

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-268

**ОПТИМИЗАЦИЯ СВОЙСТВ ГЕНЕТИЧЕСКИ КОДИРУЕМОЙ МЕТКИ  
НА ОСНОВЕ ФЛУОРОГЕН-АКТИВИРУЮЩЕГО БЕЛКА PICOFAST\*****OPTIMIZATION OF THE PROPERTIES OF A GENETICALLY ENCODED TAG  
BASED ON THE FLUOROGEN-ACTIVATING PROTEIN PICOFAST**Д. А. Мустафин<sup>1,2</sup>, С. А. Краснова<sup>1</sup>, М. С. Баранов<sup>1,3</sup>, Ю. А. Богданова<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет  
им. Н. И. Пирогова, МоскваD.A. Mustafin<sup>1,2</sup>, S.A. Krasnova<sup>1</sup>, M. S. Baranov<sup>1,3</sup>, Y.A. Bogdanova<sup>1,3</sup><sup>1</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow<sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny<sup>3</sup>Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

✉ denis.a.mustafin@yandex.ru

**Аннотация**

В ходе разработки сплит-системы на основе флуороген-активирующего белка nanoFAST было выяснено, что его N-фрагмент, состоящий из 87 аминокислот, сам по себе способен связывать флуороген и флуоресцировать. Оптимизации свойств N-фрагмента nanoFAST как флуоресцентной метки посвящена настоящая работа.

**Abstract**

During the development of a split-system based on the fluorogen-activating protein nanoFAST, it was found that its N-fragment, consisting of 87 amino acids, is capable of binding fluorogen and fluorescing by itself. This study is dedicated to optimizing the properties of the nanoFAST N-fragment as a fluorescent label.

Одним из перспективных направлений в области флуоресцентного мечения является применение комплексов флуорогенов и флуороген-активирующих белков. Флуорогены представляют собой молекулы, которые практически не флуоресцируют в свободном состоянии, однако демонстрируют интенсивную флуоресценцию при связывании с флуороген-активирующими белками. Значительную популярность в последние годы приобретает белок FAST (*Fluorescence-Activating and absorption-Shifting Tag*) и его варианты [1]. Он обладает меньшим по сравнению с зеленым флуоресцирующим белком размером (125 аминокислот, 14 кДа), не требует времени для созревания хромофора и присутствия кислорода в среде. Кроме того, этот белок демонстрирует повышенную устойчивость к фотообесцвечиванию благодаря возможности замещения поврежденной молекулы флуорогена новой. Флуорогенами для этого белка могут выступать соединения из группы арилиден-имидазолонов.

Ранее удалением 26 аминокислот с N-конца оригинального FAST в нашей лаборатории был получен его уменьшенный вариант, названный nanoFAST [2]. В процессе создания его сплит-варианта было показано, что N-концевой фрагмент белка, состоящий из 87 аминокислот тоже способен связывать флуороген арилиден-имидазолон HBR-DOM2 и флуоресцировать [3].

В ходе нашей работы мы оптимизировали условия случайного мутагенеза для внесения в среднем 3,75 замены в кодирующей последовательности белка, после чего методом Golden Gate по стандарту MoClo клонировали полученную последовательность в оптимизированную для проведения MoClo плазмиду pBAD. На среде LB с агаром с добавлением арабинозы для индукции синтеза белка и флуорогена HBR-DOM2 с помощью системы документирования ChemiDoc мы провели скрининг. Были проанализированы  $1,5 \times 10^4$  колоний и отобраны 10 улучшенных вариантов, чья интенсивность флуоресценции превышала среднюю интенсивность флуоресценции изначального фрагмента не менее чем на 2 среднеквадратичных отклонения.

После проведения секвенирования по Сэнгеру и получения последовательностей мутированных вариантов (см. таблицу) мы получили модели структур белков при помощи нейросетевой модели AlphaFold (модель учи-

\* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 24-74-00013).

© Д. А. Мустафин, С. А. Краснова, М. С. Баранов, Ю. А. Богданова, 2025

тывала наличие глицин-серинового линкера GGS GSGSGS) и сравнили их со структурой nanoFAST, полученной при помощи ЯМР ранее [4].

Модель предсказывает смыкание бета-складок с N- и C-концов в параллельной укладке, образуя флуороген-связывающий карман, при этом он обладает меньшим объемом по сравнению с nanoFAST, что может сказываться на активации флуоресценции флуорогена. Также в оригинальном фрагменте модель предсказывает отдаление остатка E46 (здесь и далее нумерация аминокислотных остатков соответствует нумерации полноразмерного FAST) от Y42 во внутреннем кармане. Взаимодействие этих остатков с молекулой HBR-DOM2 важно для активации флуоресценции. При этом удаления не наблюдается в трех из десяти полученных улучшенных вариантов белка (R2, R3, R6).

Было показано, что перспективными местами для внесения замен являются C- и N- концевые бета-складки, а также расположенные рядом с флуороген-связывающим карманом I49 и V66, замены в которых встречаются в некоторых улучшенных вариантах. Мы провели насыщающий мутагенез по положениям 82 и 84–87, составляющим C-концевую бета-складку, но он не принес новых улучшенных вариантов (положение M83 было сохранено в силу важности его взаимодействия с флуорогеном). Необходимо проведение дальнейших работ для проверки выдвинутых гипотез.

**Аминокислотные замены, выявленные у улучшенных вариантов белка.  
Нумерация замен соответствует полноразмерному FAST**

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

### Литература

1. Plamont M.-A. et al. Small fluorescence-activating and absorption-shifting tag for tunable protein imaging in vivo // Proc. Nat. Acad. Sci. 2016. Vol. 113. P. 497–502.
2. Mineev K. S. et al. NanoFAST: Structure-based design of a small fluorogen-activating protein with only 98 amino acids // Chem. Sci. 2021. Vol. 12. P. 6719–6725.
3. Baleeva N. S., Goncharuk M. V., Ivanov I. A. picoFAST: New Genetically Encoded Fluorescent Tag // Russ. J. Bioorg. Chem. 2025. Vol. 51. P. 721–728.
4. Lushpa V. A., Baleeva N. S., Goncharuk S. A. et al. Spatial Structure of NanoFAST in the Apo State and in Complex with its Fluorogen HBR-DOM2 // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23. P. 11361.