

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия

Форма обучения очная

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

**«РАЗРАБОТКА НОВОГО ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОГО
ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ЗЕЛЁНОГО СЕНСОРА
НА АМИНОКИСОТУ ИЗОЛЕЙЦИН»**

Студент Асанова Асанова Айсылу Наилевна

Руководитель [подпись] Кручинина А.Д.

Рецензент [подпись] Дружинина Т.А.

Нормоконтролер [подпись] Солдатов С.А.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 20.05.24 № 12)

Заведующий кафедрой [подпись] Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 20.06.24 № 3)

Секретарь ГЭК [подпись] Клыченков С.В.

Пенза, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	6
1.1 Генетически кодируемые флуоресцентные белки	6
1.2 Кальциевые сенсоры на основе зеленых флуоресцентных белков ..	8
2.1.1 Состав и строение сенсоров	11
2.1.2 Параметры кальциевых сенсоров	16
2.1.3 Зеленые кальциевые индикаторы на основе EGFP и mNeonGreen	18
3.1 Аминокислотные сенсоры	20
3.1.1 Датчики глюкозы	20
3.1.2 Датчики пирувата и лактата	21
3.1.3 Датчик цитрата	23
3.1.4 Глутамин и альфа-кетоглутарат	24
3.1.5 Глутамат	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
2.1 Материалы исследования	28
2.2 Методы исследования	30
2.2.1 Амплификация фрагментов ДНК, рестрикция, электрофорез в	
агарозном геле, лигирование и очистка	30
2.2.2 Сайт-специфический мутагенез с помощью ПЦР с	
перекрывающимися фрагментами	33
2.2.3 Создание библиотек случайных мутантов	34
2.2.4 Трансформация бактериальных клеток	35
2.2.5 Скрининг библиотек	36
2.2.6 Исследование первичной структуры белков	38
2.2.7 Очистка белка и характеристика его свойств <i>in vitro</i> в растворе ...	39
2.2.7.1 Определение времени созревания	40
2.2.8 Создание конструкций для временной трансфекции культур клеток	
млекопитающих	42
2.2.9 Культивирование и трансфекция культур клеток	42
2.2.10 Флуоресцентная микроскопия	43

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	44
3.1 Разработка генетически кодируемого индикатора на изолейцин на основе флуоресцентного белка mNeonGreen и лейцин-изолейцин-валин связывающего белка LIV BP	44
3.2 Характеризация индикатора на изолейцин Nelle на очищенном белке <i>in vitro</i>	49
3.3 Визуализация индикатора на изолейцин Nelle в различных органеллах клеток млекопитающих.....	53
3.4 Кристаллическая структура индикатора Nelle в связанном с изолейцином состоянии	57
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	61
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	62

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Генетически закодированные флуоресцентные биосенсоры стали незаменимыми инструментами биологических исследований, позволяющими в режиме реального времени наблюдать за физиологическими процессами в живых клетках. Недавние усилия в области белковой инженерии привели к созданию большого разнообразия флуоресцентных биосенсоров для широкого спектра биологически значимых процессов.

Детекция незаменимых аминокислот важна для их промышленного производства, особенно 8-ми аминокислот: валина, изолейцина, лейцина, метионина, треонина, триптофана, фенилаланина и лизина. Для высокопроизводительного скрининга штаммов-суперпродуцентов аминокислот, необходимо проводить мониторинг таких аминокислот на клеточном уровне. Аминокислоты могут выполнять роль нейромедиаторов и нейромодуляторов в головном мозге, однако их роль остается малоизученной из-за отсутствия необходимых методов прижизненной детекции. Для решения этих задач необходимо разработать флуоресцентные генетически кодируемые аминокислотные индикаторы (ГКАИ).

До сих пор были получены ГКАИ на основе FRET (Фёрстеровского резонансного переноса энергии). Сенсоры FRET на основе флуоресцентных белков стали мощным инструментом для исследования белок-белковых взаимодействий и структурных изменений внутри белков. Но такие индикаторы имеют ограниченный флуоресцентный ответ на добавление аминокислот (меньше 100%) и требуют дорогостоящего оборудования, усложняя детекцию сигнала *in vivo*. Они содержат в своем составе два флуоресцентных белка, что существенно увеличивает их размер и ограничивает спектральный диапазон.

Все вышеупомянутое позволило выявить цель и задачи исследования.

Цель работы — разработка сенсора на изолейцин с оптимальным

дизайном на основе одного яркого мономерного циркулярно-пермугированного белка mNeonGreen в качестве флуоресцентной части и изолейцин-валин-лейцин-связывающего белка LIVBP.

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие задачи:

1. Провести несколько раундов скрининга по увеличению контраста, яркости и специфичности.
2. Охарактеризовать свойства сенсора Nelle в растворе *in vitro*.
3. Охарактеризовать свойства сенсора Nelle в животных клетках.

Выпускная квалификационная работа написана на 67 листах , содержит 20 рисунков, 1 таблицу и список литературы, состоящий из 50 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Генетически кодируемые флуоресцентные белки

Флуоресценция – физический процесс, один из видов люминесценции, в ходе которого вещество светится при действии на него источника возбуждения. Длительность свечения варьируется в промежутке 10^{-6} – 10^{-9} сек. Флуоресценция, с точки зрения физики, состоит из трех этапов: поглощения света, колебательной релаксации и излучательного перехода. Длительность поглощения света измеряется в фемтосекундах (10^{-15} сек). Этап колебательной релаксации электрона из более высокого возбужденного на самый низкий возбужденный уровень происходит за (10^{-15} сек). Процесс излучательного процесса, в ходе которого испускается более длинноволновый фотон и электрон возвращается в основное состояние, длится наносекунды (10^{-9} сек). Несмотря на то, что время жизни флуоресценции очень мало, благодаря своему чувствительному спектру излучения, высокому пространственному разрешению, это явление стало одним из самых важных инструментов в генетике и клеточной биологии [2].

Величайшим событием, положившим начало в использовании флуоресценции в научных исследованиях, является открытие зеленого флуоресцентного белка (Green Fluorescent Protein - GFP). Он впервые был выделен из медузы *Aequorea victoria* в 1961 году учеными О. Шимомурой, Ф.Джонсоном и Ю. Сайгой. Вместе с ним из той же медузы был получен белок-люцифераза, названный экворином, который излучая синий свет с длиной волны 465 нм, активировал GFP. Возбуждаясь, он испускал зеленое флуоресцентное свечение с максимумом интенсивности при длине волны 508 нм. Таким образом, был выделен первый флуоресцентный белок, но в течение долгого промежутка времени работы над ним не проводились. В 1992 году Дуглас Прэшер отсековировал белок, и спустя два года Мартин Чалфи клонировал его в бактерии *Escherichia coli* и *Caenorhabditis elegans*. С тех пор при помощи методов белковой инженерии началась разработка

флуоресцентных белков с разнообразными спектральными свойствами на основе GFP. Этот белок и его гомологи широко используются в биологических, химических и физических исследованиях.

Структура зеленого флуоресцентного белка была охарактеризована в 1996 году при помощи рентгеноструктурного анализа (рис. 1). Она состоит из 11 β -складок, образующих цилиндрическую β -складчатую структуру, напоминающую бочок, а также α -спирали и хромофора, находящихся внутри этой структуры [2]. Такая плотная структура защищает хромофор от многих воздействий окружающей среды.

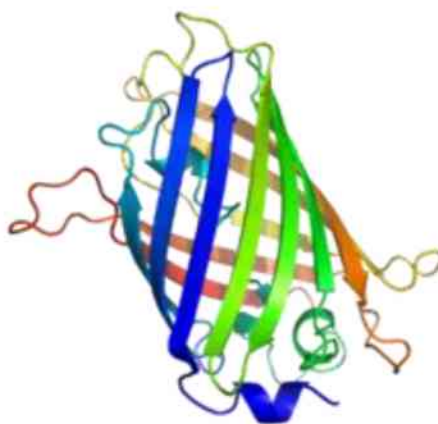


Рисунок 1. Структура зеленого флуоресцентного белка (GFP)

Хромофор – фрагмент белка, состоящий из трех аминокислотных остатков, который отвечает за флуоресценцию. Его образование в GFP внутри свернутой структуры белка состоит из трех ключевых этапов: циклизации трех аминокислотных остатков, дегидратации и окисления с участием кислорода. Формирование хромофора начинается с реакции нуклеофильного замещения, амидная группа глицина 67 атакует карбонильную группу серина 65, образуя пятичленное кольцо [2]. Далее оно подвергается дегидратации, и затем окисляется C α -C β связь тирозина 66 с образованием двойной связи. Кислород превращается в перекись водорода. Тем самым, получается ароматическая система, где имидазольное кольцо сопрягается с фенольной группой. И мы видим флуоресценцию [35]. Совокупность всех химических реакций называется созреванием хромофора (рис. 2).

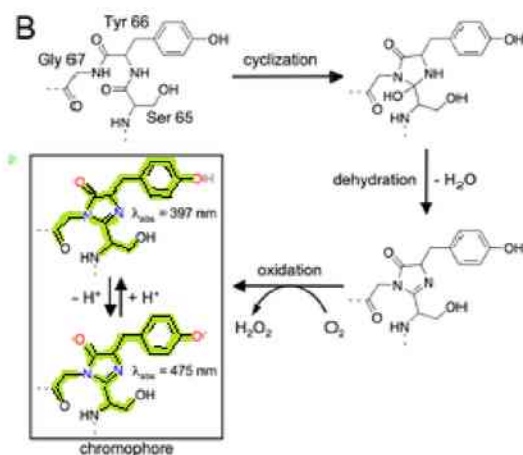


Рисунок 2. Схема созревания хромофора GFP

GFP стал универсальным и востребованным инструментом для биологических исследований, однако в 2013 году был выделен желтый флуоресцентный белок LanYFP из *B. lanceolatum* с высоким квантовым выходом ($\sim 0,95$) и коэффициентом экстинкции ($\sim 150000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), в последствии мутагенеза которого был разработан зеленый флуоресцентный белок mNeonGreen [35]. Максимумы поглощения и эмиссии наблюдаются при длинах волн 506 нм и 517 нм соответственно, квантовый выход равен 0,8, коэффициент экстинкции – $116000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Спектральные свойства данного белка лежат в диапазоне между желтым и зеленым свечением, позволяя использовать без потери испускаемых фотонов при использовании и зеленых, и желтых фильтров пропускания. mNeonGreen стал одним из самых ярких существующих флуоресцентных белков желтого и зеленого диапазона свечения того времени, а также активно используется при разработке биосенсоров на данный момент.

1.2 Кальциевые сенсоры на основе зеленых флуоресцентных белков

Генетически кодируемые кальциевые индикаторы (ГККИ) – мощные инструменты для прижизненной визуализации динамики концентрации ионов кальция *in vitro* и *in vivo*. В отличие от кальциевых индикаторов на основе флуоресцентных красителей (Fluo, Furo), ГККИ обладают более высоким

контрастом, и упрощенную доставку в определенные типы клеток и органелл. Более того, минимальная токсичность и незначительное нарушение внутриклеточных процессов делает их идеальными инструментами для длительных экспериментов в живых клетках. Их чувствительность позволяет измерять малые концентрации кальция от нескольких десятков нМ до нескольких сотен мкМ. С помощью ГККИ у нас появляется возможность исследовать биологические процессы, протекающие благодаря наличию кальция.

Ионы Ca^{2+} играют важную роль в образовании потенциала покоя (ПП) и потенциала действия (ПД) [5]. Большая часть этих ионов находится во внеклеточном пространстве. Кальций нейтрализует фиксированные наружные отрицательные заряды мембраны и карбоксильные группы интерстиция, вследствие чего увеличивается и стабилизируется ПП. Уменьшение концентрации ионов кальция вне клетки приводит к увеличению отрицательно заряженных частиц, уменьшению мембранного потенциала, который приближается к критическому потенциалу. В таком случае у нейронов при поступлении небольших электрических импульсов будут интенсивно генерироваться ПД, которые могут привести к судорожным сокращениям клеток мышц. Таким образом, концентрация ионов кальция оказывает влияние на важные характеристики клетки как ПП и ПД.

Помимо этого, ионы Ca^{2+} необходимы для синаптической передачи сигнала между нервными клетками. Например, при выделении нейромедиаторов в синаптическую щель. Это происходит в процессе ПД. При деполяризации мембраны пресинаптической клетки, открываются потенциал-зависимые Са-каналы. Ионы Ca^{2+} проникают внутрь клетки и активируют кальций-зависимую группу белков SNARE, отвечающих за экзоцитоз везикул с пресинаптической мембраной. Еще одним примером служит процесс долговременной потенциации (ДВП), в ходе которого увеличивается синаптический сигнал между двумя нервными клетками от нескольких часов

до нескольких дней после коротких периодических стимуляций. Процесс ДВП был впервые представлен учеными Блисс и Ломо для глутаматергических нейронов гиппокамповой формации [17]. На постсинаптической мембране находятся два рецептора, оказывающие большое влияние на ДВП – AMPA и NMDA. Они оба реагируют на глутамат. При выбросе в синаптическую щель, глутамат связывается с данными рецепторами, однако сначала открывается только AMPA-рецептор, т. к. NMDA-рецептор заблокирован магниевой пробкой. AMPA-рецептор становится проницаемым для ионов Na^+ , происходит деполяризация клетки, и изменение МП способствует выбиванию магниевой пробки. После этого NMDA рецептор пропускает и ионы Na^+ , и ионы Ca^{2+} . Последние активируют кальций-зависимый фермент, кальмодулин-зависимую протеинкиназу II, которая фосфорилирует AMPA-рецепторы, увеличивая ее проницаемость, а также и некоторые рецепторы, сопряженные с G-белком, в результате чего происходит синтез и встраивание новых AMPA- и NMDA-рецепторов. Следовательно, при увеличении концентрации ионов Ca^{2+} в постсинаптическом нейроне усиливается ответ на каждую молекулу глутамата. Благодаря этому ДВП считается ответственным за процессы обучения, кратковременной и долговременной памяти в нашем мозге. Таким образом, Ca^{2+} играет огромную роль в передаче синаптического сигнала, а также в нейропластичности нашего мозга.

Вместе с тем, ионы Ca^{2+} очень важны при мышечных сокращениях. Они хранятся в терминальных цистернах саркоплазматического ретикулума (СПР). Возбуждение ПД в мышечных клетках рядом с синапсом передается по мембранам миоцита и поперечных Т-трубочек. ПД в Т-трубочках активизирует ион Ca^{2+} , после чего ионы высвобождаются из СПР в саркоплазму и связываются с тропонином. Он меняет свою конформацию, смещая тропомиозин, который освобождает участки связывания головки миозина с актином, инициируя мышечное сокращение. При уменьшении

концентрации ионов Ca^{2+} в саркоплазме, тропонин возвращается в исходную конформацию и позволяет тропомиозину блокировать миозин.

В этой главе мы убедились в том, что изменение концентрации ионов Ca^{2+} может опосредовать различные биохимические механизмы в нашем организме. Они используются в нейронах и мышечных клетках. Для изучения этих процессов используются ГККИ, которые хорошо подходят для этого благодаря возможности измерять небольшие концентрации кальция.

2.1.1 Состав и строение сенсоров

ГККИ состоят из флуоресцентного белка и кальций-связывающего центра. При связывании ионов кальция с сенсором, он меняет свою конформацию, при этом меняются его флуоресцентные свойства. Например, смещение длин волн излучения, увеличение или уменьшение интенсивности флуоресценции.

В качестве кальций-связывающего центра чаще всего используют белковый комплекс CaM-M13 (кальмодулин и M13-пептид). Кальмодулин (CaM) состоит из двух доменов, разделенных шарниром, один из которых обладает высоким сродством к кальцию, а второй – низким [46]. Каждый домен содержит по два мотива EF-hand. Мотив EF-hand имеет структуру спираль-петля-спираль, обе спирали расположены перпендикулярно друг к другу, петля обладает четкой геометрией и может вмещать один ион кальция. Тем самым, кальмодулин может одновременно связать до четырех ионов кальция. M13-пептид, в свою очередь, является искусственно синтезированным, его последовательность идентична кальмодулин-связывающему домену киназы легких цепей миозина скелетных мышц. Известно, что кальмодулин связывается с этим пептидом даже в отсутствии остальной части белка. Домены EF-hand практически не меняются при соединении с M13-пептидом. Связывание ионов Ca^{2+} с кальций-связывающим центром позволяет изменять конформацию сенсора, изменяя

его необходимые нам свойства.

Недостатком использования в качестве кальций-связывающего центра кальмодулина из позвоночных является наличие белков-партнеров в нейронах млекопитающих, в этом случае уменьшается подвижность индикаторов в клетке. Это происходит по причине связывания CaM с другими молекулами CaM, кальмодулин-зависимыми ферментами и ионными каналами. Для решения данной проблемы был использован кальмодулин из грибов. Последовательность кальмодулина из грибов в большой степени гомологична кальмодулинам из метазоа и может быть беспрепятственно использована в составе ГККИ при визуализации динамики концентрации кальция в нейронах.

ГККИ подразделяются на два типа: с одним или двумя хромофорами во флуоресцентной части. Тип сенсоров с двумя хромофорами основан на процессе Фёрстеровского переноса энергии (Förster resonance energy transfer, сокр., FRET) [48]. Они, соответственно, называются донором и акцептором. Рассмотрим подробнее данный тип индикаторов.

Механизм Фёрстеровского переноса энергии заключается в следующей последовательности действий: возбуждении донора, переноса энергии акцептору, излучение акцептора. Важно учитывать, что перенос энергии осуществляется не посредством испускания фотонов, а диполь-дипольным взаимодействием между хромофорами.

Необходимыми условиями возникновения FRET являются расстояние между флуоресцентными белками меньшее 10 нм и перекрывание спектров эмиссии донора и поглощения акцептора более чем на 30%. Первое условие обуславливает работу индикаторов, конформационные изменения в белке при связывании кальция позволяют активировать/дезактивировать FRET в зависимости от области применения (рис. 3). Удовлетворяющие второму условию два белка называются “парой FRET”. На данный момент существуют несколько пар FRET, в том числе и излучающие в конечном счёте зелёный цвет (например, BFP и GFP). При соблюдении данных двух условий мы

получаем белок индикатора, состоящий из двух хромофоров и кальций-связывающего центра, позволяющий проводить различные эксперименты для изучения процессов, в которых причастен кальций.



Рисунок 3. Принцип работы индикаторов на основе FRET

ГККИ на основе FRET обладают определенными достоинствами и недостатками. Сильной стороной данных индикаторов является яркость в состоянии покоя, в этом случае мы имеем флуоресценцию донора. Таким образом, можно легко детектировать место локализации сенсора в отсутствие ионов кальция. Дополнительно, измерение динамики концентрации кальция при помощи ГККИ на основе FRET является очень чувствительным методом, позволяющим изучать множество внутриклеточных процессов. А также индикаторы на основе FRET несложны в разработке. Что касается недостатков, ограниченное число FRET пар препятствует использованию ГККИ для регистрации нескольких процессов. А также стоит упомянуть явление авто-флуоресценции, помимо сенсоров при освещении испускать фотоны могут и митохондрии, и лизосомы, образуя излишнее излучение. Поскольку время жизни флуоресценции мало, авто-флуоресценция может довольно сильно исказить картину. Таким образом, индикаторы на основе FRET обладают и достоинствами, благодаря которым их можно использовать в определенных экспериментах, однако у них есть недостатки, из-за которых они не нашли широкого применения.

Создание сенсоров на основе одного белка помогло избавиться от проблем с сенсорами на основе FRET [24]. Несмотря на то, что их разработка сложнее, однако они обладают по одной длине волны для возбуждения и

эмиссии, что уменьшает количество используемых фильтров. К тому же их молекулы белков меньше по размеру, у них выше контраст, что положительно сказывается на точности эксперимента, т.к. явление авто-флуоресценции в этом случае искажает картину гораздо слабее. Успешная разработка сенсоров на основе одного флуоресцентного белка типа GCaMP позволила биологам понять, что достоинства данных сенсоров перевешивают достоинства FRET. Поэтому на данный момент идет усиленная разработка и развитие сенсоров на основе одного флуоресцентного белка.

Существуют два разных типа кальциевых индикаторов на основе одного флуоресцентного белка: GCaMP- и NTnC-подобные индикаторы [38]. Они различаются по взаимному расположению флуоресцентных частей и кальций-связывающего домена относительно друг друга в белке.

Первым открытым типом биосенсоров является GCaMP-подобный. В качестве флуоресцентной части в нем был использован циркулярно-пермютированный белок cpEGFP (circularly permuted EGFP) [2]. Его строение заключается в том, что N- и C-концы EGFP соединили линкером GGTGGS, тем самым давая возможность ввести новые N- и C- концы в cpEGFP. В качестве нового N-конца выбрали аминокислоту Y145, заменили ее на M и к началу добавили полигистидиновый пептид. Таким образом, новым C-концом стал N144. Было замечено, что измененный белок сохранил свои флуоресцентные свойства, и у него повысилась pH-чувствительность с константой pKa от 6,15 до 8,3 по сравнению с EGFP. Для разработки GCaMP-подобных индикаторов в качестве линкеров между cpEGFP и CaM-M13 комплексов используются аминокислоты 145-148 (в нумерации EGFP), чаще всего для улучшения свойств биосенсоров мутируют данные аминокислоты, и они варьируются у различных индикаторов. Кальций-связывающий центр образует новые N- и C-концы. Схематическое строение сенсора представлено на рисунке 4 (А, В). Разработка GCaMP-подобных индикаторов позволило создать самый первый в истории генетически кодируемый кальциевый индикатор на основе одного

флуоресцентного белка *camgargo1*, далее наиболее усовершенствованные GCaMP и *perisat* и дало огромный толчок в ускорении разработки и улучшения кальциевых индикаторов.

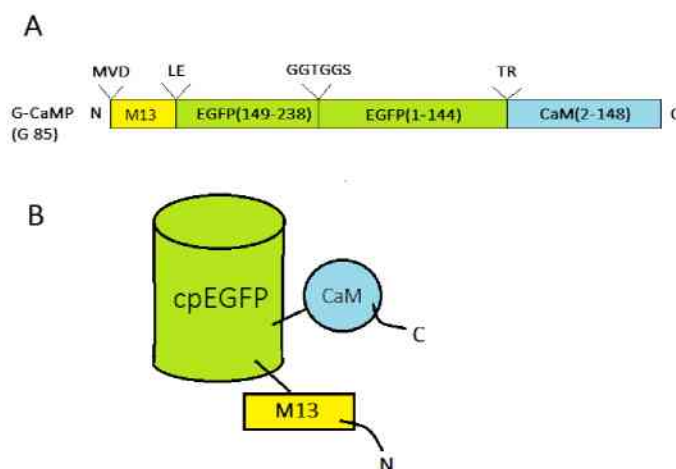


Рисунок 4. (А) Схематическое строение GCaMP-подобных кальциевых сенсоров. (В) Схематическое топологическое строение GCaMP-подобных сенсоров. N- и C-концы указаны на рисунке

Вторым удачным типом кальциевых сенсоров на основе одного флуоресцентного белка являются NTnC-подобные [6]. Различием от GCaMP-подобных сенсоров является тот факт, что вставка кальций-связывающей части во флуоресцентный белок сохраняет его N- и C- концы в белке индикатора, как показано на рисунке 5 (А). Благодаря этому изменению свойства сенсора не меняются при переклонировании из одной конструкции в другую. Представленный на рисунке 6 (А, В) белок NCaMP7 [38] разработан на основе зеленого яркого флуоресцентного белка mNeonGreen и кальций-связывающего центра CaM-M13 комплекса. Кальмодулин и M13-пептид связаны линкером GGSGGGSSS, а с mNeonGreen кальций-связывающий комплекс связан двумя варьирующимися линкерами, состоящими из трех аминокислот. По сравнению с GCaMP6, NCaMP7 показал в 1,7 раза больше яркость, похожий контраст в нейронах CA1 области гиппокампа (3.6 ± 1.5) (у GCaMP6 (4.1 ± 1.1) в нейронах V1 зрительной коры). Такой тип биосенсоров был использован для многих существующих индикаторов таких, как NTn,

iYTnC2, YTnC, NIR-GECO1, GAF-CaMP2 и ncpGCaMP6s, а также и для FAaCaMP, который представлен в данной дипломной работе. Таким образом, NTnC-подобные кальциевые индикаторы на основе одного флуоресцентного белка являются удачными, показывающими хорошие результаты, и являются лучшей альтернативой GCaMP-подобным индикаторам.

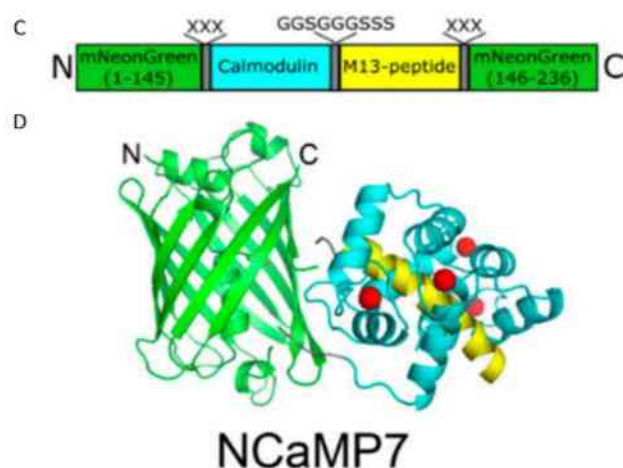


Рисунок 5. (А) Схематическое строение кальцевого сенсора NCaMP7. (В) Трехмерная структура NCaMP7, зеленым показан mNeonGreen, синим - кальмодулин, желтым - M13-пептид, красным – ионы кальция

Для завершения данной главы хочется подчеркнуть, что на данный момент наиболее актуальными для разработки сенсоров являются индикаторы на основе одного флуоресцентного белка, нежели чем на основе FRET по причинам простоты в эксплуатации и более высокого контраста. А также стоит упомянуть про усовершенствованный дизайн NTnC-подобных индикаторов, который используется для разработки FAaCaMP, над дизайном GCaMP-подобных индикаторов.

2.1.2 Параметры кальциевых сенсоров

Самыми главными параметрами кальциевых индикаторов являются яркость, динамический диапазон (контраст), константа диссоциации, полувремени роста и падения флуоресценции, скорости реакции связывания и диссоциации кальция, максимум возбуждения и эмиссии, коэффициент

экстинкции и квантовый выход.

Яркость показывает максимальную интенсивность флуоресценции белка, рассчитывается, в большинстве случаев, в кальций-связанном состоянии (F_{max}). Для характеристики ГККИ обычно измеряется в процентах относительно яркости другого индикатора, которая рассчитывается в одинаковых условиях вместе с исходным. Например, при измерении яркости зеленого кальциевого индикатора в культуре клеток HeLa, его коэкспрессируют с другим красным индикатором и нормируют яркость зеленого на красный и сравнивают нормированные яркостями с другими зелеными сенсорами.

Контраст ГККИ используется для количественной характеристики динамического диапазона и рассчитывается по формуле $\frac{\Delta F}{F} = \frac{F_{max} - F_{min}}{F_{min}}$, где F_{max} – интенсивность флуоресценции в кальций-связанном состоянии, а F_{min} – интенсивность флуоресценции в свободном состоянии. Как правило, F_{min} *in vitro* рассчитывается при отсутствии ионов кальция в буфере, в котором проводится измерение, а F_{min} *in vivo* – в состоянии покоя клетки. Т.к. в состоянии покоя концентрация свободных ионов кальция не равна нулю, зачастую контраст одного и того же кальциевого индикатора *in vivo* меньше, чем *in vitro*.

Реакции связывания ионов кальция с ГККИ можно описать при помощи величины константы диссоциации (K_d). Рассчитывается как молярная концентрация ионов кальция при интенсивности флуоресценции индикатора равной половине от максимальной. А также при помощи этой величины мы можем говорить о сродстве к ионам кальция. Чем меньше константа диссоциации – тем больше сродство к кальцию K_d .

Если говорить про кинетику ГККИ, то безусловно за них отвечают параметры полувремени роста/падения флуоресценции ($t_{1/2, rise}/t_{1/2, decay}$). Они показывают время, за которое интенсивность флуоресценции достигла

половины максимального значения после начала роста/падения флуоресценции. Обычно она рассчитывается для характеристики ответа кальциевого индикатора на увеличение концентрации при добавлении иономицина или тапсигаргина в клетках млекопитающих или на возбуждение одного или нескольких потенциалов действия в нейрональных культурах. А также за кинетику могут отвечать скорости реакций связывания/диссоциации ионов кальция (k_{on}/k_{off}). Чем быстрее кальциевый индикатор связывает или диссоциирует кальций – тем быстрее реагирует на резкие изменения концентрации ионов кальция, что хорошо при изучении активности нейронов, где длительности процессов рассчитываются несколькими миллисекундами.

Спектральные свойства характеризуют максимум возбуждения и максимум эмиссии. Они показывают длину волны, при котором в спектрах возбуждения и эмиссии соответственно наблюдается максимум.

Коэффициент экстинкции – показатель того, насколько хорошо вещество поглощает излучение при заданной длине волны. Квантовый выход - отношение числа возбуждающих фотонов на число фотонов, возникающих при эмиссии. Они рассчитываются относительно белков с известными показателями. Произведение коэффициента экстинкции на квантовый выход является молекулярной яркостью сенсора.

2.1.3 Зеленые кальциевые индикаторы на основе EGFP и mNeonGreen

В этой главе будут рассмотрены лучшие на данный момент ГККИ на основе зеленых флуоресцентных белков EGFP и mNeonGreen. А также большое внимание уделим сравнению яркостей и кинетики кальциевых индикаторов на основе этих белков.

Одними из лучших генетически кодируемых кальциевых индикаторов на основе одного флуоресцентного белка EGFP является семейство GCaMP [49], разрабатываемое Loren L. Looger et al. Основное применение

данных индикаторов: исследование нейронной активности в определенных нейронах и взаимодействие между нейронами. Электрические сигналы распространяются через нервные клетки за времена соразмерные миллисекундам. Поэтому для изучения влияния одной группы нейронов на другие требуются индикаторы для отслеживания изменения концентрации кальция на соответствующих временных масштабах. Одними из последних удачно разработанных являются три сенсора jGCaMP8s (sensitive), jGCaMP8m (medium), jGCaMP8f (fast) [49], которые обладают достаточно быстрой кинетикой, удовлетворяющей выше указанным условиям. Полувермя возрастания флуоресценции на внутриклеточную стимуляцию 1 ПД в культурах нейронов достигает нескольких миллисекунд, а полувермя падения – десятки миллисекунд (см. рис. 6). Таким образом, быстрая кинетика является сильной стороной ГККИ семейства GCaMP.

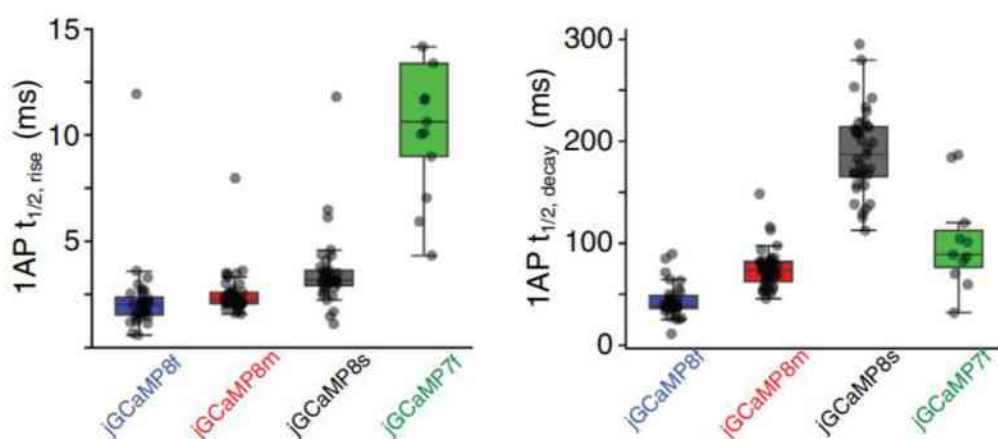


Рисунок 6. Полувермена возрастания и падения флуоресценции jGCaMP8 и jGCaMP7f на стимуляцию 1 ПД нейронов мыши первичной зрительной коры V1 L2/3

При создании данных сенсоров основной проблемой было одновременное улучшение двух свойств: кинетики и чувствительности. При улучшении первого свойства ухудшается второе и наоборот. Опыты показывают, что изменение кинетики очень чувствительно к мутациям между кальмодулином и кальмодулин-связывающим пептидом RS20, на большом

расстоянии от EF-hand кальмодулина. При замене у GCaMP6s RS20-пептида на другой пептид из кальмодулин-зависимой киназы киназы CaMKK- α/β , у получившихся ГККИ jGCaMP7 и jGCaMP8 ускорилась кинетика и чувствительность одновременно, благодаря чему можно сделать вывод о том, что взаимодействие кальмодулина и связанного с ним пептида однозначно влияет на кинетику и чувствительность сенсоров.

NCaMP7, разработанный Subach et. al., является одним из лучших представителей семейства ГККИ NCaMP. Он разработан на основе яркого зеленого флуоресцентного белка mNeonGreen и CaM-M13 комплекса. NCaMP7 имеет контраст 27 в присутствии 1 mM Mg^{2+} , сродство к ионам кальция ($K_d \sim 125$ nM), яркость, превышающую в 1,7 раз по сравнению с EGFP *in vitro*.

3.1 Аминокислотные сенсоры

3.1.1 Датчики глюкозы

Глюкоза является одним из наиболее фундаментальных метаболитов, поскольку она используется для производства энергии, а также для синтеза промежуточных продуктов метаболизма, начиная от сложных углеводов и заканчивая нуклеотидами, которые используются для синтеза РНК и ДНК.

Учитывая центральную роль метаболита, первоначальные усилия по визуализации привели к созданию датчика на основе CFP-YFP Cameleon FRET с промежуточным бактериальным глюкозо/галактозосвязывающим белком (GGBP), служащим приводом ответа FRET на колебания уровня глюкозы [8]. Улучшенные версии этой системы позволили создать новый набор репортеров с динамическим диапазоном от микромолярного до миллимолярного [40]. Новый набор сенсоров глюкозы на основе одиночных флуорофоров, Green Glifons, был создан путем разработки предыдущих версий, которые содержат бактериальный периплазматический белок, связывающий глюкозу/галактозу, встроенный в цитриновый вариант ядра GFP [23]. Эти сенсоры охватывают

широкий диапазон концентраций глюкозы, демонстрируя увеличение интенсивности флуоресценции в 5–8 раз. Однако они также демонстрируют значительное сродство к галактозе, и это следует принимать во внимание тем, кто планирует эксперименты с использованием этого углевода для уменьшения АТФ в результате гликолиза, увеличения потребления лактата и повышения OXPHOS.

Также сообщалось о датчике глюкозы на основе одноволновой интенсивности, который можно применять в различных системах, от отдельных клеток до организмов. Этот сенсор основан на пермутированном зеленом флуоресцентном белке с диапазоном чувствительности от 1 мкМ до 10 мМ, что практически охватывает большую часть диапазона концентраций как для систем *in vitro*, так и *in vivo*. Датчик демонстрирует значительный отклик (увеличение интенсивности флуоресценции до 200%) и гибкую применимость, позволяя даже получать прижизненные изображения. Следуя аналогичным стратегиям, были разработаны сенсоры моно (рибозы) или дисахаридов (сахарозы) и применены в системах немлекопитающих или даже у мелких животных, таких как *Drosophila* и *C. elegans* [32].

3.1.2 Датчики пирувата и лактата

Пируват играет решающую роль в клеточном метаболизме, поскольку он импортируется в митохондрии и превращается в ацетил-КоА для поддержания цикла Кребса, используется в реакциях трансаминирования, а также служит поглотителем АФК, в частности H_2O_2 . Лактат образуется из пирувата под действием лактатдегидрогеназы и в основном высвобождается во внеклеточное пространство. Превращение пирувата в лактат происходит с высокой скоростью, когда доступность кислорода ограничена (анаэробные условия).

Первоначальная попытка заключалась в создании наносенсора FRET на основе mTFP1-Venus, содержащего лактатсвязывающий домен белка LldR E.

coli, названного Lasonic (оптический наноиндикатор LACtate от CEC), где при связывании лактата регистрируется снижение эффективности FRET. Датчик дал отклик от слабого до умеренного, однако он был протестирован в диапазоне высоких концентраций (до 10 мМ); однако он был чувствителен к pH, что требовало нормализации показаний. Для сенсоров лактата особенно важно подтвердить их зависимость от pH, поскольку внеклеточная концентрация лактата может находиться в миллимолярном диапазоне (от 1 до 20 мМ или даже выше в некоторых случаях) как *in vitro*, так и *in vivo* [11], расширяя границы датчика в отношении его динамического диапазона, а также его реакции в кислой среде. В качестве доказательства принципа Баррос и другие использовали ядерно-ориентированную версию этого датчика в сочетании с датчиком глюкозы на основе FRET FLH12Pglu700 μ 86 [40] для мониторинга одновременных колебаний уровня глюкозы и лактата в клетках НЕК после фармакологического ингибирования экспорт лактата. Тот же датчик, а также датчик пирувата на основе FRET Pyronic [34] с отрицательным показанием (снижение FRET при связывании пирувата) применялся в экспериментах *in vivo* с использованием 2-фотонной и прижизненной визуализации для мониторинга внутриклеточные уровни лактата в астроцитах и нейронах после внутривенного введения лактата.

Совсем недавно были разработаны новые сенсоры лактата на основе одного белка с перестановкой лактата (названного Green Lindoblum) и пирувата (названного Green Pegassos), включающего часть белка LldR (аминокислоты 86–260).) для лактата или PdhR (1–260) для пирувата между аминокислотами N145 и S146 молекулы GFP, которая использовалась в кальциевом индикаторе G-GECO. Эти сенсоры демонстрируют повышенную специфичность и хороший динамический диапазон концентрации метаболитов (насыщение пируватом около 1 мМ и плато лактата около 2 мМ), с увеличением яркости, которое может достигать 5-кратного для Линдоблюма при самой высокой концентрации и 3 -fold для Пегассоса. Группа Роберта

Кэмпбелла недавно сообщила об одном белке-флуоресцентном репортере под названием eLACCO1.1, созданном путем вставки циркулярно пермугированного GFP (срGFP) в бактериальный L-лактатсвязывающий белок TTNA0766 и улучшения лучшего кандидата (из 70 конструкций) путем направленной эволюции. Сенсор, по-видимому, функционирует как димер, и для его функционирования требуется концентрация Ca^{2+} выше 0,6 мкМ. Датчик демонстрирует 5-кратное увеличение флуоресценции в присутствии 10 мМ лактата и использовался для мониторинга внеклеточного лактата в клетках в культуре, а также в мозге [24].

3.1.3 Датчик цитрата

Цитрат является продуктом цикла Кребса, который связывает углеводный и липидный обмен. Вскоре после обнаружения того, что активность цитратлиазы фактически связывает цикл Кребса с ацетилированием гистонов и экспрессией генов [43] было опубликовано сообщение о наборе сенсоров на основе FRET (CFP/Venus) для метаболита, использующих часть гистидинкиназа CitA из *Klebsiella pneumoniae*, которая содержит цитратчувствительный домен. Первоначально сенсоры были протестированы *in vitro* и на бактериях, но позже система была использована для измерения колебаний цитозольного цитрата в бета-клетках поджелудочной железы в зависимости от передачи сигналов CDK1. Хонда и Киримура [13] создали другой набор флуоресцентных индикаторов цитрата, основанный на круговой перестановке, но с использованием цитратсвязывающего домена CitA. Эти сенсоры (CF98) обладают высоким динамическим диапазоном (от 0,1 до 50 мМ), однако их отклик зависит от pH, и необходимо проводить нормализацию. Следуя стратегии единого флуоресцентного белка и основываясь на круговой перестановке, группа Роберта Кэмпбелла создала новый набор цитратных сенсоров, заменив домен кальмодулина (CaM)-RS20 из ранее сообщенного индикатора

Ca²⁺-ncpGCaMP6s [28] на остатки 4–133 домена CitAP *Klebsiella pneumoniae*. Следуя направленной эволюции, они создали два цитратных сенсора: один с повышенным сигналом при связывании цитрата (Citron1) с $\Delta F/F_{\min} \approx 9$ и один с обратным откликом (пониженный сигнал при связывании цитрата), названный Citroff1, с $\Delta F/F_{\min} \approx 18$, по сравнению с $\Delta F/F_{\min} \approx 1,1$ для сенсора CF98 (измерения проводились на изолированных белках в растворе).

3.1.4 Глутамин и альфа-кетоглутарат

Глутамин является наиболее распространенной аминокислотой в кровотоке и играет центральную роль в обмене веществ. Он может внутриклеточно превращаться в глутамат под действием глутаминазы, а затем глутамат может превращаться в альфа-кетоглутарат или использоваться для реакций трансаминирования. Несмотря на растущий интерес к изучению метаболизма глутамина и одного из его основных производных (α-кетоглутарата), палитра генетически кодируемых сенсоров остается скудной. Что касается глутамина, существует один сенсор на основе FRET [12], с белками Teal (mTFP) и Venus в качестве пары FRET (сенсоры FLIPQ-TV), использующий GlnH (периплазматическое связывание глутамина) в качестве актюатора. Эти датчики демонстрируют достаточную стабильность в физиологическом диапазоне pH, но их чувствительность считывания падает ниже 10% при концентрации глутамина в диапазоне от нано- до микромолярных. Ответ был незначительным в большинстве протестированных клеточных линий, несмотря на повышенную внеклеточную концентрацию глутамина (до 5 мМ). Альтернативный датчик на основе FRET содержит бактериальный GlnBP в виде камелеона с GFP. GlnBP включает неприродную флуоресцентную аминокислоту L-(7-гидроксикумарин-4-ил)этилглицин (CouA) путем замены кодона N138 янтарным кодоном (TAG) и совместной трансформации штамма *E. coli* C321.ΔA с помощью pEvol. -CouRS тРНК лигаза. Флуоресцентная аминокислота служит донором, а GFP —

акцептором. Датчик был протестирован *in vitro* и продемонстрировал максимальное увеличение коэффициента FRET в 1,9 раза, при этом кривая отклика была оттитрована для концентрации глутамина от 0 до 50 мкМ. Как упоминалось выше, этот тип сенсора требует коэкспрессии соответствующей тРНК-лигазы и представляет собой систему, которая должна преодолеть различные технические и биологические препятствия, прежде чем ее можно будет успешно применить.

Что касается альфа-кетоглутарата, то в настоящее время нет достоверных репортеров для систем млекопитающих или беспозвоночных. Однако были предприняты попытки создать репортеры на основе FRET, которые содержат либо регулятор транскрипции NifA из *Azotobacter*, который участвует в процессе фиксации азота и имеет кетоглутарат-связывающий домен (GAF), либо мономерный РИИ или Белки NtcA, оба из которых участвуют в метаболизме азота, несут домены, связывающие кетоглутарат, между CFP и YFP [18]. Эти датчики были протестированы *in vitro* и только на бактериях, обычно имеют умеренные отрицательные показания (снижение FRET) и для работы могут требоваться дополнительные факторы, такие как АТФ, что ограничивает их потенциал в качестве инструментов для визуализации *in vivo* у высших эукариот.

3.1.5 Глутамат

Глутамат уже давно находится в центре внимания нейробиологов, поскольку это самая распространенная аминокислота в мозге и играет центральную роль нейромедиатора. Был охарактеризован ряд переносчиков глутамата (EAAT1-3), которые демонстрируют предпочтение клеточного типа для своей экспрессии. Глутамат имеет решающее значение для сбалансированного функционирования мозга, поскольку низкие уровни этой молекулы связаны с серьезными патологическими состояниями, такими как деменция, шизофрения и эпилептические припадки, среди других [50]. Таким образом, молекула вызвала научный интерес для разработки генетически

закодированных биосенсоров для мониторинга внеклеточных уровней. Фактически, все доступные сенсоры для этой аминокислоты были разработаны для нейробиологических исследований без особого акцента на внутриклеточном влиянии глутамата на аминокислотный баланс и биоэнергетику. Основная проблема при модернизации датчиков заключается в том, что концентрация глутамата зависит от конкретного отсека и варьируется на порядки.

Была разработана серия сенсоров на основе FRET с использованием связывающего глутамат/аспартат белка YbeJ из *E. coli* и молекул ECFP/Venus (или Citrine) [26]. Последующие наблюдения привели к тому, что версия флуоресцентного репортера, чувствительного к глутамату (GluSnFR), улучшилась в 6,2 раза по сравнению с первоначальной версией и использовалась для мониторинга высвобождения глутамата в культивируемых нейронах гиппокампа, при этом сенсор был нацелен на плазматическую мембрану. Впоследствии лаборатория Лугера создала однобелковый флуоресцентный датчик на основе пермутированного флуоресцентного репортера, чувствительного к глутамату на основе интенсивности GFP (iGluSnFR), снова используя тот же YbeJ (или периплазматический глутамат-связывающий белок GltI из бактерий в качестве фактического сенсора), достигая 6-кратного увеличения флуоресценции при добавлении внеклеточного глутамата [21]. Это было дополнительно улучшено за счет замены eGFP на суперсвернутый GFP с циркулярной перестановкой, в результате чего была создана серия сенсоров SFiGluSnFR, которые расширяют диапазон концентраций и включают хроматические варианты. Сенсоры iGluSnFR были дополнительно усовершенствованы [названы быстрыми (iGluf) и сверхбыстрыми (iGluu)] для мониторинга волн высвобождения глутамата в синапсах со скоростью записи данных в диапазоне 10 Гц. Группа Роберта Кэмпбелла также сообщила о наборе однобелковых сенсоров глутамата, вводящих в палитру красные варианты из mApple с круговой

перестановкой (R-iGluSnFR1), но также с другой топологией, включая варианты с некруглой перестановкой [44]. Эти сенсоры использовались для мониторинга внеклеточного глутамата в клетках НЕК со сродством в микромолярном диапазоне.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы исследования

В работе использовали следующие реактивы: деионизованная вода MilliQ, этиловый спирт, NaOH (Sigma), NaCl (Helicon), HCl (Fisher Chemical), KCl (Sigma), $MnCl_2$ (Sigma), 3-морфолинопропансульфоновая кислота MOPS (Helicon), Л-Изолейцин (ХимМед), глицерин (PanReac), глюкоза (Helicon), агароза (Helicon), трисгидроксиметиламинометан (Helicon), бромистый этидий (Helicon), бакто-агар (Helicon), бакто-триптон (Amresco), дрожжевой экстракт (Helicon), Tris-HCl (Helicon), бромистый этидий (Helicon), агароза (Helicon), бакто-пептон, бакто-триптон (VWR), дрожжевой экстракт (Helicon), бакто-агар (PanReac), трис-ацетатный буфер (TAE), PEG (ThermoScientific), Ni-NTA агароза (Invitrogen), PBS (Gibco), B-PER (ThermoScientific), лизоцим (Helicon), ДНКаза I (Invitrogen), бензоназа (Millipore), термостабильная щелочная фосфатаза (SibEnzyme), имидазол (Диаэм).

В работе использовали следующие коммерческие реактивы для молекулярного клонирования: термостабильная ДНК полимераз DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) с соответствующим буфером; высокоточная ДНК полимераз IProof с соответствующим буфером; дезоксирибонуклеотиды (dNTPs) (Thermo Fisher Scientific); олигонуклеотидные праймеры для проведения ПЦР (Евроген); эндонуклеазы рестрикции BglII, EcoRI (Thermo Fisher Scientific) с соответствующими буферами (Thermo Fisher Scientific); высокоактивная ДНК-лигаза фага T4 (Thermo Fisher Scientific) с соответствующим буфером; набор для проведения случайного мутагенеза Gene Morph II Random Mutagenesis kit (Agilent Technologies); набор для очистки ДНК из реакционной смеси (после ПЦР, рестрикции или лигирования) или агарозного геля (после разделения фрагментов) Cleanup Standard (Евроген); набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid Miniprep (Евроген); маркер для электрофореза нуклеиновых кислот 1kbase DNA ladder (Thermo Fisher Scientific); набор для выделения плазмидной ДНК,

предназначенной для трансфекции клеток млекопитающих с последующей наработкой вирусных частиц, использовали наборы Plasmid Midiprep (Евроген) и Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

В работе использовали микробиологическую среду LB (0,25% триптон 0,25% пептон; 0,5% дрожжевой экстракт; 1% NaCl). Среду автоклавировали 15 мин при давлении 1 атм и 121°C, после хранили в холодильнике, при повторном использовании повторяли цикл автоклавирования 5 мин при давлении 1 атм и 121°C. Для получения среды LB с агаром в среду добавляли бакто-агар до концентрации 1,5%, затем автоклавировали и хранили при 56°C, далее разливали на одноразовые пластиковые чашки Петри. Для селекции клеток, содержащих плазмиду pBaD/HisB, в среду LB добавляли ампициллин (до 0,1%). Для экспрессии плазмид pBAD/HisB с устойчивостями к ампициллину в среду LB/0,1%Amr добавляли 20% арабинозу (до 0,01%). Для приготовления и трансформации компетентных клеток использовали питательную среду SOC (1% триптон; 1% пептон; 0,5% дрожжевой экстракт; 0,05% NaCl; 0,02% KCl; 0,01% MgCl₂; 0,4% глюкоза). Среду автоклавировали 15 мин при давлении 1 атм и 121°C и хранили при 5°C. В работе использовали штаммы *E.coli* BW25113/pWA23 и бактериальные плазмиды pBAD/HisB (Invitrogen).

В работе использовали клетки линии HeLa Kyoto. При работе с клетками млекопитающих использовали следующие реактивы и среды: трансфицирующий реагент Turbofect (Thermo Fisher Scientific), среда DMEM (Gibco), FBS (Sigma), антибиотики стрептомицин и ампициллин (Gibco), среда MEM (Gibco), DPBS (Gibco), трипсин (Gibco), буфер изолейцин (200Mm), KCl (100mM), MOPS (30mM).

2.2 Методы исследования

2.2.1 Амплификация фрагментов ДНК, рестрикция, электрофорез в агарозном геле, лигирование и очистка

Для амплификации фрагментов ДНК использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Амплификацию проводили с помощью амплификатора C-1000 Touch Thermal Cycler (BioRad). Сначала добавляем 52,32 мкл MilliQ H_2O , 8 мкл 10х буфера DreamTaq с ионами магния, 1,6 мкл 10 мкМ смеси каждого из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, 1,6 мкл 2 мМ dGTP, 0,64 мкл 100 мМ dCTP, 0,64 мкл 100 мМ dTTP, по 4 мкл 5- и 3- концевых 10 мкМ праймеров Li-EcoRI_R и BglII-Li3 соответственно и 3,2 мкл $MnCl_2$ на стенку пробирки. Далее, центрифугируем пробирку 1 с при 13200 rpm (revolutions per minute – оборотов в минуту), чтобы осадить всё на дно, перемешиваем при 3500 rpm и центрифугируем 1 с при 13200 rpm еще раз. Приготовить в двух отдельных пробирках плазмиды с концентрациями 10 нг/мкл и 50 нг/мкл. При добавлении 0,8 мкл полимеразы DreamTaq в пробирку, погружаем наконечник дозатора в раствор и, медленно опуская и поднимая поршень 5 раз, суспендируем. Перемешиваем при 3500 rpm, центрифугируем 1 с при 13200 rpm. Разделяем раствор поровну на две пробирки. Добавляем в одну из них плазмиду с концентрацией 10 нг/мкл, в другую – с концентрацией 50 нг/мкл по 1,6 мкл по стенкам сосуда. Центрифугируем 1 с при 13200 rpm, перемешиваем при 3500 rpm, центрифугируем 1 с при 13200 rpm. Разделяем ещё раз раствор из каждой пробирки поровну на две пробирки, чтобы в итоге получилось четыре по 20 мкл. Ставим их в амплификатор и подбираем необходимую программу для ПЦР.

Последовательности праймеров:

Li-EcoRI_R GCGAATTCttacttcgcatcggtcgc

BglII-Li3 CGAGATCTatggaagatattaaagtcgcg

Программа ПЦР: 1) денатурация 30 секунд при 95°C; 2) 30 секунд при

95°C; 3) отжиг праймеров 30 секунд при 55°C; 4) элонгация 3 минуты при 72°C (время элонгации устанавливали из расчета 1000 пар оснований в минуту плюс 30 сек), стадии 2-4 повторяли 36 раз. 5) 10 мин при 72°C, после окончания ПЦР 6) поддержание температуры 4°C.

Рестрикция проводится для гена, кодирующего интересующий белок, и плазмиды pBAD/HisB-mTaqBFP2 по сайтам EcoRI и BglII. В пробирку добавляем 34 мкл ДНК (33,7 мкл в случае ДНК плазмиды), затем 4 мкл 1х буфера O на стенку пробирки. Центрифугируем 1 с при 13200 rpm, перемешиваем при 3500 rpm, центрифугируем 1 с при 13200 rpm. Аналогично, как для ПЦР, добавляем по 1 мкл рестриктаз EcoRI и BglII погружая наконечник дозатора в раствор и, медленно опуская и поднимая поршень 5 раз, круговыми движениями суспендируем. Для рестрикции плазмиды добавляем дополнительно 0,3 мкл щелочной фосфатазы аналогично тому, как и рестриктазы. Перемешиваем раствор при 3500 rpm и центрифугируем 1 с при 13200 rpm. Инкубируем смеси при 37°C на 3ч – o/n (o/n – over night).

Электрофорез в агарозном геле проводится для последующей очистки фрагментов ДНК (после рестрикции). 1% агарозный гель готовили с добавлением 1 г агарозы в 100 мл трис-ацетатного буфера (TAE) и добавлением бромистого этидия. Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза SE-2 (Helicon) с источником постоянного тока на 20 минут при напряжении 50 В и 45 минут при 100 В. В каждую лунку добавляем по 20 мкл раствора ДНК. В качестве маркера наносили 1 kbase DNA ladder. Для визуализации агарозного геля использовали УФ-трансиллюминатор ETX-F26.MX (312 нм). С помощью лезвия под трансиллюминатором из геля вырезаем необходимые фрагменты ДНК.

Лигирование продуктов ПЦР и плазмиды pBAD/HisB-mTaqBFP2, прошедших рестрикцию, проводится с помощью T4 ДНК лигазы. Добавляем в пробирку 52,75 мкл ДНК продуктов ПЦР и 52,75 мкл ДНК плазмиды pBAD/HisB-mTaqBFP2. Добавляем по стенке 13,5 мкл 10х буфера T4 ДНК

лигазы и, погружая в раствор, 13,5 мкл 50% PEG4000. Перемешиваем при 3500 rpm и центрифугируем 1 с при 13200 rpm. Добавляем 2,5 мкл T4 ДНК лигазу, погружая наконечник дозатора в раствор, и, медленно опуская и поднимая поршень 5 раз, круговыми движениями суспендируем. Инкубируем при 16°C на 3ч – о/п.

Для очистки фрагментов ДНК из реакционной смеси (после ПЦР или лигирования) добавляем 5 объемов «Связывающего раствора» (Evrogen). Перемешиваем при 3500 rpm и центрифугируем 1 с при 13500 rpm. Для очистки фрагментов ДНК из агарозного геля (после электрофореза) взвешиваем фрагменты геля, и вес геля в мг численно приравниваем к его объему в мкл (100 мг геля= 100 мкл раствора). К гелю добавляем 3 объема «Связывающего раствора» (Evrogen). Если объем геля в пробирке более 350 мкл, то рекомендуется разделить образец на две пробирки. Инкубируем смесь на 10 мин при 50-55°C до полного растворения геля. Перемешиваем при 3500 rpm и центрифугируем 1 с при 6000 rpm. Добавляем 1 объем изопропанола. Перемешиваем при 3500 rpm и центрифугируем 1 с при 6000 rpm. Далее для обоих случаев проводим протокол по выделению ДНК на колонке, описанный ниже.

Помещаем спин-колонку в собирательную пробирку. Переносим пробу (не более 550 мкл) в колонку и центрифугируем 1 с 13500 rpm. Удаляем фильтрат из собирательной пробирки. Повторяем пока не закончится проба, в последний раз центрифугируем 60 с вместо 1 с. Затем добавляем 400 мкл «Промывочного раствора» (Evrogen) в колонку (перед трансформацией вместо этого нужно использовать промывочный раствор с меньшим содержанием солей), инкубируем на 5 мин, центрифугируем 1 с при 13200 rpm. Удаляем фильтрат. Повторяем всё, начиная с добавки «Промывочного раствора», однако теперь центрифугируем 60 с при 13200 rpm. Пустую колонку центрифугируем 60 с при 13200 rpm для полного удаления промывочного раствора. Помещаем колонку в новую пробирку. Наносим в центр мембраны

39 мкл (перед рестрикцией) или 55 мкл (перед лигированием или трансформацией) MilliQ H_2O и инкубируем 5 мин. Центрифугируем 60 с при 13200 rpm. Убираем колонку.

2.2.2 Сайт-специфический мутагенез с помощью ПЦР с перекрывающимися фрагментами

Первичную конструкцию индикаторов получаем с помощью полимеразной цепной реакции с перекрывающимися фрагментами. Для вставки единичных мутаций используем пару комплементарных праймеров, несущих необходимую замену или вставку. На первой стадии проводим ПЦР отдельно для трех фрагментов. Состав каждой реакционной смеси объемом 25 мкл: 15,75 мкл MilliQ H_2O , 5 мкл 5x буфера, 0,5 мкл 10 мМ смеси каждого из нуклеотидов, по 1,25 мкл 5'- и 3'- концевых 10 мкМ праймера, 1 мкл плазмиды и 0,25 мкл полимеразы iProof. Для получения двух ДНК флуоресцентных фрагментов в качестве праймеров использовали один концевой (Li-EcoRI_R или BglII-Li3) и внутренний (dBamHI-Neon), а для получения связывающего аминокислоты фрагмента два внутренних (dBamHI-Neon Li-3).

Программа ПЦР: 1) денатурация 1 мин при 98°C; 2) 10 сек при 98°C; 3) отжиг праймеров 10 сек при 45°C; 4) элонгация 20 сек при 72°, стадии 2-4 повторяли 35 раз, 5) 10 мин при 72°C, после окончания ПЦР 6) поддержание температуры при 4°C.

На второй стадии проводим ПЦР с полученными на первой стадии фрагментами с помощью концевых праймеров. Состав реакционной смеси объемом 50 мкл: по 4,75 мкл ДНК фрагментов, 10 мкл 5x буфера, 1 мкл 10 мМ смеси каждого из нуклеотидов, по 2,5 мкл 10 мкМ праймеров BglII-Aa и Aa-EcoRI-r, 19,25 мкл MilliQ H_2O , 0,5 мкл полимеразы iProof.

Программа ПЦР аналогична предыдущей.

2.2.3 Создание библиотек случайных мутантов

Случайный мутагенез проводим по всей длине гена индикатора с помощью ПЦР в присутствии 0,64 mM MnCl₂ так, чтобы получить 7-8 случайных мутаций на 1000 п.о. Индикаторы далее клонируем в плазмиду pBAD/HisB, содержащую сигнал транспорта индикатора в периплазму бактериальных клеток, по сайтам рестрикции BglII/EcoRI. Для этого ПЦР продукты очищаем в 1% агарозном геле и экстрагируем, как описано выше. После этого проводим рестрикцию, очистку в 1% агарозном геле и лигирование плазмиды и продуктов ПЦР по протоколам, указанным в главе 2.2.1.

Смеси, полученные после лигирования, очищаем и трансформируем ими электрокомпетентные клетки E.coli штамма BW25113 с помощью электропорации (рис. 7).

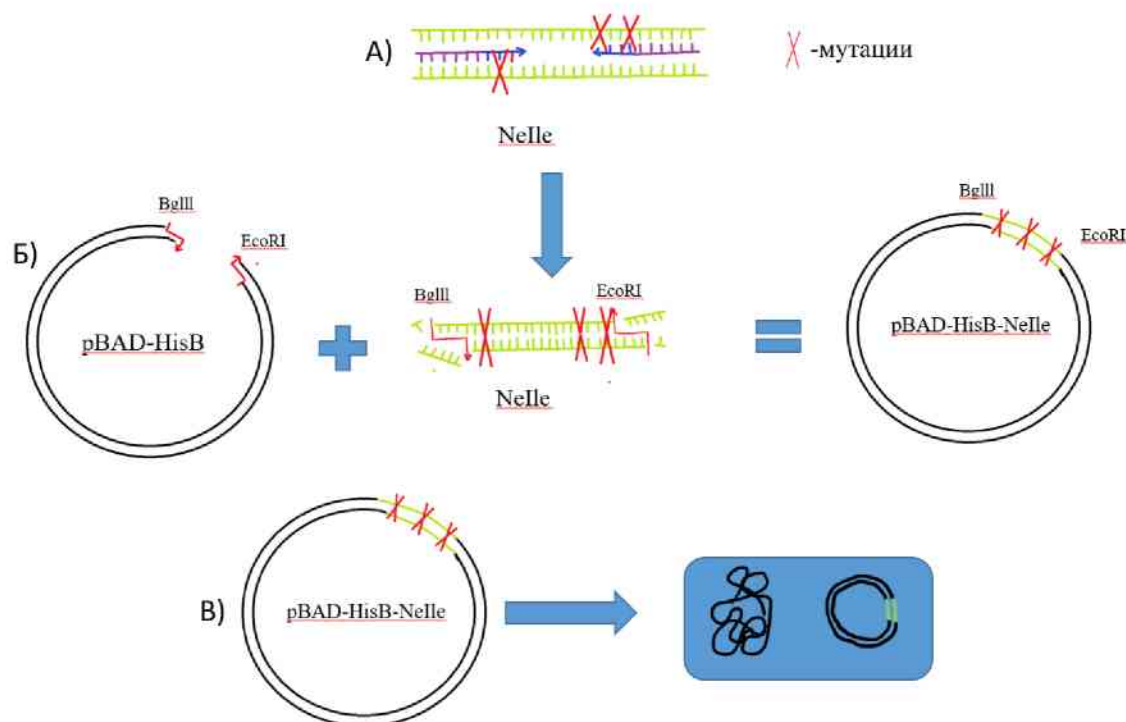


Рисунок 7. Схема проведения случайного мутагенеза. (А) Случайный мутагенез по всей длине гена с помощью ПЦР. (Б) Клонирование индикаторов в плазмиду pBAD/HisB по сайтам рестрикции BglII/EcoRI. (В) Электрическая трансформация плазмиды в электрокомпетентные клетки

2.2.4 Трансформация бактериальных клеток

Для встраивания плазмиды в бактериальные клетки использовали электрическую трансформацию. Электропорацию проводим с помощью электропоратора (Eppendorf) при 1800 В. Для электропорации использовали электрокомпетентные клетки штамма BW/pWA25.

Подготовку к трансформации проводим во льду. Необходимо заранее поставить размораживаться SOC на 37°C. Для того, чтобы очистить от солей аликвоту клеток *E.coli* штамма BW2511, в эту пробирку добавляем 1 мл MilliQ H_2O и суспендируем при помощи дозатора, плавно опуская и поднимая поршень 3 раза. Далее, центрифугируем пробирку на внутренней части ротора 40 с при 13200 rpm. Удаляем супернатант. И повторяем всё, начиная с добавления MilliQ H_2O , ещё раз. Добавляем к очищенной аликвоте клеток MilliQ H_2O так, чтобы конечный объем стал равен 45 мкл. В перчатках добавляем на один край кюветы для электропорации 23 мкл плазмиды и затем на тот же край 23 мкл клеток, перемешиваем, опуская и поднимая поршень дозатора. Постукиванием кюветы распространяем равномерно по всему дну данную смесь. Протираем безворсовой салфеткой Kim-Wipe кювету, ставим в электропоратор и запускаем. При завершении быстро добавляем в неё 1 мл нагретого SOC, тщательно перемешиваем дозатором и переносим в круглодонную стеклянную пробирку, повторяем ещё раз. Инкубируем при 220 rpm и 37°C один час. Далее, 200 мкл смеси библиотеки и SOC (1:1000) высеем на чашки Петри со средой LB и агаром с добавлением антибиотика ампициллина (100 мкг/мл), инкубируем при 37°C и на следующий день проверяем количество вставки, подсчитываем количество флуоресцентных колоний на конфокальном микроскопе считаем размер библиотеки. Исходя из этой информации, готовим смесь клеток и SOC объемом 5500 мкл, рассчитывая на то, что при размазывании 200 мкл этой смеси на одну чашку Петри там вырастет 800 колоний. Размазываем всего на 27 чашек Петри. Инкубируем их на 24 ч при 37°C и 24 ч при КТ.

2.2.5 Скрининг библиотек

Скрининг бактериальных библиотек, экспрессирующих индикаторы на изолейцин, проводили последовательно в два этапа.

Первый этап включал отбор на колониях, высеванных на чашках Петри с твердой средой, анализировали около 20,000 колоний библиотек, экспрессирующих индикаторы на изолейцин, с помощью флуоресцентного стереомикроскопа Leica M205FA (Leica) (рис. 8) Экспрессию индикаторов на чашках Петри запускали добавлением 0,02% арабинозы. Колонии растили в течение 24 ч при 37°C и затем 24 ч при комнатной температуре (КТ). Так как бактериальные клетки содержат аминокислоты, для скрининга на чашках Петри отбирали колонии с максимальной флуоресценцией в зеленом канале (возбуждение при 480/40 нм и эмиссия при 535/40 нм) Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ (рис. 9), колонии с наибольшей яркостью отбирали и переносили штрихи на чашки Петри со средой LB/0,1%Amp. Инкубировали 24 ч при 37°C.

На втором этапе скрининга анализировали 70-120 белков, для этого клоны с наилучшими характеристиками, найденные на чашках Петри, выращивали в 5 мл среды LB с добавлением 0,02% арабинозы, 100 мкг/мл ампициллина в течение 24 ч при 37°C и 220 об/мин. Ночные культуры отобранных мутантов центрифугировали при 3500 rpm в течение 12 мин. Осадки ресуспендировали в растворе B-Per, содержащем 1 мг/мл лизоцима и 1 мг/мл бензонуклеазы. Ставили в шейкер 220 rpm на 37°C на 20 минут. Далее суспензию клеток с реактивом B-Per переносили в эппендорфы на 1,5 мл. Перемешивали 10 с при 3500 rpm и центрифугировали 2 мин при 4°C и 20000g. Далее проводили скрининг отобранных мутантов в 96-луночной планшете. На каждый образец раскапывали две лунки по 200 мкл буферных растворов 50 mM Изолейцин, 100 mM KCl, 30 mM MOPS, и 100 mM KCl, 30 mM MOPS (pH = 7,2) (рис. 11). Проводили измерения флуоресценции в планшетном анализаторе Modulus II Microplate Reader (рис. 10). Измеряли фоновую

флуоресценцию F_0 . Добавляли 10 мкл каждого белка на две лунки и инкубировали 20 мин при КТ. Итого, получали два значения флуоресценции F_{min} в отсутствие и F_{max} в присутствии изолейцина. Определяли яркость $Br = F_{max} - F_0$ и контраст $\Delta F/F = (F_{max} - F_0)/(F_{min} - F_0)$ белков в программе Excel. Клоны, отличающиеся наибольшими яркостью и контрастом по сравнению с клонами из предыдущего раунда, отбирали для следующего раунда случайного мутагенеза.



Рисунок 8. Флуоресцентный стереомикроскоп Leica M205FA

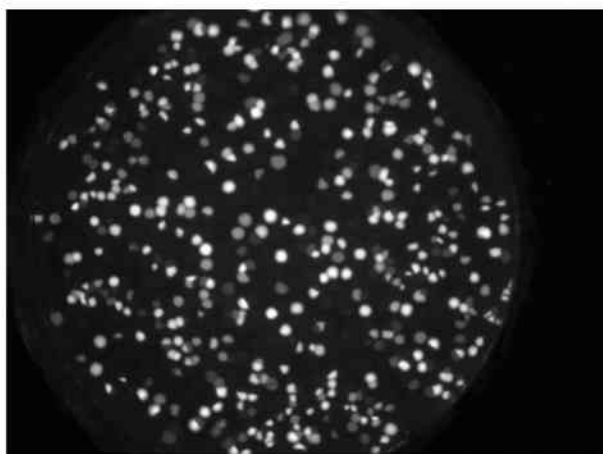


Рисунок 9. Анализ бактериальных колоний в программе ImageJ. Изображение бактериальных колоний на чашках Петри



Рисунок 10. Планшетный анализатор Modulus II Microplate Reader

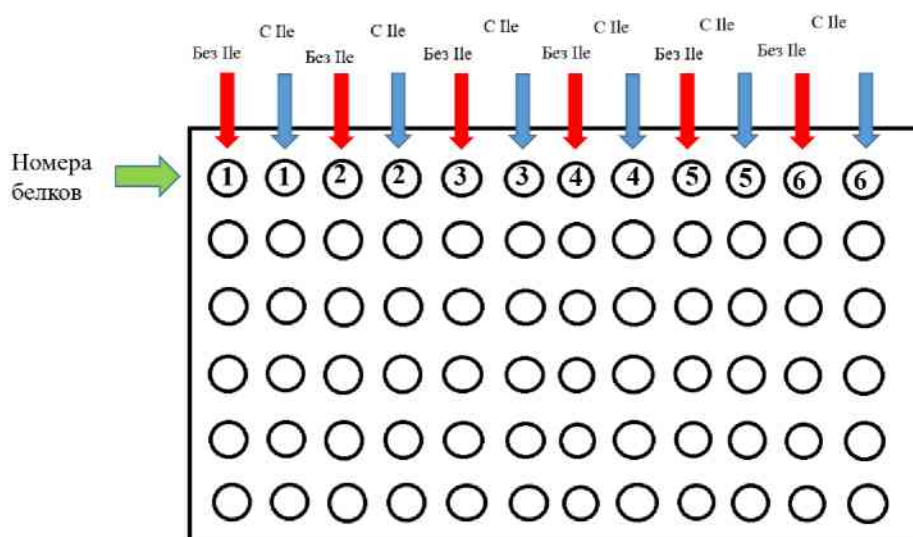


Схема 96-луночного планшета

Рисунок 11. Схема 96-луночного планшета, порядок добавления буферных растворов и бактериальных лизатов. За «Без Ile» обозначен буферный раствор 30мМ MOPS, 100 мМ KCl, (pH = 7,3), а за «C Ile» - 30мМ MOPS, 50 мМ Изолейцин, 100 мМ KCl, (pH = 7,3). На схеме цифрами обозначены номера образцов белков

2.2.6 Исследование первичной структуры белков

Гены отобранных индикаторов клонировали в вектор pBAD/HisB по сайтам рестрикции BglII/EcoRI. Для изучения первичной структуры новых

версий индикаторов проводили секвенирование плазмид – определение первичной структуры белка индикатора (нуклеотидной последовательности). Полученные в результате секвенирования хроматограммы анализировали с помощью программы SnapGeneViewer, нуклеотидные последовательности новых версий выравнивали по референсным последовательностям в программе MEGA 6. Нуклеотидные последовательности переводили в аминокислотные последовательности и определяли мутации относительно предшественника в программе GENETYX.

2.2.7 Очистка белка и характеристика его свойств *in vitro* в растворе

Чтобы охарактеризовать спектральные свойства *in vitro*, белок очищали из 250 мл среды LB с ампициллином (100 мкг/мл) и арабинозой (0,004%), и выращивали в течение ночи при 37°C, 220 об/мин. Клетки осаждали при 5000g в течение 10 мин. Затем осадок ресуспендировали в 10 мл буфера с PBS, 100 mM NaCl, 10 mM имидазолом, pH 7,40. Клетки разрушали с помощью обработки ультразвуком в течение 4 мин при мощности 20 %. Клеточный лизат отделяли центрифугированием при 18000g в течение 10 мин. Затем белок связывали с 500 мкл никель-содержащей смолы Ni-NTA (суспензия 1:1) в течение 1 ч при 4°C. После трехкратной промывки смолы 5 мл буфера с PBS, 100 mM NaCl, 10 mM имидазолом, pH 7,40, белок элюировали в 400 мкл буфера с PBS, 400 mM имидазолом, 100 mM NaCl, pH 7,40. После чего проводили диализ белков в течение 24 часов напротив 1 л буфера 30 mM MOPS, 100 mM KCl pH 7.30.

2.2.7.1 Определение коэффициента экстинкции и квантового выхода

Коэффициенты экстинкции определяли методом щелочной денатурации, полагая, что GFP-подобный хромофор в 1M NaOH имеет коэффициент экстинкции 44000 M⁻¹ см⁻¹. Спектры поглощения регистрировали с помощью NanoDrop 2000 (США).

Для определения квантового выхода (QY) считали интеграл

флуоресценции очищенного индикатора Nеlle в 30 мМ MOPS, 100 мМ KCl, pH 7.30 в отсутствие изолейцина и в присутствии 50 мМ изолейцина. Определение проводили относительно белка mEGFP в буфере PBS, который использовался в качестве эталонного стандарта с QY, равным 0.7. Готовили серию разведения белка (0,05, 0,04, 0,03, 0,02, 0,01) для получения поглощения при 470 нм и регистрировали эмиссионные спектры в диапазоне 480-700 нм. Затем рассчитывали тангенс угла наклона (tga) кривой зависимости интегральных значений флуоресценции в диапазоне 480-700 нм от поглощения при 470 нм и вычисляли квантовый выход по следующему уравнению: $QY = 0.70 * \frac{tg\alpha_{Nelle}}{tg\alpha_{mEGFP}}$. Спектры флуоресценции измеряли на спектрофлуорометре CM2203 (Solar, Беларусь).

2.2.7.1 Определение времени созревания

Для изучения созревания белка, бактерии BW25113, содержащие плазмиды pBAD/HisB-Nelle или pBAD/HisB-EGFP, выращивали в 20 мл питательной среды LB с ампициллином при 37°C в течение ночи. Для индукции экспрессии белка добавляли 0,2% арабинозы и инкубировали бактериальные культуры при 37°C в 15-мл пробирках, заполненных до самого верха и плотно закупоренных, для ограничения доступа кислорода. Спустя 3 часа культуры центрифугировали при 3500 об/мин в течение 12 мин, и осадок клеток ресуспендировали в 800 мкл буфера PBS с хлорамфениколом (mEGFP) или 30мМ MOPS, 50 мМ Изолейцин, 100 мМ KCl, (pH = 7,3) с хлорамфениколом (Nelle) . Суспензию клеток обрабатывали ультразвуком в течение 40 сек при 20% мощности и центрифугировали при 20000g в течение 2 мин. 100 мкл аликвоты белка переносили в предварительно подогретую кварцевую кювету с 2,9 мл PBS, хлорамфениколом (mEGFP) или 30мМ MOPS, 50 мМ Изолейцин, 100 мМ KCl, (pH = 7,3), хлорамфениколом (Nelle). Созревание белка регистрировали при 37°C по изменению зеленой флуоресценции с помощью спектрофлуориметра CM2203 (Solar, Беларусь).

2.2.7.2 Определение констант диссоциации

Для определения Кд (константы диссоциации) белок Nelle (конечная концентрация 50 нМ) смешивали с 200 мкл буфера 30мМ MOPS, 100 мМ KCl, дополненного 0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 5, 10, 50 и 100 (валин, лейцин), 150 (лейцин), 208 (изолейцин), 300 (валин) мМ изолейцина, валина и лейцина. После инкубации при комнатной температуре в течение 20 мин зеленую флуоресценцию регистрировали с помощью Modulus™ II Microplate Reader (TurnerBiosystems, США). Значения Кд и коэффициенты Хилла для связывания аминокислот сенсором Nelle рассчитывали путем нелинейной регрессии экспериментальных точек по уравнению Хилла: $I = I_{max} \frac{[A]^n}{K_d^n + [A]^n}$, где I - интенсивность флуоресценции при определенной концентрации аминокислоты, а I_{max} - интенсивность флуоресценции при насыщающей концентрации аминокислоты.

2.2.7.3 Определение времени фотовыгорания

Эксперименты по установлению времени фотовыгорания индикаторов проводили на смеси растворов чистых белков и минерального масла, как было описано в статье [20]. Кинетику измеряли с помощью микроскопа Zeiss Axio Imager Z2 (Zeiss), оснащенного ртутной лампой мощностью 120 Вт (LEJ), масляным иммерсионным объективом с увеличением 63× и апертурой 1,4 (PlanApo, Zeiss), фильтрами возбуждения 355/25BP и 470/40BP, отсекающим фильтром 495 нм и фильтром эмиссии 525/50BP. Плотность мощности света (64 мВт/см²) измеряли на задней фокальной плоскости объектива с помощью измерителя мощности PM100D (ThorLabs, Германия), оснащенного датчиком S120VS (ThorLabs, Германия). 1,5 мкл белка в буфере тщательно перемешивали с 10 мкл минеральным маслом и размещали между стеклянной пластинкой и покровным стеклышком. Кинетику фотовыгорания для Nelle (50 мкМ) снимали в смеси буфера PBS и буфера 30мМ MOPS, 50 мМ Изолейцин, 100 мМ KCl, (pH = 7,3) в соотношении 5,4:4,6, для mEGFP (50 мкМ) в буфере PBS.

2.2.8 Создание конструкций для временной трансфекции культур клеток млекопитающих

Для конструирования плазмиды pAAV-CAG-NES-Nelle ген Nelle был амплифицирован с помощью ПЦР, как фрагмент BglIII-EcoRI и заменен геном mCherry в векторе pAAV-CAG-NES-mCherry.

Для конструирования плазмид pAAV-CAG-dMito-Nelle и pAAV-CAG-H2B-Nelle ген Nelle был амплифицирован с помощью ПЦР, как фрагмент BglIII-HindIII и заменен генами mCherry и B-GECO1 в векторах pAAV-CAG-dMito-mCherry и pAAV-CAG-H2B-B-GECO1, соответственно.

Для конструирования плазмиды pAAV-CAG-Igk-Nelle-TM ген Nelle был амплифицирован с помощью ПЦР, как фрагмент BglIII-SpeI и заменен геном iGluSnFR в векторе pAAV-CAG-Igk-iGluSnFR-TM.

Для конструирования плазмиды pBAD/Мyc-HisB-Nelle-L3-mCherry ген Nelle был амплифицирован с помощью ПЦР, как фрагмент BglIII-EcoRI и заменен геном mTagBFP в векторе pBAD/Мyc-HisB-mTagBFP-L3-mCherry.

Для конструирования плазмид pAAV-CAG-NES-Nelle-L3-mCherry, pAAV-CAG-dMito-Nelle-L3-mCherry и pAAV-CAG-H2B-Nelle-L3-mCherry ген Nelle был амплифицирован с помощью ПЦР, как фрагмент BglIII-SpeI и заменен Nelle gene в векторах pAAV-CAG-NES-Nelle, pAAV-CAG-dMito-Nelle, pAAV-CAG-H2B-Nelle, соответственно.

2.2.9 Культивирование и трансфекция культур клеток

Клетки линий HeLa Kyoto выращивали в среде DMEM (Gibco) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Sigma), 2 mM GlutaMax-I (Gibco), 50 ед/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Gibco). Культуры растили в CO₂ икубаторе (New Brunswick) с 5% содержанием CO₂ и 37°C и пересевали каждые 2- 3 дня.

Плазмиды для трансфекции выделяли с помощью набора Plasmid Miniprep (Евроген) согласно прилагаемой инструкции. Трансфекцию проводили с помощью реагента TurboFectTM (Thermo Fisher Scientific) по

протоколу производителя. Перед трансфекцией клетки пересевали на 35 мм чашки Петри со стеклянным дном (MatTek) и культивировали до достижения плотности 70-80%. Анализ клеток проводили через 24-48 ч после трансфекции.

2.2.10 Флуоресцентная микроскопия

Для проведения микроскопии культуры клеток HeLa Kyoto и записи флуоресценции использовали многоточечную систему конфокальной микроскопии Andor, оснащенную инвертированным микроскопом Nikon Eclipse Ti, ртутной лампой мощностью 75 Вт (Hamamatsu, Япония), масляным иммерсионным объективом 60x (Nikon, Япония), 16-разрядной камерой QuantEM 512SC с умножением электронов (Photometrics, США) и инкубатором клеток (Okolab, Италия). Перед съемкой культуральную среду меняли на DPBS с 20 mM HEPES, pH 7,4. Съёмка клеток проводилась через 24 ч после трансфекции. Для экспериментов по временной съемке клетки визуализировались после инкубации в буфере DPBS при 37 °C, 5% CO₂ в течение 1-4 часов. 20 mM изолейцина добавляли через 2 минуты после начала съемки при комнатной температуре. Через 0,5-1,5 часа после добавления 20 mM изолейцина его удаляли путем промывки буфером DPBS, и клетки изображались в течение 1-2 часов при комнатной температуре.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разработка генетически кодируемого индикатора на изолейцин на основе флуоресцентного белка mNeonGreen и лейцин-изолейцин-валин связывающего белка LIV BP

До сих пор были получены ГКАИ на основе FRET (Фёрстеровского резонансного переноса энергии). Эти индикаторы имеют ограниченный флуоресцентный ответ на добавление аминокислот (меньше 100%) и требуют дорогостоящего оборудования, осложняя детекцию сигнала *in vivo*. Они содержат в своем составе два флуоресцентных белка, что существенно увеличивает их размер и ограничивает спектральный диапазон [47, 27, 1].

Система, названная OLIVe (оптический биосенсор лейцина, изолейцина и валина), использует технологию YFP/CFP FRET для обнаружения аминокислот с разветвленной цепью. Этот метод эффективен для аминокислот с разветвленной цепью, но не обнаруживает аминокислот в отдельных органеллах из-за низкой активности флуоресценции [25]. Многие исследования были сосредоточены на сенсорах глутамата для изучения синаптической передачи в нейронах, но им также не хватает разрешения для определения локализации органелл [45]. Эти методы ограничены локализацией сверхэкспрессируемого сенсорного домена и низким относительным сигналом включения из-за ратиометрического анализа.

За прошедшие годы был разработан ряд низкомолекулярных флуоресцентных сенсоров аминокислот, однако лишь немногие из них хорошо функционируют в физиологических условиях.

Для обхода этих ограничений был разработан сенсор на изолейцин с оптимальным дизайном на основе яркого мономерного циркулярно-пермугированного белка mNeonGreen в качестве флуоресцентной части и изолейцин-валин-лейцин-связывающего белка LIVBP.

Индикатор был разработан путем объединения через аминокислотные линкеры гена белка, связывающего лейцин/изолейцин/валин (LIVBP) и

мономерного циркулярно-пермугированного белка mNeonGreen. В индикаторе Nello ген *LivJ*, кодирующий изолейцин-валин-лейцин-связывающий белок LIVBP, был найден в бактериях из коллекции ВКПМ В-13692.

LIV BP принадлежит к суперсемейству бактериальных периплазматических связывающих белков (PBP). На данный момент были идентифицированы белки, связывающие субстрат, для широкого спектра лигандов, включая различные ионы, углеводы и аминокислоты. Разнообразие последовательностей внутри суперсемейства велико, но общая структурная складка сохраняется (рис.6). PBP состоят из двух доменов, соединенных шарнирной областью, с сайтом связывания лиганда, расположенным на границе раздела между двумя доменами, который может принимать две разные конформации: открытую форму без лиганда и закрытую форму со связанным лигандом, которые взаимно преобразуются посредством относительно большого изгибающего движения вокруг шарнира [29].

Обычно эти белки имеют сайт связывания лиганда на границе двух доменов и претерпевают большие конформационные изменения при связывании лиганда. Эти особенности делают периплазматические связывающие белки привлекательными материалами для биосенсоров [22,31]. Фроммеру и его коллегам удалось разработать серию генетически закодированных флуоресцентных биосенсоров для метаболитов, включая глюкозу, мальтозу и глутамин, путем слияния флуоресцентных белков с периплазматическими связывающими белками [19-20,33].

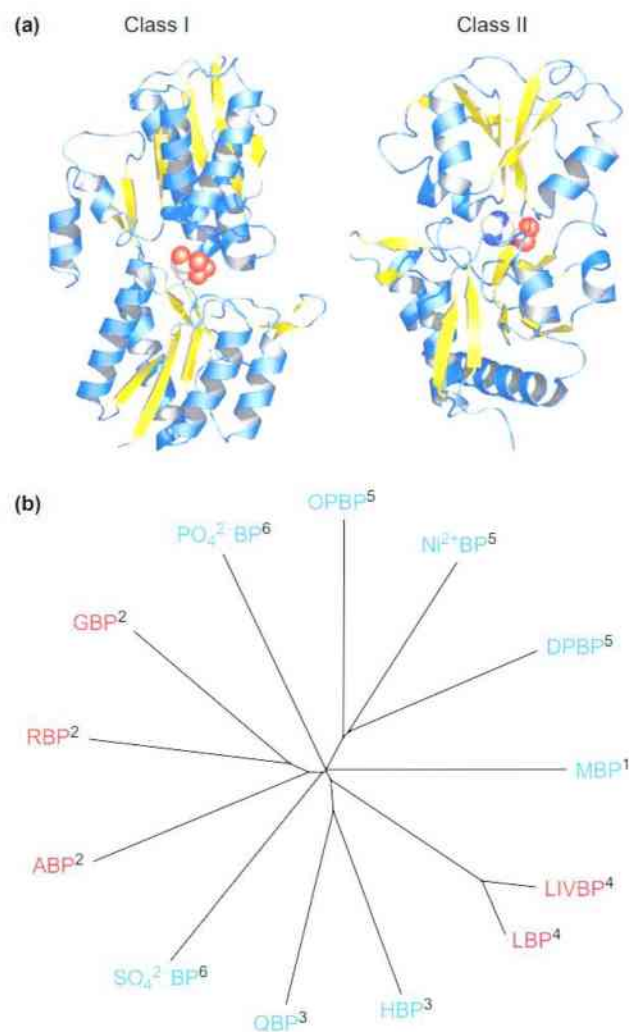


Рисунок 12. Суперсемейство PBP. (a) Структуры, представляющие два структурных класса суперсемейства PBP. Класс I представлен ABP, класс II - HBP. Эти два класса различаются количеством и порядком β -нитей в каждом домене [10] : класс I - шесть β -нитей (порядок 213456); класс II - пять β -нитей (порядок 21354). (b) Разнообразие последовательностей среди выбранного набора бактериальных PBPs [9,41]. Цвет указывает на структурный класс: красный - класс I; синий - класс II. Надстрочные знаки указывают на классификацию кластеров, основанную на сходстве последовательностей и классе когнатных лигандов. DPBP - дипептид-связывающий белок; LBP - лейцин-связывающий белок; LIVBP - лейцин-, изолейцин-, валин-связывающий белок; OPBP - олигопептид-связывающий белок

mNeonGreen представляет собой зеленый флуоресцентный белок, полученный из тетрамерного флуоресцентного белка головохордового *Branchiostoma lanceolatum* (рис.13).

mNeonGreen (pH 8.0)

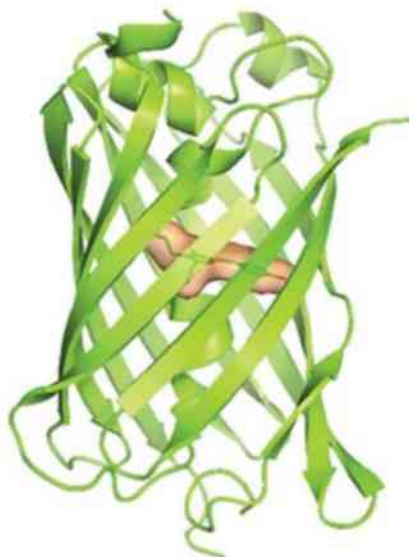


Рисунок 13. Мономер mNeonGreen в кристаллах пространственной группы P6522, полученных при pH 8,0 [15]

На основании сравнения кристаллических структур белка LIV BP в лиганд-связанном и лиганд-несвязанном состояниях [42], был создан индикатор путем вставки cpmNeonGreen в LIV BP после позиции 12 (рис.14). Линкеры длиной 2 и 3 аминокислотных остатка между cpmNeonGreen и LIV BP были рандомизированы.

NELIV12 -> LivJ₁₋₁₂-NNT2-cpmNeonGreen-NNT3-LivJ₁₃₋₃₆₇

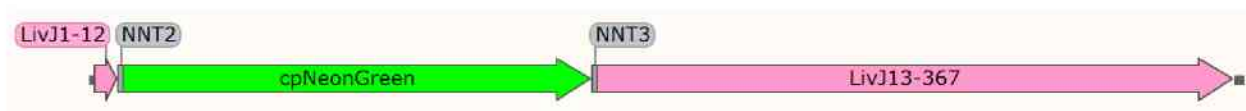


Рисунок 14. Дизайн генетически кодируемого сенсора на изолейцин, валин и лейцин на основе изолейцин-валин-лейцин-связывающего белка LIVBP и зеленого флуоресцентного белка mNeonGreen. cpmNeonGreen– циркулярно-пермутированный mNeonGreen. NNT – рандомизированные линкеры длиной 2 и 3 аминокислоты

В результате проведения 8-ми раундов случайного мутагенеза и последующего скрининга на яркость и контраст был найден вариант сенсора с наилучшими яркостью и контрастом на изолейцин. После дополнительных 5 раундов случайного мутагенеза и скрининга на яркость, контраст и специфичность был получен окончательный вариант сенсора на изолейцин – Nelle. Преимуществом этой конструкции является то, что сенсор генетически закодирован и поэтому может быть использован для *in vivo* для мониторинга клеточного метаболизма с помощью флуоресцентной микроскопии, позволяя получать пространственно-временные изображения метаболических потоков [7,8, 14].

NeIle-0	1:MEDIKVAVVGAMSXXADWRIKKACPNKGTIISTIKWSYTTGNGKRYRSTARTTTFAKP	60
Nelle	1:MEDIKVAVVGAMSAGADWRIKKACPNKGTIISTIKWSYTTGNGKRYRSTARTTTFAKP	60
NeIle-0	61:MAANYLKNQPMYIFRKTEKKHSKTEMDKEWOKAFTDVMGMDELYKVDGGSGGTGMVSEG	120
Nelle	61:MAANYLKNQPMYIFRKTEKKHSKTEMDKEWOKAFTDVYGMDELYKVDGGSGGTGMVSEG	120
NeIle-0	121:EGDNMASLPATHEHIFGSSNGVDEDMVGGSSNPNVGYEELNLRSTKGLQFSPWILVP	180
Nelle	121:EVNMAASLPATHEHIFGSSNGVDEDMVGGSSNPNVGYEELNLRSTKGLQFSPWILVP	180
NeIle-0	181:HIGYGFHQYLPVPDGMSPFOAAMVDGSGYQVHRTVQFEDGASLTNNRRTVEGSHIKGEA	240
Nelle	181:HIGYGFHQYLPVPDGMSPFOAAMVDGSGYQVHRTVQFEDGASLTNNRRTVEGSHIKGEA	240
NeIle-0	241:QVKGTGFADGPPVMTNSLTAXXXGFPVAQYGDQEF TGAEQAVADINAKGGIKGNKLQIVKY	300
Nelle	241:QVKGTGFADGPPVMTNSTAFHIGPVYQYGDQEF TGAEQAVADINAKGGIKGNKLQIVKY	300
NeIle-0	301:DDACDPKQAVAVANKVVNDGIKYVIGHLCSSSTQFASDIYEDEGILMITPAATAPELTAR	360
Nelle	301:DDACDPKQAVAVANKVVNDGIKYVIGHLCSSSTQFASDIYEAGILMITPAATAPELTAR	360
NeIle-0	361:SYQLILRTTGLDSDQGPTAAKYILEKVKPQRIAIVHDKQQYGEGLARAVQDGLKKNANV	420
Nelle	361:SYQLILRTTGLDSDQGTAAKYILEKVKPQRIAIVHDKQQYGEGLARAVQDGLKKNANV	420
NeIle-0	421:VFFDGITAGEKDFSTLVARLKKENIDFVYYGGYHPFMGQILRQARAAGLKTQFMGPEGVA	480
Nelle	421:VFFDGITAGEKDFSTLVARLKKENIDFVYYGGYHPFMGQILRQARAAGLKTQFMGPEGVA	480
NeIle-0	481:NVSLSNIAGESAEGLLVTKPKNYDQVPANKPIVDAIKAKKQDPGSAFVWTTTYAALQSLOA	540
Nelle	481:NVSLSNIAGESAEGLLVTKPKNYDQVPANKPIVDAIKAKKQDPGSAFVWTTTYAALQSLOA	540
NeIle-0	541:GLNQSDDPAEIAKYLKANSVDVTVMGPLTWDEKGLKGFEGVFDWHANGTATDAK	595
Nelle	541:GLNQSDDPAEIAKYLKANSVDVTVMGPLTWDEKGLKGFEGVFDWHANGTATDAK	595

Рисунок 15. Выравнивание аминокислотных последовательностей для исходной версии NeIle-0 и изолейцинового индикатора Nelle после тринадцати раундов случайного мутагенеза. Аминокислотные остатки, находящиеся внутри β -бочонка, выделены зелёным цветом. Мутации и линкеры выделены розовым и циановыми цветами, соответственно.

Хромофор выделен жирным подчеркнутым шрифтом

Была проанализирована аминокислотная последовательность полученного индикатора Nelle (рис. 15). Nelle содержит 9 мутаций во флуоресцентной части, из них три K23E, Y55F и D170E являются внутренними по отношению к β -бочонку и могут влиять на яркость и динамический диапазон индикатора. В изолейцин-связывающей части содержится 10 мутаций, которые могут влиять на сродство и специфичность Nelle к аминокислотам.

3.2 Характеризация индикатора на изолейцин Nelle на очищенном белке *in vitro*

Свойства индикатора Nelle были охарактеризованы в растворе *in vitro*, на очищенном белке, который выделяли согласно протоколу описанному в главе материалы и методы.

Спектральные свойства и молекулярную яркость разработанного индикатора Nelle при нейтральном pH 7.4 (рис. 16 и таблица 1). Nelle в присутствии изолейцина имел пики поглощения/возбуждения/испускания при 497/502/514 нм, соответственно (рис. 16 a-b и таблица 1). Также в спектре поглощения присутствуют небольшие пики с максимумами поглощения при 353 и 390 нм. В отсутствие изолейцина спектр поглощения содержит два пика при 392 и 493 нм в соотношении 1.15:1, соответствующие протонированной и анионной формам зелёного хромофора.

Квантовый выход анионной формы в отсутствие изолейцина уменьшается в 12 раз. Протонированная форма как в отсутствие, так и в присутствии изолейцина практически не флуоресцирует (квантовый выход 0.02). Молекулярная яркость, рассчитываемая как произведение коэффициента экстинкции и квантового выхода, для индикатора Nelle в присутствии изолейцина была в 1,8 раз ниже, чем для mEGFP (таблица 1). Таким образом, увеличение зелёной флуоресценции в присутствии изолейцина происходит за счёт большего квантового выхода и

большого количества анионной формы хромофора.

Таблица 1 — Свойства индикатора *Nelle in vitro*

Свойства		Nelle		mEGFP
		+ Ile	- Ile	
Максимум поглощения (нм)		497	392, 493	488
Максимум возбуждения (нм)		502	501	
Максимум эмиссии (нм)		514	515	507
Квантовый выход ^a	Анионная форма	0.47 ± 0.02	0.040 ± 0.004	0.70
	Протонированная форма	0.020 ± 0.002	0.020 ± 0.004	-
ϵ (М ⁻¹ см ⁻¹) ^b		44000 ± 1	-	53300
Яркость отн. mEGFP (%) ^c		55	-	100
dF/F (в присутствии 50 мМ аминокислоты)		Val 10.5 ± 1.4 Leu 19 ± 1 Ile 27 ± 1	-	-
K _d		Val ≥ 128.1 ± 5.4 Leu 2.9 ± 0.2 Ile 5.0 ± 0.2	-	-
pK _a		6.68 ± 0.02	8.29 ± 0.02	5.83 ± 0.04
Полувремя созревания (мин)		5.2	-	14
Полувремя фотовыжигания (с)		153 ± 3	-	530

^a - Квантовые выходы (QY) для анионной и протонированной зелёной форм были определены относительно mEGFP (QY 0,7) и mTagBFP2 (QY 0,64)[8], соответственно. ^b - Коэффициент экстинкции для анионной зелёной формы *Nelle* определялся методом щелочной денатурации. ^c - Яркость рассчитывалась как произведение квантового выхода и коэффициента экстинкции относительно яркости белка mEGFP (QY 0,7 и коэффициент экстинкции 53300 М⁻¹ см⁻¹).

Поскольку pH варьируется в клеточных органеллах внутри клеток от 4,5 в лизосомах до 8,0 в митохондриях [27], pH-стабильность индикатора является важным свойством для визуализации живых клеток. Была оценена

зависимость флуоресценции индикатора Nette от pH (рис. 16 с и таблица 1) . Nette в изолейцин-связанном состоянии имел pKa 6.68. В отсутствие изолейцина pKa увеличилось до 8.29. Подобная разница в pKa наблюдалась для двух состояний многих генетически кодируемых флуоресцентных кальциевых индикаторов, например, в случае зеленого кальциевого индикатора GCaMP6s связывание ионов кальция приводило к уменьшению pKa от 9.6 до 6.2 [4], а в случае красных кальциевых индикаторов FRCaMP и R-GECO1 – от 8.9 до 6.6 [39].

Затем было проанализировано сродство индикатора Nette к трём аминокислотам: валину, лейцину и изолейцину. Самое высокое сродство Nette наблюдалось для лейцина. Замена лейцина на изолейцин приводила к небольшому 1.7-кратному ухудшению сродства, в то время как валин связывался с Nette в 44 раза хуже лейцина. При этом, флуоресцентный ответ был наибольшим для изолейцина. Учитывая кривые связывания аминокислот и флуоресцентный ответ, при низких концентрациях аминокислот до 1 мМ изолейцин имел примерно одинаковую флуоресценцию с лейцином, но превосходил валин, а при более высоких концентрациях флуоресценция изолейцина превосходила флуоресценцию обеих аминокислот (рис. 16 d). Таким образом, Nette лучше детектирует изменения концентрации изолейцина, чем лейцина и валина.

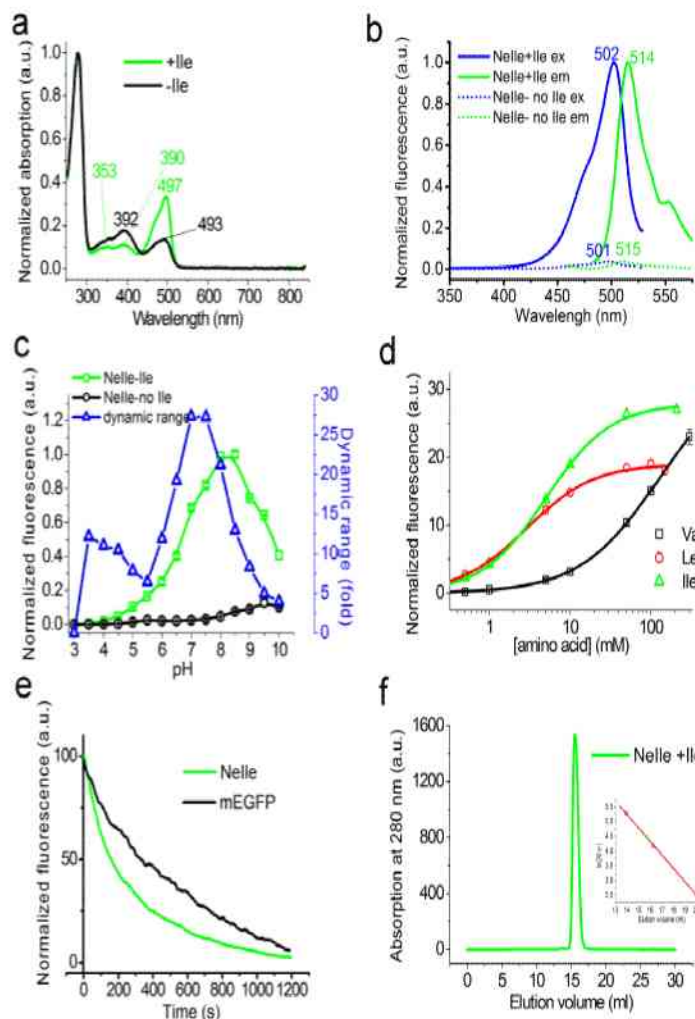


Рисунок 16. Свойства индикатора NELLE на очищенном белке *in vitro*. (a) Спектры поглощения для форм белка NELLE в отсутствие (черная кривая) или в присутствии (зелёная кривая) изолейцина в буфере PBS при pH 7,40. (b) Спектры возбуждения и испускания для форм белка NELLE в отсутствие (пунктирные линии) или в присутствии (сплошные линии) изолейцина в буфере PBS при pH 7,40. (c) Интенсивность флуоресценции для форм белка NELLE в отсутствие (черная кривая) или в присутствии (зелёная кривая) изолейцина в зависимости от pH. Для анализа усреднялись данные по трем повторам. Планки ошибок представляют стандартное отклонение. (d) Зависимости флуоресценции NELLE от концентрации изолейцина (зелёная кривая), лейцина (красная кривая) или валина (чёрная кривая). Созревание синей и красной форм TagFT в буфере PBS при pH 7,40, 37 °C. Отношение красного к синему рассчитывали по временным зависимостям красной и синей флуоресценции, нормированным на 100. (e) Фотостабильность NELLE в присутствии изолейцина при непрерывной широкополной визуализации с использованием ртутной лампы (мощность света 9 мВт/см² 470/40BP перед объективом). (f) Быстрая жидкостная хроматография белка NELLE в присутствии изолейцина. NELLE элюировался в 20 mM Трис-HCl (pH 7,80) и 200 mM NaCl буфере. Молекулярный вес NELLE рассчитывали по линейной регрессии зависимости логарифма контрольных молекулярных весов от объема элюирования

Далее была оценена скорость созревания Nello при 37°C с использованием белка, выделенного из бактериальных клеток (таблица 1). Период полусозревания для Nello был в 2.7 раз меньше, чем для mEGFP.

Затем сравнивали фотостабильность очищенного белка Nello с фотостабильностью mEGFP. В однофотонном режиме с использованием суспензии микрокапель в масле при непрерывном облучении металлогалогенной лампой с использованием света 470/40 нм и масляного объектива с увеличением 63x фотостабильность mEGFP была в 3.5 раза выше, чем у Nello (рис. 16 e)

Поскольку мономерное состояние индикатора обеспечивает его низкую цитотоксичность и возможность мечения белков в клетках млекопитающих, также было охарактеризовано олигомерное состояние разработанного индикатора Nello с использованием быстрой белковой жидкостной хроматографии (FPLC) (рис. 16 g). Nello элюируется в виде мономера на FPLC. Следовательно, индикатор Nello является мономером и может быть использован для мечения белков в органеллах животных клеток. Таким образом, индикатор Nello является первым мономерным генетически кодируемым зелёным флуоресцентным индикатором на изолейцин (и на лейцин и валин в меньшей степени). Его яркость составляет 55 % от яркости mEGFP, флуоресцентный ответ на добавление изолейцина 27, а константа диссоциации 5 мМ. Nello более pH-чувствителен, чем mEGFP, при этом его pKa зависит от присутствия изолейцина. Он очень быстро созревает (в 2.7 раз быстрее mEGFP), но в 3.5 раза менее фотостабилен, чем mEGFP.

3.3 Визуализация индикатора на изолейцин Nello в различных органеллах клеток млекопитающих

Для того чтобы проверить, как индикатор Nello локализуется в различных частях клеток млекопитающих HeLa Kyoto Nello экспрессировали в цитозоле,

митохондриях, ядре и на плазматической мембране (рис. 17). Как видно, индикатор на изолейцин правильно локализуется во всех частях клеток млекопитающих и не препятствует функционированию клеток, что видно по присутствию различных фаз деления клеток, экспрессирующих белки слияния Nelle с ядерным белком H2B (рис 17 d). Это подтверждает данные FPLC о мономерном состоянии Nelle.

Так же была проанализирована относительная концентрация изолейцина (а также лейцина и валина) в различных компартментах клеток млекопитающих. Для этого использовали белок слияния Nelle с красным флуоресцентным белком mCherry и направили его в цитозоль, митохондрии, ядро и на плазматическую мембрану (рис. 17). Затем посчитали отношение зелёной флуоресценции Nelle к красной флуоресценции mCherry Fg/Fr (рис. 18). Видно, что это отношение примерно одинаково в цитозоле и в ядре. В митохондриях и на мембране оно в 1.6 раз выше и в 3.8 раз ниже, чем в цитозоле, соответственно. Так как индикатор Nelle, связанный с изолейцином, ярче, чем без изолейцина, при большей концентрации изолейцина в органелле отношение зелёной флуоресценции к красной Fg/Fr должно быть выше. Однако, следует ещё учитывать различия в pH в разных органеллах клеток и чувствительность к pH индикатора Nelle. Следовательно, полученные данные могут свидетельствовать о большем количестве изолейцина в митохондриях и меньшем во внеклеточном пространстве по сравнению с цитозолем и ядрами/или о различиях pH в разных частях клетки.

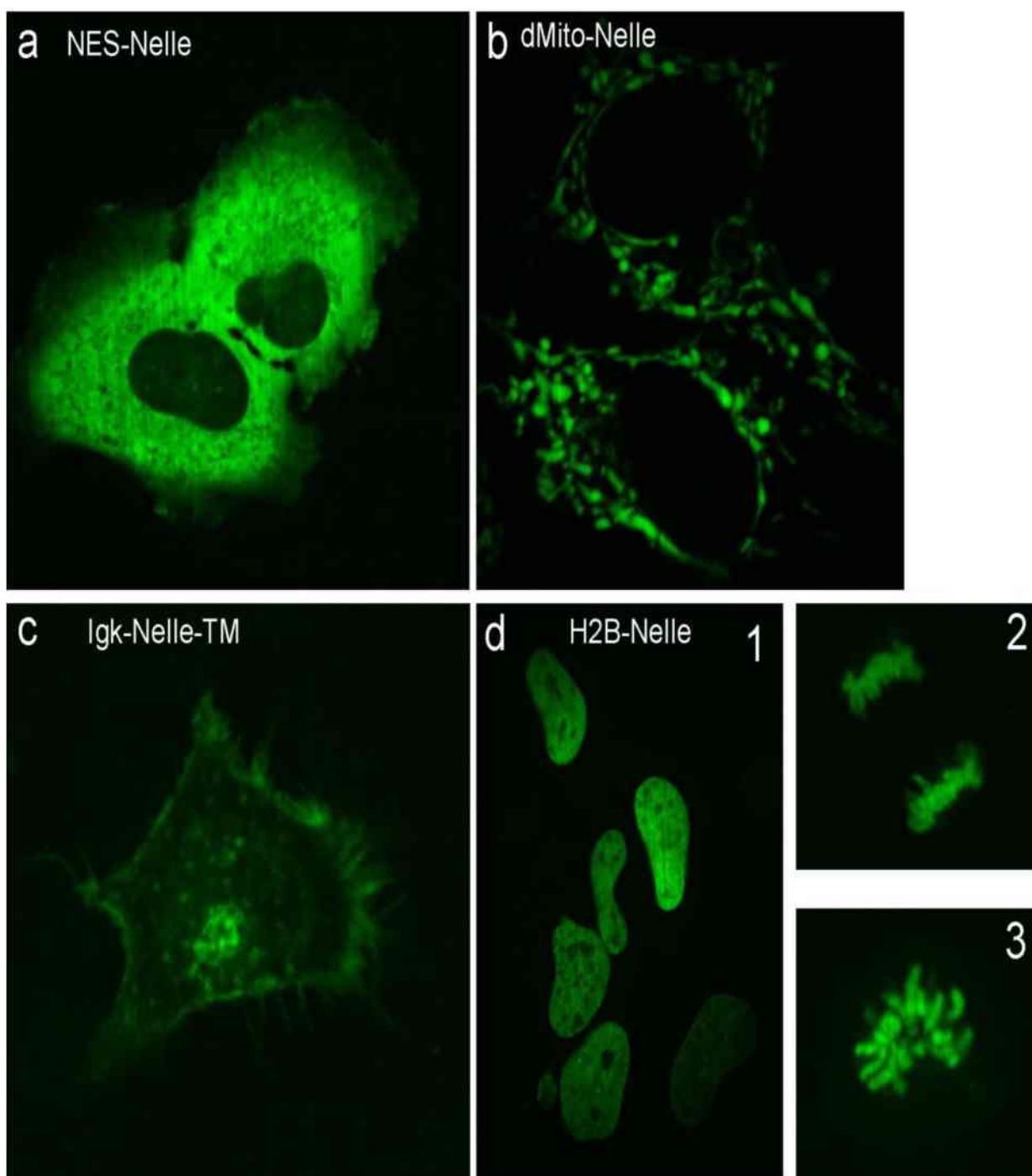


Рисунок 17. Визуализация клеток *HeLa*. (a) экспрессирующих NES-Nelle в цитозоле, (b) dMito-Nelle в митохондриях, (c) IgK-Nelle-TM на плазматической мембране и (d) H2B-Nelle в ядре в различных фазах клеточного деления. Изображения были получены с помощью конфокального спиннинг-диск-микроскопа Andor, оснащённого лазером 488 нм

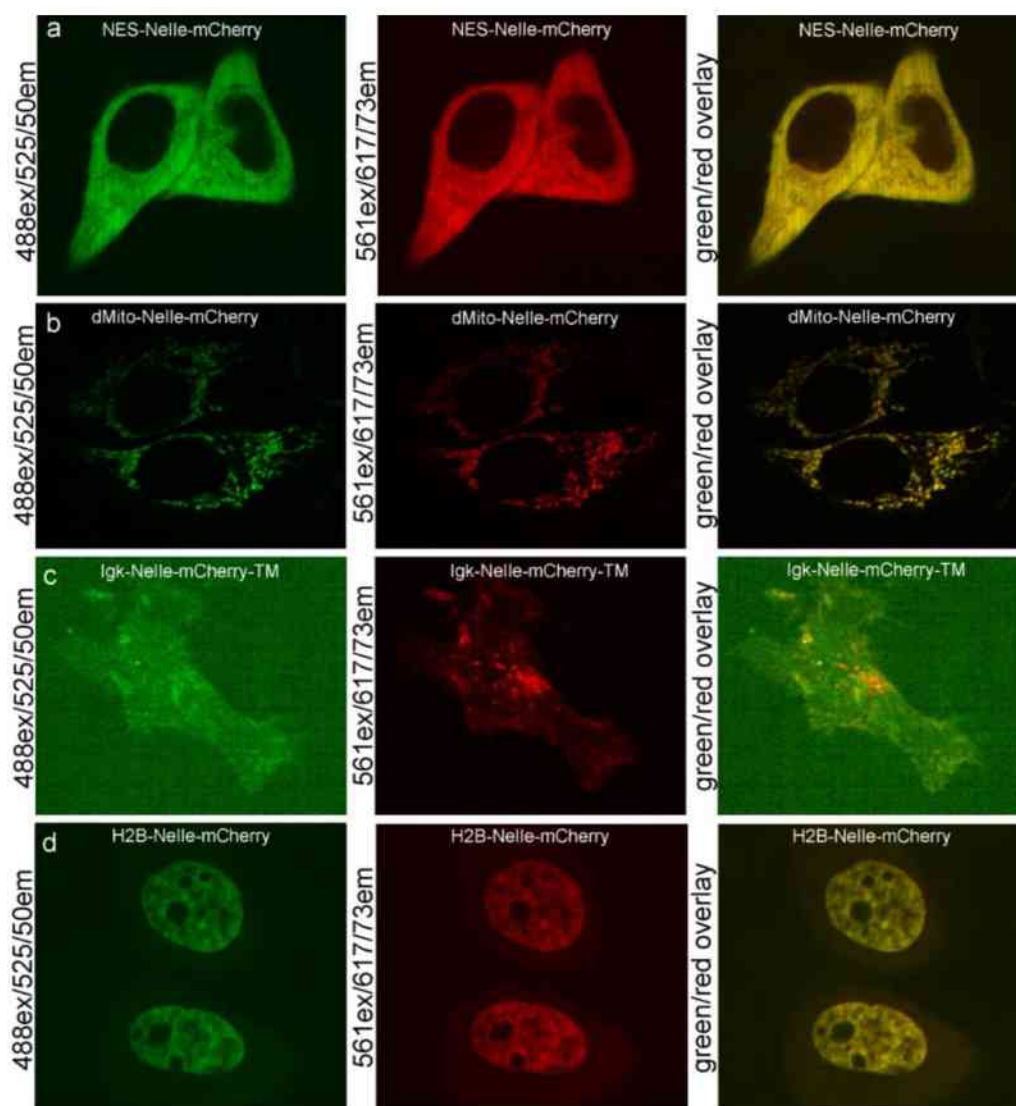


Рисунок 18. Визуализация клеток HeLa. а) экспрессирующих NES-Nelle в цитозоле, (b) dMito-Nelle в митохондриях, (c) Igk-Nelle-TM на плазматической мембране и (d) H2B-Nelle в ядре в различных фазах клеточного деления. Изображения были получены с помощью конфокального спиннинг-диск-микроскопа Andor, оснащённого лазерами 488 и 561 нм. Показаны изображения в зелёном, красном каналах и их наложение

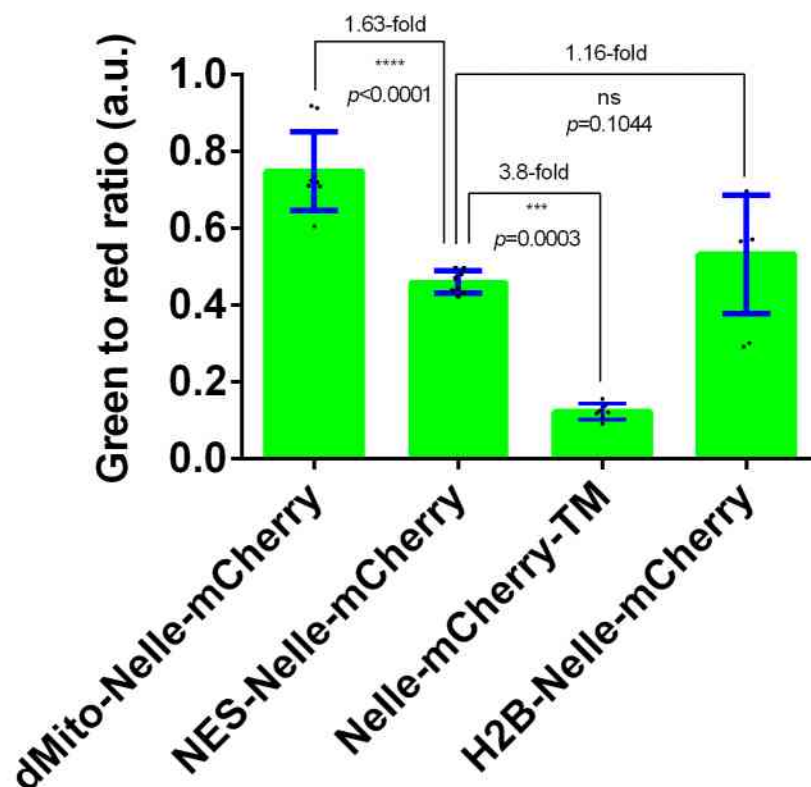


Рисунок 19. Отношение зелёной флуоресценции к красной при локализации фьюжн-белка *Nelle-mCherry* в различных частях клеток *HeLa*: в цитозоле, митохондриях, на плазматической мембране и в ядре

Таким образом, разработанный сенсор на изолейцин *Nelle* позволяет детектировать изменение концентраций изолейцина и, с меньшей чувствительностью, лейцина и валина *in vitro* и подходит для экспрессии в различных органеллах животных клеток.

3.4 Кристаллическая структура индикатора *Nelle* в связанном с изолейцином состоянии

Затем была получена и проанализирована кристаллическая структура индикатора *Nelle* в связанном с изолейцином состоянии, чтобы понять молекулярную основу механизма флуоресцентного ответа на изолейцин и специфичность к изолейцину.

Согласно анализу общей структуры, *Nelle* состоит из двух доменов: флуоресцентного домена с типичной β -бочковой складкой и домена,

связывающего изолейцин (рис. 20 а). Хромофор GFP и изолейцин и их молекулярное окружение представлены на (рис.20 b, c). Домен связывания изолейцина имел схожую структуру с белком LIVBP в связанном с изолейцином состоянии, расположение остатка изолейцина было аналогично литературным данным (рис. 20 d). Флуоресцентный домен индикатора Nelle имел структуру, схожую со структурой mNeonGreen (рис. 20 e).

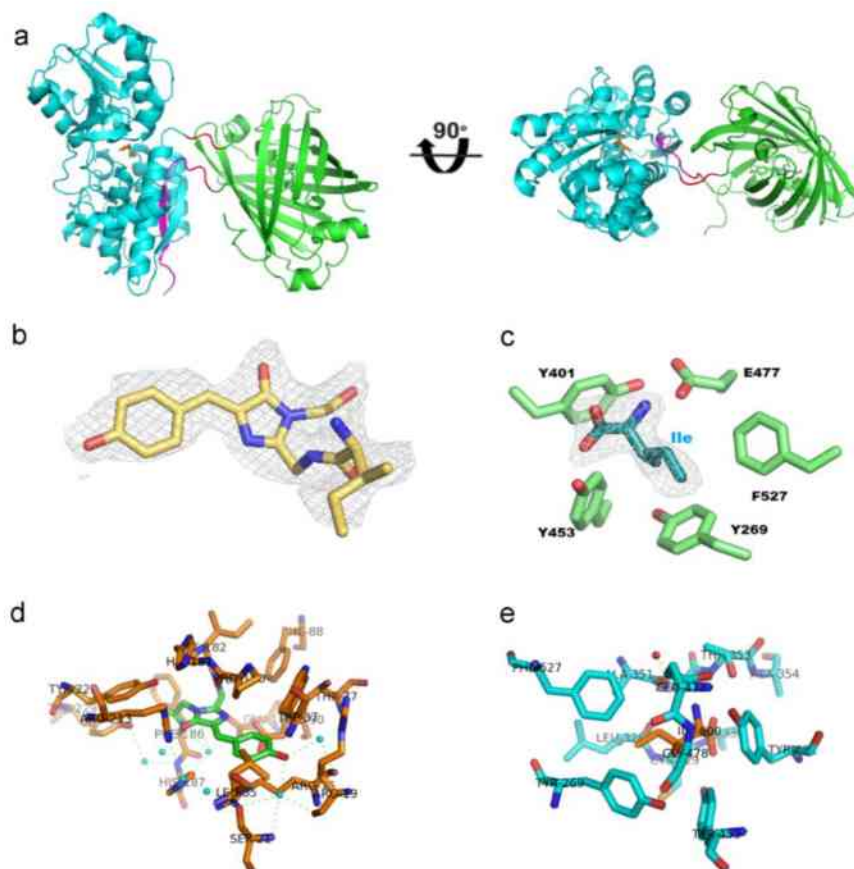


Рисунок 20. Кристаллическая структура индикатора Nelle в связанном с изолейцином состоянии. (а) Изображение структуры индикатора Nelle.

Флуоресцентный и LIVBP домены, линкеры показаны зеленым, голубым/пурпурным и красным цветами, соответственно. (b,c) Карта электронной плотности $2F_{obs}-F_{calc}$ (серая сетка и контуры на уровне 1,1 σ) показана для хромофора (b) и изолейцина (c) Nelle. (d,e) Ближайшие 4,5 Å окрестности хромофора (d) и изолейцина индикатора Nelle. Водородные связи и молекулы воды показаны зеленым пунктиром и сферами, соответственно

Затем была проанализирована непосредственное окружение хромофора Nelle. Хромофор в Nelle образует 5 прямых водородных связей с E90, P180, R213 и Y229 и 8 водородных связей, опосредованных водой, с R19, S21, R75, H187, Y209 и Y229 (рис. 20 d). Окружение хромофоров Nelle и mNeonGreen на расстоянии 4,5 Å одинаково, за исключением различных боковых цепей остатков R19 в Nelle и соответствующего C139 в mNeonGreen, а также L35 в Nelle и соответствующего F155 в mNeonGreen (рис. 20 d).

Для выяснения молекулярной основы механизма флуоресцентного ответа Nelle на изолейцин, были проанализированы связи тирозинового гидроксильного аниона хромофора с окружающими аминокислотами (рис. 19 d). Эти связи могут играть наиболее важную роль в механизме флуоресцентного ответа индикатора Nelle на изолейцин, поскольку хромофор в отсутствие и присутствии изолейцина имеет преимущественно разное протонное состояние (рис. 16 а). Тирозиновый гидроксил в связанном с изолейцином Nelle преимущественно находится в анионном состоянии (рис. 16 а) и образует три водородные связи, опосредованные водой, с главными карбонилами R19 и R75, а также с гидроксильной группой S21 (рис. 20 d). Согласно кристаллической структуре Nelle, домен связывания изолейцина LIV BP состоит из двух субдоменов. На основе кристаллических структур домена LIV BP в присутствии или отсутствии изолейцина можно увидеть большой сдвиг этих субдоменов относительно друг друга при связывании изолейцина. Согласно кристаллической структуре Nelle, R19 находится на конце аминокислотного линкера между N-концевым β -листом LIV BP, связанным с изолейцином (рис. 20 а), и флуоресцентным доменом cpNeonGreen. Можно предположить, что при диссоциации изолейцина происходит большая перестройка в субдоменах LIVBP, что приводит к сдвигу R19. Это, в свою очередь, может вызвать ослабление или разрыв водородной связи, опосредованной водой, между главным карбонилем R19 и гидроксильной группой хромофора тирозина, что приводит к протонированию хромофора. Кроме того,

поскольку главная цепь R19 связана водородной связью с карбонилем главной цепи R75 и через воду с гидроксильной группой S21, смещение R19 может перестроить R75 и S21 и нарушить два оставшихся водородных связи с гидроксилом хромофора и способствовать протонированию хромофора.

Было рассмотрено окружение изолейцина в индикаторе NeIIe (рис. 20 е). Карбоксильная группа изолейцина образует три водородные связи с S330, T353 и Y453. Аминогруппа изолейцина водородно связана с A351, T353 и E477. Боковая цепь изолейцина образует гидрофобную среду, состоящую из V266, Y269, L328, C329, A351, Y401, Y453 и F527.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполнения магистерской диссертации разработан сенсор на изолейцин с оптимальным дизайном на основе одного яркого мономерного циркулярно-пермutedированного белка mNeonGreen в качестве флуоресцентной части и изолейцин-валин-лейцин-связывающего белка LIVBP.

Исходя из полученных результатов, можно сделать следующие выводы:

1. Разработан генетически кодируемый интенсификационный индикатор на изолейцин Nelle на основе одного зеленого флуоресцентного белка, который позволяет детектировать аминокислоту изолейцин, и с меньшей чувствительностью, лейцин и валин *in vitro*.

2. Спектральные свойства, молекулярная яркость, олигомерное состояние, период полусозревания, фотостабильность сенсора охарактеризованы *in vitro* в растворе. Исходя из полученных данных, индикатор Nelle является мономерным и может быть использован для мечения белков в органеллах животных клеток.

3. Разработанный индикатор Nelle и его ратиометрическая версия были успешно проэкспрессированы в различных органеллах животных клеток.

Таким образом, индикатор Nelle является первым мономерным генетически кодируемым зелёным флуоресцентным индикатором на основе одного флуоресцентного белка с высоким контрастом на изолейцин. Разработанный индикатор Nelle открывает возможность высокопродуктивного скрининга для создания бактериальных штаммов-суперпродуцентов незаменимой аминокислоты изолейцина и изучения роли изолейцина в качестве потенциального нейромедиатора или нейромодулятора в головном мозге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ameen, S., Ahmad, M., Mohsin, M., Qureshi, M. I., Ibrahim, M. M., Abdin, M. Z., Ahmad, A. Designing, construction and characterization of genetically encoded FRET-based nanosensor for real time monitoring of lysine flux in living cells // Journal of nanobiotechnology. 2016. № 14. С. 49.
2. Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. № 96. С. 11241–11246.
3. Barykina N. V., Subach O. M., Doronin D. A. A new design for a green calcium indicator with a smaller size and a reduced number of calcium-binding sites. // Scientific Reports. 2016. № 34447.
4. Chen T.W., Wardill T.J., Sun Y. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity// Nature. 2013. № 7458. С. 295-300.
5. Clavel D, Gotthard G, von Stetten D, et al. Structural analysis of the bright monomeric yellow-green fluorescent protein mNeonGreen obtained by directed evolution. Acta Crystallogr D Struct Biol. 2016
6. Doronin D. A., Barykina N. V., Subach O. M. Genetically encoded calcium indicator with NTnC-like design and enhanced fluorescence contrast and kinetics. // BMC Biotechnology. 2018. №. 10.
7. Fehr M, Frommer WB, Lalonde S. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors // Proc Natl Acad Sci USA. 2002. № 99. С. 9846-9851.
8. Fehr M, Lalonde S, Lager I, Wolff MW, Frommer WB In vivo imaging of the dynamics of glucose uptake in the cytosol of COS-7 cells by fluorescent nanosensors. // J Biol Chem. 2003. № 278. С. 19127-19133.
9. Felder CB, Graul RC, Lee AY. The venus flytrap of periplasmic binding proteins: an ancient protein module present in multiple drug receptors // AAPS Pharm Sci .1999. № 23

10. Fukami-Kobayashi K, Tateno Y, Nishikawa K Domain dislocation: a change of core structure in periplasmic binding proteins in their evolutionary history. // J Mol Biol. 1999. № 286. C. 279-290.
11. Grist, J. P., Josey, S. A. Inverse analysis adjustment of the SOC air–sea flux climatology using ocean heat transport constraints. Journal of Climate, 16(20), 2003; 3274–3295.
12. Grünwald Niklaus J.: Genome sequences of *Phytophthora* enable translational plant disease management and accelerate research, Canadian Journal of Plant Pathology, 34:1,2012; 13-19.
13. Honda Y., Kirimura K. Generation of Circularly Permuted Fluorescent-Protein-Based Indicators for In Vitro and In Vivo Detection of Citrate. PLOS ONE 8(11): 10. 2013; 1371.
14. Lager I, Fehr M, Frommer WB, Lalonde S: Development of a fluorescent nanosensor for ribose. // FEBS Lett . 2003. № 553. C. 85-89.
15. Lambert G. G., Depernet H. *Aequorea victoria*'s secrets // BioXriv – 2019.
16. Li J., Shang Z., Chen J., Gu W., Yao L., Yang X., Sun X., Wang L., Hou T., Wang S., Xing D., Gill D. L., Hou L., Zhou Y., Tang A., Zhang X., Wang Y. Engineering of NEMO as calcium indicators with ultra-high dynamics and sensitivity. // Nature Methods. 2023. C. 918-914.
17. Lomo T. The discovery of long-term potentiation // Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences. 2003.
18. Lüddecke, J., Francois, L., Spät, P., Watzer, B., Chilczuk, T., Poschet, G., et al. PII Protein-Derived FRET Sensors for Quantification and Live-Cell Imaging of 2-Oxoglutarate. Sci. Rep. 7,2017; 1437.
19. Marcus Fehr, Wolf B. Frommer, Sylvie Lalonde. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors// Proceedings of the National Academy of Sciences. 2002. № 15.

20. Marcus Fehr, Sylvie Lalonde, Ida Lager, Michael W. Wolff, Wolf B. Frommer. In Vivo Imaging of the Dynamics of Glucose Uptake in the Cytosol of COS-7 Cells by Fluorescent Nanosensors // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. № 21. C. 19127-19133.
21. Marvin, J. S., Borghuis, B. G., Tian, L., Cichon, J., et al. An optimized fluorescent probe for visualizing glutamate neurotransmission. *Nat. Methods* 10, 2013; C. 162–170.
22. Mary A Dwyer, Homme W Hellinga. Periplasmic binding proteins: a versatile superfamily for protein engineering // *Current Opinion in Structural Biology*. 2004. № 14. C. 495-504.
23. Mita M., Ito M., Harada K., Sugawara I., Ueda H., Tsuboi T., Kitaguchi T. Green fluorescent protein-based glucose indicators report glucose dynamics in living cells. *Anal. Chem.* 2019. № 91. 4821-4830.
24. Nasu Y., Shen Y., Kramer L., Campbell R. E. Structure- and mechanism-guided design of single fluorescent protein-based biosensors. // *Nature Chemical Biology*. 2021. C. 509-518.
25. Okada, S., Ota, K., Ito, T. Circular permutation of ligand-binding module improves dynamic range of genetically encoded FRET-based nanosensor // *Protein science: a publication of the Protein Society*. 2009. № 18. C. 2518–2527.
26. Okumoto, S., Looger, L.L., Micheva, K.D., Reimer, R.J., W.B. Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102. 2005; C. 8740–8745.
27. Proksch E. pH in nature, humans and skin // *The Journal of dermatology*. 2018. № 9. C. 1044-1052.
28. Qian, X., Nguyen, H.N., Tang, H., Song, H., Ming, G., 2016. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* 165, C. 1238–1254.

29. Quijcho FA, Ledvina PS. Atomic structure and specificity of bacterial periplasmic receptors for active transport and chemotaxis: variation on common themes. // *Mol Microbiol*. 1996. № 20. C. 17-25.
30. Reid R. C., Victor J. D., Shapley R. M. The use of m-sequences in the analysis of visual neurons: linear receptive field properties // *Visual neuroscience*. 1997. № 6. C. 1015-27.
31. Ronnie P.-A. Berntsson, Sander H.J. Smits, Lutz Schmitt, Dirk-Jan Slotboom, Bert Poolman A structural classification of substrate-binding proteins// *FEBS Letters*. 2010. № 12. C. 2606-2617.
32. Sadoine M., Castro-Rodríguez V., Poloczek T., Javot H., Sunal E., Michael M. Affinity Purification of GO-Matryoshka Biosensors from *E. coli* for Quantitative Ratiometric Fluorescence Analyses. *Q, Bio-protocol* 10 (19): 2020; 10-15.
33. Sakiko Okumoto, Loren L. Looger, Kristina D. Micheva, Richard J. Reimer, Stephen J Smith, Wolf B. Frommer. Detection of glutamate release from neurons by genetically encoded surface-displayed FRET nanosensors // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005. № 24.
34. San Martin, R., Barron, D.A., Tuxhorn, J.A., Ressler, S.J., Hayward, S.W., Shen, X., Laucirica, R., Wheeler, T.M., Gutierrez, C., Ayala, G.E., et al. (2014). Recruitment of CD34(+) fibroblasts in tumor-associated reactive stroma: the reactive microvasculature hypothesis. *The American journal of pathology* 184, 1860–1870.
35. Shaner N. C., Lambert G. G. A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum* // *Nature Methods*. 2013. № 5. C. 407–409.
36. Subach O. M., Barykina N. V, a Red Fluorescent Genetically Encoded Calcium Indicator Based on Calmodulin from *Schizosaccharomyces Pombe* Fungus. // *Int. J. Mol. Sci*. 2021. № 111.

37. Subach O. M., Gundorov I. S., Yoshimura M., Subach F. V., Zhang J., Gruenwald D., Souslova E. A., Chudakov D. M., Verkhusha V. V. Conversion of red fluorescent protein into a bright blue probe // *Chem. Biol.* 2008. №23. C. 1116-1124
38. Subach O. M., Sotskov V. P., Plusnin V. V. Novel genetically encoded bright positive calcium indicator NCaMP7 based on the mNeonGreen fluorescent protein. // *International Journal of Molecular Sciences.* 2020. №. 1644.
39. Subach O.M., Barykina N.V., Chefanova E.S., Vlaskina A.V., Sotskov V.P., Ivashkina O.I., Anokhin K.V., and Subach F.V. FRCaMP, a Red Fluorescent Genetically Encoded Calcium Indicator Based on Calmodulin from *Schizosaccharomyces Pombe* Fungus// *International journal of molecular sciences.* 2020. № 22.
40. Takanaga, H., Chaudhuri, B., Frommer, W.B., 2008. GLUT1 and GLUT9 as major contributors to glucose influx in HepG2 cells identified by a high sensitivity intramolecular FRET glucose sensor. *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Biomembranes* 1778, 1091–1099.
41. Tam R, Saier MH Jr Structural, functional, and evolutionary relationships among extracellular solute-binding receptors of bacteria. // *Microbiol Rev.* 1993. № 57. C. 320-346.
42. Trakhanov S., Vyas N.K., Luecke H., Kristensen D.M., Ma J., and Quirocho F.A. Ligand-free and -bound structures of the binding protein (LivJ) of the *Escherichia coli* ABC leucine/isoleucine/valine transport system: trajectory and dynamics of the interdomain rotation and ligand specificity// *Biochemistry* 2005. № 17. C. 6597-6608.
43. Wellen, K.E., G. Hatzivassiliou, U.M. Sachdeva, T.V. Bui, J.R. Cross, and C.B. Thompson. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science.* 324:2009; 1076–1080.
44. Wu H., Uchimura K., Donnelly E.L., Kirita Y., Morris S.A., Humphreys B.D. Comparative Analysis and Refinement of Human PSC-Derived Kidney

Organoid Differentiation with Single-Cell Transcriptomics. *Cell Stem Cell*. 2018; 23: 869-881.

45. Wu J, Abdelfattah AS, Zhou H, Ruangkittisakul A, Qian Y, Ballanyi K, Campbell RE. Genetically Encoded Glutamate Indicators with Altered Color and Topology. *ACS Chem Biol*. 2018. № 13. C.1832-1837.

46. Yáñez M., Gil-Longo J., Campos-Toimil M. Calcium binding proteins // *Adv Exp Med Biol*. 2012. C. 461-82.

47. Yoshida T, Nakajima H, Takahashi S, Kakizuka A, Imamura H. OLIVE: A Genetically Encoded Fluorescent Biosensor for Quantitative Imaging of Branched-Chain Amino Acid Levels inside Single Living Cells. *ACS Sens*. 2019. № 4. C. 3333-3342.

48. Zadrán S., Standley S., Wong K., Otiniano E. Fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensors: visualizing cellular dynamics and bioenergetics // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012. C. 895-902.

49. Zhang Y., Rózsa M., Liang Y.// *Nature*.2023. C. 884-891.

50. Zhou, Y., Waanders, L. F., Holmseth, S., Guo, C., Berger, U. V., Li, Y., et al. Proteome analysis and conditional deletion of the EAAT2 glutamate transporter provide evidence against a role of EAAT2 in pancreatic insulin secretion in mice. *J. Biol. Chem*. 2014. C. 1329–1344.