFP). Обработку и визуализацию данных, определение χ^2 (критерий Пирсона) проводили в программе Fluoracle 2.5.1 (Edinburgh Instruments, Великобритания).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проанализировано времяразрешенное флуоресцентное поведение аналогов хромофора зеленого и синего ФБ в разнообразном химическом окружении – в среде органических растворителей шести групп. Конформационно-фиксированный аналог хромофора GFP (прототипом которого служит планарный хромофор ФБ состава XYG) в большинстве случаев показывал кинетики затухания флуоресценции, чрезвычайно близкие к таковым у представителей семейства GFP с наиболее высокими КВФ, адекватно моделируя типичное поведение последних. В условиях же принудительной ионизации, снижающей потери энергии возбужденного состояния хромофора на ESPT, мы наблюдали увеличенные (до 4.3–4.6 нс) времена жизни флуоресценции, которые могут быть интерпретированы в терминах увеличения константы флуоресценции (k_f). Конформационно-фиксированный аналог хромофора Sirius (прототип – нейтральный хромофор необычного

состава QFG) показал биэкспоненциальные кинетики затухания флуоресценции, короткоживущая компонента которых похожа на родственные синие ФБ. В растворе уксусной кислоты, однако, модельное соединение проявило нетипичное фотоповедение (интенсивную флуоресценцию с мажорной популяцией $\tau \sim 4$ нс), которое можно интерпретировать как эмиссию катионной формы хромофора.

В целом реализованный экспериментальный подход, в рамках которого синтетический конформационно-фиксированный хромофор ФБ моделирует “фиксацию” наиболее значимых безызлучательных констант и дает понятие о пластичности времени жизни флуоресценции (как индикатора излучательной константы), представляется нам перспективным. Данный подход может использоваться в фотофизической инженерии ФБ для предварительной оценки пределов “настройки” времен жизни флуоресценции, которые можно ожидать от белков с конкретным типом хромофора.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Physiol. Rev.* 2010. V. 90. P. 1103–1163. <https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2009>
2. Lukyanov K.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2022. V. 633. P. 29–32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.08.089>
3. Zimmer M. // *Chem. Rev.* 2002. V. 102. P. 759–781. <https://doi.org/10.1021/cr010142r>
4. Maddalo S.L., Zimmer M. // *Photochem. Photobiol.* 2006. V. 82. P. 367–372. <https://doi.org/10.1562/2005-04-11-RA-485>
5. Mukherjee S., Jimenez R. // *J. Phys. Chem. B.* 2022. V. 126. P. 735–750. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.1c05629>
6. Dong J., Solntsev K.M., Poizat O., Tolbert L.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 10084–10085. <https://doi.org/10.1021/ja073622u>

7. Wu L., Burgess K. // J. Am. Chem. Soc. 2008. V. 130. P. 4089–4096.
<https://doi.org/10.1021/ja710388h>
8. Drobizhev M., Callis P.R., Nifosi R., Wicks G., Stoltzfus C., Barnett L., Hughes T.E., Sullivan P., Rebane A. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 13223.
<https://doi.org/10.1038/srep13223>
9. Lin C.-Y., Romei M.G., Oltrogge L.M., Mathews I.I., Boxer S.G. // J. Am. Chem. Soc. 2019. V. 141. P. 15250–15265.
<https://doi.org/10.1021/jacs.9b07152>
10. Lin C.-Y., Boxer S.G. // J. Am. Chem. Soc. 2020. V. 142. P. 11032–11041.
<https://doi.org/10.1021/jacs.0c02796>
11. Bajar B.T., Wang E.S., Lam A.J., Kim B.B., Jacobs C.L., Howe E.S., Davidson M.W., Lin M.Z., Chu J. // Sci. Rep. 2016. V. 6. P. 20889.
<https://doi.org/10.1038/srep20889>
12. Duwé S., Dedecker P. // Curr. Opin. Biotechnol. 2019. V. 58. P. 183–191.
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.04.006>
13. Olsen S., Smith S.C. // J. Am. Chem. Soc. 2007. V. 129. P. 2054–2065.
<https://doi.org/10.1021/ja066430s>
14. Faraji S., Krylov A.I. // J. Phys. Chem. B. 2015. V. 119. P. 13052–13062.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b07724>
15. Park J.W., Rhee Y.M. // J. Am. Chem. Soc. 2016. V. 138. P. 13619–13629.
<https://doi.org/10.1021/jacs.6b06833>
16. Simine L., Lammert H., Sun L., Onuchic J.N., Rossky P.J. // J. Am. Chem. Soc. 2018. V. 140. P. 1203–1206.
<https://doi.org/10.1021/jacs.7b10851>
17. Goedhart J., von Stetten D., Noirclerc-Savoye M., Lelimousin M., Joosen L., Hink M.A., van Weeren L., Gadella T.W.J., Jr., Royant A. // Nat. Commun. 2012. V. 3. P. 751.
<https://doi.org/10.1038/ncomms1738>
18. Bourgeois D. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 1187.
<https://doi.org/10.3390/ijms18061187>
19. Prangma J.C., Molenaar R., van Weeren L., Bindels D.S., Haarbosch L., Stouthamer J., Gadella T.W.J., Subramaniam V., Vos W.L., Blum C. // J. Phys. Chem. B. 2020. V. 124. P. 1383–1391.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.9b10396>
20. Manna P., Hung S.-T., Mukherjee S., Friis P., Simpson D.M., Lo M.N., Palmer A.E., Jimenez R. // Integr. Biol. (Camb.). 2018. V. 10. P. 516–526.
<https://doi.org/10.1039/c8ib00103k>
21. Mukherjee S., Manna P., Hung S.-T., Vietmeyer F., Friis P., Palmer A.E., Jimenez R. // J. Phys. Chem. B. 2022. V. 126. P. 4659–4668.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c01956>
22. Yan W., Zhang L., Xie D., Zeng J. // J. Phys. Chem. B. 2007. V. 111. P. 14055–14063.
<https://doi.org/10.1021/jp0756202>
23. Baranov M.S., Lukyanov K.A., Borissova A.O., Shamir J., Kosenkov D., Slipchenko L.V., Tolbert L.M., Yampolsky I.V., Solntsev K.M. // J. Am. Chem. Soc. 2012. V. 134. P. 6025–6032.
<https://doi.org/10.1021/ja3010144>
24. Mo G.C.H., Posner C., Rodriguez E.A., Sun T., Zhang J. // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 1848.
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-15687-x>
25. Conyard J., Heisler I.A., Chan Y., Bulman Page P.C., Meech S.R., Blancafort L. // Chem. Sci. 2018. V. 9. P. 1803–1812.
<https://doi.org/10.1039/c7sc04091a>
26. 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>
27. Sen T., Mamontova A.V., Titelmayer A.V., Shakhov A.M., Astafiev A.A., Acharya A., Lukyanov K.A., Krylov A.I., Bogdanov A.M. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. P. 5229.
<https://doi.org/10.3390/ijms20205229>
28. Mamontova A.V., Shakhov A.M., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // Biomolecules. 2020. V. 10. P. 1547.
<https://doi.org/10.3390/biom10111547>
29. 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., Jr. // Nat. Methods. 2017. V. 14. P. 53–56.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.4074>
30. Bindels D.S., Postma M., Haarbosch L., van Weeren L., Gadella T.W.J., Jr. // Nat. Protoc. 2020. V. 15. P. 450–478.
<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0250-7>
31. Mukherjee S., Hung S.-T., Douglas N., Manna P., Thomas C., Ekrem A., Palmer A.E., Jimenez R. // Biochemistry. 2020. V. 59. P. 3669–3682.
<https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00484>
32. Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y. // Nature. 1995. V. 373. P. 663–664.
<https://doi.org/10.1038/373663b0>
33. 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>
34. Tomosugi W., Matsuda T., Tani T., Nemoto T., Kotera I., Saito K., Horikawa K., Nagai T. // Nat. Methods. 2009. V. 6. P. 351–353.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1317>
35. 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>
36. Богданов А.М., Горбачев Д.А., Зайцева Э.Р., Смирнов А.Ю., Балеева Н.С. // Биоорг. химия. 2021. Т. 47. С. 413–416. [Bogdanov A.M., Gorbachev D.A., Zaitseva E.R., Smirnov A.Y., Baleeva N.S., Baranov M.S. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2021. V. 47. P. 784–787.]
<https://doi.org/10.31857/S0132342321030040>
37. Borst J.W., Hink M.A., van Hoek A., Visser A.J.W.G. // J. Fluoresc. 2005. V. 15. P. 153–160.
<https://doi.org/10.1007/s10895-005-2523-5>
38. van Manen H.-J., Verkuijlen P., Wittendorp P., Subramaniam V., van den Berg T.K., Roos D., Otto C. // Biophys. J. 2008. V. 94. P. L67–L69.
<https://doi.org/10.1529/biophysj.107.127837>
39. Suhling K., Siegel J., Phillips D., French P.M.W., Lévesque-Fort S., Webb S.E.D., Davis D.M. // Biophys. J. 2002. V. 83. P. 3589–3595.
[https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(02\)75359-9](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(02)75359-9)

40. Strickler S.J., Berg R.A. // *J. Chem. Phys.* 1962. V. 37. P. 814–822.
<https://doi.org/10.1063/1.1733166>
41. Seifert M.H.J., Ksiazek D., Azim M.K., Smialowski P., Budisa N., Holak T.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. P. 7932–7942.
<https://doi.org/10.1021/ja0257725>
42. Liu C.C., Schultz P.G. // *Annu. Rev. Biochem.* 2010. V. 79. P. 413–444.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.052308.105824>
43. Lambert T.J. // *Nat. Methods.* 2019. V. 16. P. 277–278.
<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8>
44. Lam A.J., St-Pierre F., Gong Y., Marshall J.D., Cranfill P.J., Baird M.A., McKeown M.R., Wiedenmann J., Davidson M.W., Schnitzer M.J., Tsien R.Y., Lin M.Z. // *Nat. Methods.* 2012. V. 9. P. 1005–1012.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2171>
45. Shaner N.C., Lambert G.G., Chamma A., Ni Y., Cranfill P.J., Baird M.A., Sell B.R., Allen J.R., Day R.N., Israelsson M., Davidson M.W., Wang J. // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. P. 407–409.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2413>
46. Yandell M.A., King S.B., Neumark D.M. // *J. Chem. Phys.* 2014. V. 140. P. 184317.
<https://doi.org/10.1063/1.4875021>
47. Chattoraj M., King B.A., Bublitz G.U., Boxer S.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. P. 8362–8367.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.16.8362>
48. Subach O.M., Gundorov I.S., Yoshimura M., Subach F.V., Zhang J., Grünwald D., Souslova E.A., Chudakov D.M., Verkhusa V.V. // *Chem. Biol.* 2008. V. 15. P. 1116–1124.
<https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2008.08.006>
49. Grigorenko B.L., Polyakov I.V., Savitsky A.P., Nemukhin A.V. // *J. Phys. Chem. B.* 2013. V. 117. P. 7228–7234.
<https://doi.org/10.1021/jp402149q>
50. Yang L., Nian S., Zhang G., Sharman E., Miao H., Zhang X., Chen X., Luo Y., Jiang J. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. P. 11640.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-47660-0>

Fluorescence Decay Analysis of the Model Compounds as an Approach to Photophysical Engineering of Fluorescent Proteins

N. S. Baleeva*, M. S. Baranov*, **, and A. M. Bogdanov*, #

*Phone: +7 (903) 746-08-49; e-mail: noobissat@ya.ru; bogdanoff@ibch.ru

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

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

Studying of structure-function relationships between a chromophore and its protein environment plays a key role in photophysical engineering of fluorescent proteins (FPs), specifically, in the guided designing of their new variants with a higher fluorescence quantum yield (FQY). Known approaches to FQY increasing mostly rely on suppression of the excited state nonradiative processes, but no tools have been suggested for the tuning of the radiative rate constant (k_r), which is also a potentially “adjustable” value. Here, we propose an experimental approach in which the synthetic chromophore of FP models the “fixation” of the most important radiationless constants and allows monitoring of the fluorescence lifetime flexibility (as an indicator of the k_r value). As a proof-of-concept, we studied the time-resolved fluorescence behavior of the green and blue FP chromophore analogs in diverse chemical environments. The conformationally locked analog of the GFP chromophore in most cases showed monophasic fluorescence decay kinetics with a lifetime of 2.7–3.0 ns, thus adequately modeling the typical behavior of GFPs with the highest FQYs. Under the conditions of stimulated ionization of this chromophore, we observed increased (up to 4.3–4.6 ns) fluorescence lifetimes, which can be interpreted in terms of an increase in the radiative constant (k_r). The conformationally locked analog of the Sirius chromophore showed biexponential fluorescence decay kinetics, partly simulating the properties of the blue FPs. In an acetic acid solution, this compound exhibited distinct fluorescent properties (elevated fluorescence intensity with a major lifetime population of ~4 ns), which can be interpreted as the emission of an unusual cationic form of the chromophore.

Keywords: fluorescent protein, GFP, Sirius, fluorescence lifetime, model chromophore, solvatochromism, radiative rate constant