

УДК: 577.7: 577.112

Флуоресцентные белки красной спектральной области Е.С.Морозова¹, В.В.Верхуша¹, Е.Э.Перский²

¹Медицинский колледж имени Альберта Эйнштейна (Нью-Йорк, США)²Харьковский национальный университет имени В.Н.Каразина (Харьков, Украина)

Визуализация отдельных молекул, внутриклеточных структур, живых клеток и целых модельных организмов является одной из наиболее важных проблем при проведении исследований в области биохимии, биотехнологии, клеточной биологии и биологии развития. В настоящее время для решения таких научных задач широко используются генетически кодируемые флуоресцентные белки, такие как зелёный флуоресцентный белок (GFP) и ему гомологичные, в том числе и новые красные флуоресцентные белки. В этом миниобзоре суммируются сведения о спектральных характеристиках, биохимических свойствах и перспективах применения GFP-подобных белков и, в особенности, красных флуоресцентных белков.

Ключевые слова: флуоресцентный белок, GFP, DsRed, mKate, хромофор, микроскопия.

Флуоресцентні білки червоної спектральної області К.С.Морозова, В.В.Верхуша, Є.Е.Перський

Проблема візуалізації окремих молекул, внутрішньоклітинних структур, живих клітин та модельних організмів в цілому є однією з найважливіших при проведенні досліджень у галузі біохімії, біотехнології, клітинної біології та біології розвитку. На даний момент генетично кодовані флуоресцентні білки, такі як зелений флуоресцентний білок (GFP) та йому гомологічні, включаючи нові червоні флуоресцентні білки, широко використовуються для вирішення таких наукових задач. У цьому мініогляді наведені спектральні характеристики, біохімічні властивості і перспективи застосування GFP-подібних білків та, особливо, червоних флуоресцентних білків.

Ключові слова: флуоресцентний білок, GFP, DsRed, mKate, хромофор, микроскопия.

Fluorescent proteins of the red spectral region K.S.Morozova, V.V.Verkhusha, Ye.E.Perskiy

An imaging of individual molecules, intracellular organelles, live cells and whole model organisms is one of the most important scientific problems in the fields of biochemistry, biotechnology, cell and developmental biology. At present, genetically encoded fluorescent proteins, such as the green fluorescent protein (GFP) and its homologues, including the new red fluorescent proteins are widely used to solve these problems. In this minireview we summarize spectral characteristics, biochemical properties and potential applications of the GFP-like proteins and, particularly, the red fluorescent proteins.

Key words: fluorescent protein, GFP, DsRed, mKate, chromophore, microscopy.

Использование в молекулярной биологии флуоресцентных белков в качестве маркеров стало революционным нововведением, позволяющим наблюдать многие тонкие структуры и сложные процессы в живых клетках и организмах. Внедрив ген флуоресцентного белка в клетку вместе с каким-либо другим геном, можно, благодаря свечению, наблюдать экспрессию определенных генов, отслеживать расположение их продуктов в пространстве и происходящие с ними изменения.

Впервые два GFP (Green Fluorescent Protein) были обнаружены в медузе *Aequorea victoria* (Shimomura et al., 1962) и в морском огурце *Renilla reniformis* (Ward, Cormier, 1979), как составляющие компоненты биолюминесцентных систем. Однако широкую известность эти белки приобрели только в 90-е годы, после того как удалось клонировать ген GFP из медузы (Prasher et al., 1992) и показать, что этот белок флуоресцирует, будучи синтезирован практически в любом организме. В 1999 году в неболюминесцентных кораллах класса Anthozoa были найдены гомологи GFP (так называемые GFP-подобные белки) с зеленой, желтой и красной флуоресценцией. По одной из гипотез, они несут фотопротекторную функцию. Всего к настоящему времени клонировано более 200 генов флуоресцентных белков (с длинами волн испускания флуоресценции от 445 нм до 645 нм) и хромопротеинов дикого типа, в основном, из классов Anthozoa и Hydrozoa, типа Cnidaria, и их число постоянно растет (Carter et al., 2004; Shagin et al., 2004; Verkhusha, Lukyanov, 2004). Зелёные GFP-подобные белки были обнаружены и за пределами типа Cnidaria, у планктонных копепод (тип Arthropoda, класс Crustacea, семейство Pontellida) (Shagin et al., 2004).

В 2002 году была предложена номенклатура GFP-подобных белков. Название флуоресцентного белка состоит из первой буквы родового названия, трех первых букв видового названия организма, из которого был клонирован данный белок, и аббревиатуры, относящейся к цвету белка – (GFP – для зеленых белков, YFP – для желтых, RFP – для красных, CP – для хромобелков). Для GFP из *Aequorea victoria* и красного флуоресцентного белка DsRed из *Discosoma sp.* сохранены их общеупотребительные названия (Labas et al., 2002).

Структурная организация. Несмотря на относительно низкую аминокислотную гомологию между GFP-подобными белками, выделенными из организмов разных систематических групп, структурная организация флуоресцентных белков имеет общие закономерности. Их третичная структура является высококонсервативной и представляет собой так называемый β -бочонок – цилиндр, образованный 11 β -складками, по оси которого проходит α -спираль, в её средней части находится ароматический хромофор (рис. 1). Хромофоры в GFP-подобных белках образуются в результате циклизации трех аминокислотных остатков в положении 65–67 (Reid, Flynn, 1997). Хромофор в *Aequorea* GFP образован аминокислотами Ser65, Tyr66 и Gly67. Хотя такая аминокислотная последовательность встречается и в других белках, в них хромофор не образуется, что говорит о решающей роли пространственной структуры белка в созревании хромофора (Tsien, 1998). Безусловно, крайне существенно то, что хромофор расположен внутри β -бочонка.

GFP-подобные белки формируют хромофор аутокаталитически, без использования внешних ферментов или кофакторов, кроме молекулярного кислорода. Именно это свойство делает их уникальными генетически кодируемыми флуоресцентными маркерами, которые могут быть использованы для специфического мечения клеток, клеточных органелл и белков. Различные спектральные свойства GFP-подобных белков объясняются химическими различиями структуры хромофоров и взаимодействиями хромофора и его микроокружения (Remington, 2006).

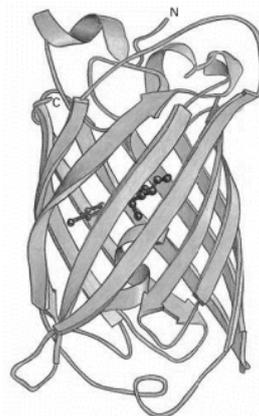


Рис. 1. Пространственная организация GFP по данным рентгеноструктурного анализа (Orto et al., 1996). Структурные элементы соответствуют β -складкам и α -спиралям. В центре расположен хромофор, атомы которого обозначены шариками

Исследования природы хромофора, структуры и свойств GFP-подобных белков позволили разработать подходы к созданию искусственных флуоресцентных белков с улучшенными и даже заданными свойствами. Наибольший интерес для практического применения представляет разработка новых белков красной и дальней красной областей спектра: с их помощью можно осуществлять визуализацию структур животных тканей, расположенных на миллиметровой глубине, а также повысить чувствительность детекции флуоресценции, поскольку автофлуоресценция клеток уменьшается с увеличением длины волны.

Флуоресцентные белки красной спектральной области. Природные красные флуоресцентные белки представителей класса Anthozoa имеют спектры флуоресценции с наиболее длинноволновым максимумом при 595 нм. На основе красных белков дикого типа DsRed1 и dis2RFP из *Discosoma sp.* был создан мутант слияния ds/drFP616, максимум флуоресценции которого сдвинут в более длинноволновую область – до 616 нм (Fradkov et al., 2000). Дальнейший красный сдвиг был достигнут при создании флуоресцентных мутантных форм хромопротеинов, то есть нефлуоресцентных GFP-подобных белков, которые формируют хромофор и, соответственно, поглощают свет, но не флуоресцируют. Так, белок HcRed1, флуоресцентный мутантный вариант хромопротеина hcr1CP из *Heteractis crispa*, имеет спектры поглощения и флуоресценции с максимумами при 590 и 645 нм соответственно (Fradkov et al., 2002).

Одной из проблем использования красных GFP-подобных белков дикого типа, таких как DsRed1, является их обязательное тетрамерное состояние, что отличает их от *Aequorea* GFP. Олигомеризация является осложняющим фактором при использовании флуоресцентных белков в качестве химерных белков слияния. Тетрамерная природа красных белков дикого типа может привести к ошибочному определению локализации и функции меченых белков (белков слияния), так же как и их агрегации в клетке. Более того, агрегация многих белков, участвующих в передаче сигнала, приводит к их активации. Одним из способов преодоления этого недостатка является процесс мономеризации путём введения аминокислотных замен в области контактов между субъединицами тетрамерного белка. Так была создана первая мономерная форма тетрамерного DsRed1 – белок mRFP1 (Campbell et al., 2002), обладающий более длинноволновыми спектрами возбуждения (584 нм) и флуоресценции (607 нм), чем исходный DsRed1. Мутант mRFP1 содержит 33 аминокислотных замены: 3 в гидрофобной и 10 в гидрофильной областях взаимодействия, 3 в коротком N-концевом участке, 13 во внутренних областях β -бочонка и 4 поверхностные замены, точное влияние которых на функции и структуру белка не известно. mRFP1 обладает в 4 раза меньшей яркостью, однако скорость его созревания более чем в 10 раз выше, чем у DsRed1. Недостатком mRFP1 является присутствие фракции белка, содержащего зеленый хромофор, что ограничивает применение данного белка для многоцветного мечения клеток. Совсем недавно появилась новая генерация мономерных мутантных форм красных флуоресцентных белков с повышенной яркостью, биохимической и фотостабильностью и скоростью формирования хромофора, таких как mStrawberry и mCherry (Shaner et al., 2004), mRaspberry и mPlum (Wang et al., 2004) и mKate (Shcherbo et al., 2007). Самым длинноволновыми вариантами являлись белки mKate и mPlum, с максимумами поглощения при 588 нм и 590 нм и флуоресценции при 635 нм и 649 нм соответственно.

Следует отметить, что существуют и другие подходы преодоления агрегации белков слияния. Одним из них является ковалентная сшивка «голова к хвосту» двух идентичных копий флуоресцентных белков, в результате чего образуется tandemный димер, что предотвращает агрегацию меченого белка (Fradkov et al., 2002). Были протестированы аминокислотные участки разной длины, соединяющие две копии белка в тандеме. Конечные меченые образцы были неотличимы от полученных при применении химерных белковых конструкций, содержащих мономерный GFP в качестве метки. Другим способом преодолеть агрегацию является использование псевдомономерных форм тетрамерных флуоресцентных белков. Этот подход основан на одновременной экспрессии флуоресцентного белка, сшитого с конкретным белком, и избыточного количества свободного флуоресцентного белка или его нефлуоресцентной мутантной формы (хромопротеина). Конечные гетеротетрамеры флуоресцентного белка содержат единичный меченый полипептид и, следовательно, могут рассматриваться как псевдомомеры (Vulina et al., 2003).

Скорость созревания (формирования) хромофора красных флуоресцентных белков дикого типа из класса Anthozoa обычно гораздо меньше скорости созревания *Aequorea* GFP. Данное обстоятельство может быть использовано при изучении хронологии процессов развития. При экспрессии гена DsRed1 и гена GFP с использованием одного и того же промотора красная флуоресценция появляется на 18–20 часов позже зеленой. Если активация экспрессии происходит вскоре после деления или дифференцировки определенных типов клеток, то цвет флуоресценции отражает стадию развития данных клеток (Verkhusha et al., 2001). Более того, был создан тетрамерный мутант DsRed1, названный DsRed-Timer, в котором две субъединицы формируют зелёный GFP-подобный хромофор, а две других, по-прежнему, красный (Terskikh et al., 2000). Так как зелёные субъединицы созревают намного раньше, чем красные, эту временную зеленую флуоресценцию можно использовать для измерения временных параметров в клетке или организме без необходимости одновременной экспрессии *Aequorea* GFP. Экспрессия DsRed-Timer, регулируемая промотором какого-либо гена, может дать точную информацию о его активации и ингибировании. Появление зеленой флуоресценции показывает, что активация промотора произошла недавно, желто-оранжевая флуоресценция означает длительную активность, а красная указывает на прекращение активности промотора. DsRed-Timer вариант успешно использовался для изучения активности гена Otx-2 в эмбрионах *Xenopus laevis* (Terskikh et al., 2000).

Замедленное созревание красного хромофора объясняется тем, что процесс его формирования является более сложным, чем формирование хромофора GFP, и состоящим из нескольких стадий (рис. 2). Наиболее полно этот процесс был изучен для хромофора DsRed1 (Verkhusha et al., 2004) с использованием анализа спектров поглощения на разных стадиях созревания. Формирование хромофора начинается сразу после сворачивания полипептида белка в β -бочонка с циклизации хромофор-формирующего трипептида в пятичленный гетероцикл за счёт образования двойной связи между карбонильным углеродом Met 65 и амидным азотом Gly 67. Так

образуется восстановленная и спектрально недетектируемая С-форма. В результате последующего окисления молекулярным кислородом $C_{\eta}-C_{\theta}$ связи в Tyr 66 формируется В-форма, поглощающая в фиолетовом диапазоне. Считается, что В-форма (голубая форма) является протонированной (нейтральной) формой зелёного депротонированного (анионного) хромофора GFP. В красном флуоресцентном белке аутокаталитическая реакция происходит дальше. За счёт частичной поляризации водородной связи на C_{α} атоме Met 65 В-форма превращается в нестабильную промежуточную I-форму, которой, вероятно, является карбанион. За I-формой могут следовать дополнительные короткоживущие промежуточные соединения, которые, однако, мало изучены. В результате формируется созревшая R-форма красного хромофора, с двойной связью между C_{α} и амидным азотом Met 65 и поглощающая в зелёном диапазоне. Следует отметить, что, аналогично зелёному хромофору в GFP, окончательная R-форма также является депротонированной.

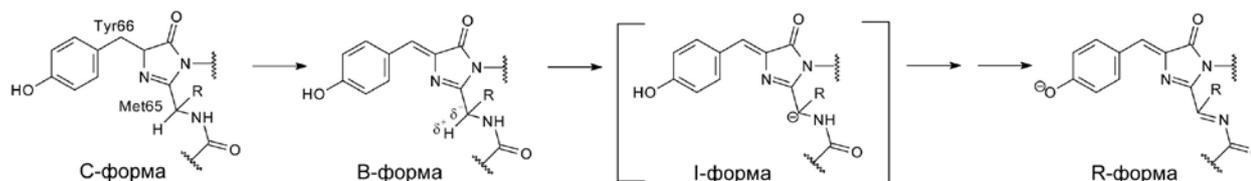


Рис. 2. Химическая схема формирования хромофора в красных флуоресцентных белках по данным (Verkhusha et al., 2004) с изменениями

Понимание механизма формирования красного хромофора и трёхмерной структуры GFP-подобного белка позволяет рациональным образом вводить точечные аминокислотные замены, приводящие к изменению свойств исходной флуоресцентной молекулы. Так, на основе мономерного белка mKate создан мутантный вариант с названием RFP660, который обладает пиками поглощения при 615 нм и флуоресценции при 660 нм (рис. 3). Оба спектральных максимума сдвинуты в дальнюю красную область видимого спектра намного сильнее, чем у всех известных в настоящее время GFP-подобных белков дикого типа и их мутантных форм (табл. 1). Полученный белок RFP660 содержал только внутренние мутации, следовательно, сохранял мономерное состояние, как и исходный mKate. По сравнению с mKate, RFP660 также обладал улучшенной рН-стабильностью, с величиной потери половины флуоресценции при pK_a , равной 5,5. Это потенциально позволяет применять RFP660 внутри одних из самых кислых клеточных компартментов, таких как лизосомы, имеющих указанную кислотность.

Для визуализации животных клеток и внутриклеточных структур при помощи RFP660 с использованием флуоресцентной микроскопии, на основе стандартных методов молекулярной биологии, были сконструированы гены двух химерных белков: RFP660 β -актином и RFP660 α -тубулином. Плазмиды с этими генами были трансфицированы в клетки линии HeLa, которые затем изучались под микроскопом в живом состоянии на третий день после начала экспрессии белков слияния (рис. 4). Следует отметить, что RFP660 химеры нормально встраивались в эндогенные цитоскелетные структуры клеток, не проявляли неспецифической локализации и не формировали в клетках агрегатов. Таким образом, RFP660 представляет интерес как с фундаментальной, так и с практической точки зрения.

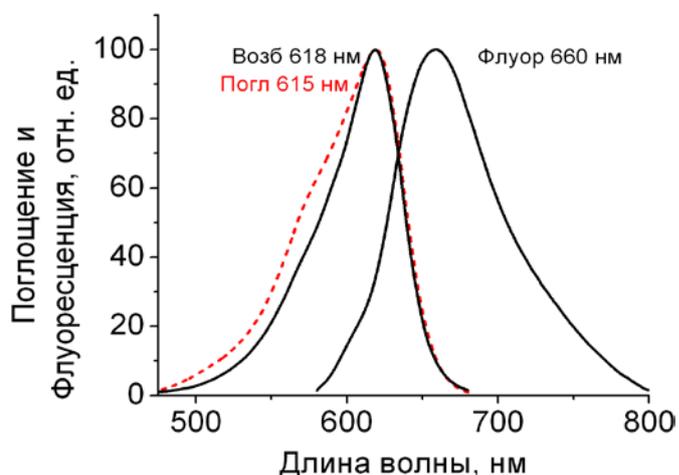


Рис. 3. Спектры поглощения, возбуждения и испускания флуоресценции RFP660

Таблица 1.

Основные характеристики созданных на настоящее время мономерных дальних красных флуоресцентных белков, имеющих максимумы флуоресценции выше 610 нм

Белок	Максимум возбуждения, нм	Максимум флуоресценции, нм	Квантовый выход	Коэффициент поглощения, $M^{-1}cm^{-1}$	Яркость, относительно mKate, %	pKa	Время полусозревания при 37°C, мин
mCherry	587	610	0,22 ^a	72,000 ^a	180	< 4,5 ^a	15 ^a
mRaspberry	598	625	0,15 ^c	79,000 ^c	134	-	55 ^b
mKate	588	635	0,28	31,500	<u>100</u>	6,5 ^c	75 ^c
mPlum	590	649	0,10 ^c	22,000 ^c	25	< 4,5 ^b	100 ^b
RFP660	618	660	0,09	27,000	27	5,5	125

Примечание: данные приведены из публикаций ^aShaner et al., 2004, ^bWang et al., 2004, ^cShcherbo et al., 2007.

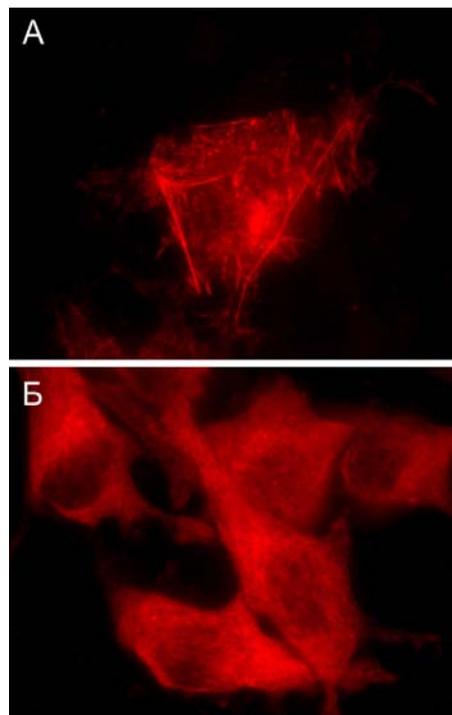


Рис. 4. Экспрессия белков слияния RFP660-β-актина (А) и RFP660-α-тубулина (Б) в клетках линии HeLa

В современной клеточной биологии флуоресцентные белки применяются для изучения экспрессии генов, локализации и динамики клеточных белков, мечения органелл и отдельных клеток, на их основе созданы биосенсоры внутриклеточных метаболитов и ферментативных активностей, а также детектирования взаимодействия между интересующими белками. Благодаря спектральным свойствам, RFP660 может существенно расширить возможности визуализации клеточных структур, добавив новый далёкий красный цвет, а также использоваться в паре с флуоресцентными белками ближне-красной области спектра для создания молекулярных биосенсоров, работающих на основе безызлучательного переноса энергии (fluorescence resonance energy transfer, или FRET) от ближне-красного донора на RFP660 акцептор.

FRET-биосенсоры. При переносе энергии по индуктивно-резонансному механизму передача энергии от молекулы донора к молекуле акцептора происходит посредством диполь–дипольного взаимодействия. Факторами, влияющими на эффективность FRET, являются степень перекрытия спектров испускания донора и поглощения акцептора, расстояние между ними (эффективность переноса зависит от расстояния между донором и акцептором как $1/R^6$), а также относительная ориентация диполей перехода хромофоров (Lakowicz, 1983). Следовательно, с помощью FRET можно регистрировать любые биохимические сигналы, изменяющие взаимную ориентацию диполей перехода хромофоров или расстояние между ними (Tsien, 1998; Zimmer, 2002).

Для практического использования FRET необходимо достаточное разделение спектров возбуждения донора и акцептора (для независимой стимуляции донора) и спектров эмиссии донора и акцептора (чтобы иметь возможность независимого измерения флуоресценции с каждого хромофора). FRET можно детектировать, регистрируя сенсibilизированную флуоресценцию акцептора, уменьшение времени жизни возбужденного состояния донора или увеличение устойчивости к обесцвечиванию донора.

Одним из первых сенсоров, созданных на основе FRET, был сенсор на активность каспазы-3, позволяющий детектировать программируемую клеточную смерть – апоптоз. Донор и акцептор были соединены линкером, содержащим сайт узнавания и разрезания каспазой-3. При разрезании линкера донор и акцептор переставали удерживаться вместе, и FRET между ними прекращался (Xu et al., 1998). Использование подобных конструкций позволило создать сенсоры и на другие клеточные протеазы, такие как каспазу-1, каспазу-8 и фактор X (Mahajan et al., 1999; Mitra et al., 1996; Luo et al., 2003). На принципе соединения донора и акцептора линкером, способным менять свою конформацию в ответ на определенные стимулы, тем самым сближая или разъединяя участников FRET-пары, основано создание сенсоров на Ca^{2+} (в качестве линкера используется кальцийсвязывающий домен кальмодулина), активность тирозиновых и серин/треониновых киназ (в качестве линкера используется пептид, содержащий сайты фосфорилирования изучаемой киназы, и домен SH2, связывающий фосфоаминокислоты), мембранный потенциал (FRET возникает при изменении конформации калиевого канала) (Miyawaki et al., 1997; Ting et al., 2001).

Другой подход к созданию FRET-биосенсоров заключается в сшивании исследуемых молекул с донором и акцептором по отдельности. Наличие или отсутствие FRET позволяет судить о расстоянии между молекулами. Мечение белков участниками FRET-пары позволяет визуализировать взаимодействие и диссоциацию белков (Siegel et al., 2000; Janetopoulos et al., 2001), гомо- и гетеродимеризацию транскрипционных факторов (Llopis et al., 2000).

Клонирование желтых и красных флуоресцентных белков из Anthozoa позволило использовать в одной клетке одновременно две независимые донор-акцепторные пары флуоресцентных белков, таких как голубой – зелёный и оранжевый – красный, что привело к увеличению информативности анализа.

Фотоактивируемые флуоресцентные белки. Ещё одними инструментами для высокоточного оптического мечения и слежения за перемещениями белков, органелл и целых клеток в живых системах являются фотоактивируемые флуоресцентные белки (PAFPs). Они способны к существенному изменению флуоресцентных свойств при облучении светом определенной длины волны: фотоактивации – переходу некоторых PAFPс из нефлуоресцентного состояния во флуоресцентное в результате действия облучения либо фотопереключению – изменению цвета флуоресценции при облучении светом (табл. 2).

В соответствии с механизмом фотоактивации созданные к настоящему моменту PAFPс можно разделить на четыре основные группы.

Первая группа включает в себя PAFPс, которые способны к необратимой фотоконверсии хромофора из нейтральной в анионную форму при облучении ультрафиолетом (около 400 нм). К ним относятся PA-GFP (Patterson, Lippincott-Schwartz, 2002), PS-CFP (Chudakov et al., 2004) и его улучшенный вариант PS-CFP2 (Chudakov et al., 2007), созданные на основе GFP-подобного белка из *Aequorea coerulea*, и несколько PAmRFP1s (Verkhusha, Sorkin, 2005). Белок PA-GFP создан на основе GFP из *Aequorea victoria* путем введения единичной замены остатка Thr203 на His. Предполагается, что в основе механизма фотоактивации PA-GFP, PS-CFP и PS-CFP2 лежит процесс декарбокислирования остатка Glu222, в результате которого происходит перестройка сети водородных связей и депротонирование хромофора (Van Thor et al., 2002; Bell et al., 2003). Необратимая фотоактивация под действием ультрафиолета была также показана для PAmRFP1 мутантов, сконструированных на основе mRFP1. Например, вариант PAmRFP1-1, обладающий «наилучшими» характеристиками, изначально имеет слабую флуоресценцию в синей области спектра, а фотоактивация приводит к 70-кратному увеличению интенсивности красной флуоресценции.

Представители второй группы PAFPs характеризуются необратимой фотоконверсией из «зеленой» флуоресцентной формы в «красную». Этот класс белков включает белки из коралловых полипов, таких как Kaede из *Trachyphyllia geoffroyi* (Ando et al., 2002), EosFP из *Lobophyllia hemprichii* и его мономерную форму mEosFP (Wiedenmann et al., 2004), KikGR, мутантную форму белка KikG из *Favia fava* (Tsutsui et al., 2005) и другие белки. Хромофор представителей данной группы образован трипептидом His65–Tyr66–Gly67. При облучении ультрафиолетом основная цепь между атомами азота и C_α His65 подвергается разрыву, и образуется двойная связь между C_α и C_β His65. Расширение системы сопряженных π-связей и приводит к сдвигу спектра флуоресценции в красную область.

К третьей группе относятся белки с необратимой фотоконверсией из зеленого в красное флуоресцентное состояние под действием как ультрафиолетового, так и видимого синего света, такие как dendGFP из октокоралла *Dendronephthya sp.* и его мономерные мутанты Dendra (Gurskaya et al., 2006) и улучшенный вариант Dendra2 (Chudakov et al., 2007). Dendra и Dendra2 представляют собой первые PAFP, которые являются одновременно мономерными, эффективно сворачиваются при температуре 37°C в бактериальных клетках и клетках животных и могут быть фотоактивированы синим светом, обладающим низкой фототоксичностью. Структурные основы чувствительности Dendra и Dendra2 к синему свету остаются пока не выясненными.

Таблица 2.

Свойства основных фотоактивируемых флуоресцентных белков

Белок	PA-GFP	PS-CFP2	Kaede	mEosFP	KikGR	Dendra2	KFP1	Dronpa	PAmRFP1
Олигомерное состояние	мономер	мономер	тетрамер	мономер	тетрамер	мономер	тетрамер	мономер	мономер
Активирующий свет	ультрафиолет	ультрафиолет	ультрафиолет	ультрафиолет	ультрафиолет	ультрафиолет или синий	зелёный	ультрафиолет	ультрафиолет
Переключающий свет	нет	нет	нет	нет	нет	нет	синий 450 нм	синий 490 нм	нет
Изменение поглощения, нм	400 на 504	400 на 490	508 на 572	505 на 569	507 на 583	490 на 553	появление пика при 590	появление пика при 503	появление пика при 578
Изменение флуоресценции, нм	515 на 517	470 на 511	518 на 580	516 на 581	517 на 593	507 на 573	появление пика при 600	появление пика при 518	появление пика при 605
Обратимость фотоактивации	необратимая	необратимая	необратимая	необратимая	необратимая	необратимая	необратимая или обратимая	обратимая	необратимая

Четвертая группа PAFPs включает белки KFP1, мутантную форму хромопротеина asu1CP из морской актинии *Anemonia sulcata* (Chudakov et al., 2003a; Chudakov et al., 2003b) и Dronpa из коралла *Pectiniidae* (Ando et al., 2004). Хромопротеин asu1CP эффективно поглощает, но не флуоресцирует; однако в ответ на облучение интенсивным зеленым светом белок становится флуоресцентным (разжигается) с максимумом поглощения при длине волны 575 нм и максимумом излучения при длине волны 595 нм (Lukyanov et al., 2000). После прекращения облучения зеленым светом белок быстро переходит в начальное нефлуоресцентное состояние. Кроме того, флуоресценция этого белка может быть мгновенно затухает при облучении коротковолновым (голубым) светом. Оба процесса («разжигание» и «тушение») обратимы (Chudakov et al., 2003a, 2003b). Короткое время жизни флуоресцентного состояния препятствует использованию asu1CP в качестве локально активируемой флуоресцентной метки белков и органелл. Поэтому была создана мутантная его форма, названная KFP1 (kindling fluorescent protein), с более длительным временем жизни флуоресцентного состояния. Стоит добавить, что облучение KFP1 зеленым светом еще большей интенсивности или в течение длительного времени (или и то, и другое вместе) вызывает необратимый переход белка во флуоресцентное состояние, при этом интенсивность флуоресценции возрастает. Согласно предположенной модели, переход asu1CP и KFP1 из хромо- во флуоресцентное состояние связан с *trans-cis* изомеризацией хромофора (рис. 5). У флуоресцентных белков из класса Anthozoa остаток Ser148 является высококонсервативным, и замена Ala148 на Ser в asu1CP приводит к значительному увеличению квантового выхода белка (Wall et al., 2000; Yarbrough et al., 2001). Было сделано предположение о сходной конформации хромофора asu1CP в флуоресцентном состоянии и

хромофоров флуоресцентных белков из класса Anthozoa. Это означает, что если фотоконверсия связана с *trans-cis* изомеризацией хромофора, остаток Tyr66 asu1CP в хромосостоянии должен взаимодействовать с Ser165. В белке DsRed1 реализации данной конформации пространственно препятствует остаток Ile165. Возможно, остаток Ser165 отвечает за стабилизацию хромофора asu1CP в нефлуоресцентном состоянии, поскольку в других флуоресцентных белках не встречается. При этом существует вероятность перехода возбужденного хромофора во флуоресцентное состояние. Данная модель хорошо объясняет обратимый переход asu1CP и KFP1 из хромо- во флуоресцентное состояние. Однако, механизм необратимой фотоактивации, наблюдаемый только для KFP1, на сегодняшний день неизвестен и требует изучения.

Другой представитель четвёртой группы – белок Dronpa, способен к обратимой фотоконверсии из флуоресцентной формы в нефлуоресцентную. Изначально Dronpa флуоресцирует в зеленой области спектра, а продолжительное или интенсивное облучение белка синим светом приводит к его переходу в нефлуоресцентное состояние с максимумом поглощения при 390 нм. После этого Dronpa может быть переведен обратно в флуоресцентное состояние облучением светом с длиной волны 400 нм.

Для белков KFP1 и Dronpa акты активации и тушения могут быть повторены многократно. Предположительно, в основе механизма обратимой фотоактивации Dronpa также лежат процессы *cis-trans* изомеризации хромофора (рис. 5).

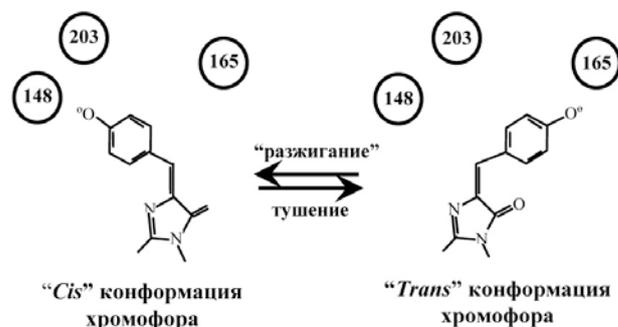


Рис. 5. Схема *cis-trans* изомеризации хромофора разжигаемого флуоресцентного белка KFP1. Цифрами обозначены аминокислотные остатки

Дальнейшее изучение структурных свойств GFP-подобных белков параллельно с клонированием новых цветных белков из природного материала обеспечит создание мутантных форм со спектрами флуоресценции в ближней инфракрасной области (700–800 нм), где автофлуоресценция тканей животных минимальна, а поглощение молекулами воды ещё незначительно. В сочетании с новыми, так называемыми двухфотонными микроскопами, лазерный свет которых проникает на глубину до нескольких миллиметров, эти белки позволят делать снимки клеток и внутриклеточных структур не только на поверхности, но и внутри живых тканей.

Список литературы

- Ando R., Hama H., Yamamoto-Hino M. et al. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol.99. – P. 12651–12656.
- Ando R., Mizuno H., Miyawaki A. Regulated fast nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting // Science. – 2004. – Vol.306. – P. 1370–1373.
- Bell A.F., Stoner-Ma D., Wachter R.M., Tonge P.J. Light-driven decarboxylation of wild-type green fluorescent protein // J. Am. Chem. Soc. – 2003. – Vol.125. – P. 6919–6926.
- Bulina M.E., Verkhusha V.V., Staroverov D.B. et al. Hetero-oligomeric tagging diminishes non-specific aggregation of target proteins fused with Anthozoa fluorescent proteins // Biochem. J. – 2003. – Vol.371. – P. 109–114.
- Campbell R.E., Tour O., Palmer A.E. et al. A monomeric red fluorescent protein // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol.99. – P. 7877–7882.
- Carter R.W., Schmale M.C., Gibbs P.D. Cloning of Anthozoan fluorescent protein genes // Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. – 2004. – Vol.138. – P. 259–270.
- Chudakov D.M., Belousov V.V., Zaraisky A.G. et al. Kindling fluorescent proteins for precise *in vivo* photolabeling // Nat. Biotechnol. – 2003a. – Vol.21. – P. 191–194.
- Chudakov D.M., Feofanov A.V., Mudrik N.N. et al. Chromophore environment provides clue to “kindling fluorescent protein” riddle // J. Biol. Chem. – 2003b. – Vol.278. – P. 7215–7219.

- Chudakov D.M., Verkhusha V.V., Staroverov D.B. et al. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – Vol.22. – P. 1435–1439.
- Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2 // *Nat. Protocols.* – 2007. – Vol.2. – P. 2024–2032.
- Fradkov A.F., Chen Y., Ding L. et al. Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol.479. – P. 127–130.
- Fradkov A.F., Verkhusha V.V., Staroverov D.B. et al. Far-red fluorescent tag for protein labeling // *Biochem. J.* – 2002. – Vol.368. – P. 17–21.
- Gurskaya N.G., Verkhusha V.V., Shcheglov A.S. et al. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light // *Nat. Biotechnol.* – 2006. – Vol.24. – P. 461–465.
- Janetopoulos C., Jin T., Devreotes P. Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-proteins in living cells // *Science.* – 2001. – Vol.291. – P. 2408–2411.
- Labas Y.A., Gurskaya N.G., Yanushevich Y.G. et al. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2002. – Vol.99. – P. 4256–4261.
- Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy // N.-Y.: Plenum Press, 1983. – 237p.
- Llopis J., Westin S., Ricote M. et al. Ligand-dependent interactions of coactivators steroid receptor coactivator-1 and peroxisome proliferator-activated receptor binding protein with nuclear hormone receptors can be imaged in live cells and are required for transcription // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – Vol.97. – P. 4363–4368.
- Lukyanov K.A., Fradkov A.F., Gurskaya N.G. et al. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol.275. – P. 25879–25882.
- Luo K.Q., Yu V.C., Pu Y., Chang D.C. Measuring dynamics of caspase-8 activation in a single living HeLa cell during TNF α -induced apoptosis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol.304. – P. 217–222.
- Mahajan N.P., Harrison-Shostak D.C., Michaux J., Herman B. Novel mutant green fluorescent protein protease substrates reveal the activation of specific caspases during apoptosis // *Chem. Biol.* – 1999. – Vol.6. – P. 401–409.
- Mitra R.D., Silva C.M., Youvan D.C. Fluorescence resonance energy transfer between blue-emitting and red-shifted excitation derivatives of the green fluorescent protein // *Gene.* – 1996. – Vol.173. – P. 13–17.
- Miyawaki A., Llopis J., Heim R. et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin // *Nature.* – 1997. – Vol.388. – P. 882–887.
- Ormo M., Cubitt A.B., Kallio K. et al. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein // *Science* – 1996. – Vol.273. – P. 1392–1395.
- Patterson G.H., Lippincott-Schwartz J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells // *Science.* – 2002. – Vol.13. – P. 1873–1877.
- Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W. et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein // *Gene.* – 1992. – Vol.111. – P. 229–233.
- Reid B.G., Flynn G.C. Chromophore formation in green fluorescent protein // *Biochemistry.* – 1997. – Vol.36. – P. 6786–6791.
- Remington S.J. Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2006. – Vol.16. – P. 714–721.
- Shagin D.A., Barsova E.V., Yanushevich Y.G. et al. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity // *Mol. Biol. Evol.* – 2004. – Vol.21. – P. 841–850.
- Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – Vol.22. – P. 1567–1572.
- Shcherbo D., Merzlyak E.M., Chepurnykh T.V. et al. Bright far-red fluorescent protein for whole-body imaging // *Nat. Methods.* – 2007. – Vol.4. – P. 741–746.
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* // *J. Cell. Comp. Physiol.* – 1962. – Vol.59. – P. 223–239.
- Siegel R.M., Frederiksen J.K., Zacharias D.A. et al. Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations // *Science.* – 2000. – Vol.288. – P. 2354–2357.
- Terskikh A., Fradkov A., Ermakova G. et al. "Fluorescent timer": protein that changes color with time // *Science.* – 2000. – Vol.290. – P. 1585–1588.
- Ting A.Y., Kain K.H., Klemke R.L., Tsien R.Y. Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol.98. – P. 15003–15008.
- Tsien R.Y. The green fluorescent protein // *Annu. Rev. Biochem.* – 1998. – Vol.67. – P. 509–544.
- Tsutsui H., Karasawa S., Shimizu H. et al. Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter // *EMBO Rep.* – 2005. – Vol.6. – P. 233–238.

- Van Thor J.J., Gensch T., Hellingwerf K.J., Johnson L.N. Phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate 222 // *Nat. Struct. Biol.* – 2002. – Vol.9. – P. 37–41.
- Verkhusha V.V., Otsuna H., Awasaki T. et al. An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed for double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol.276. – P. 29621–29624.
- Verkhusha V.V., Chudakov D.M., Gurskaya N.G. et al. Common pathway for the red chromophore formation in fluorescent proteins and chromoproteins // *Chem. Biol.* – 2004. – Vol.11. – P. 845–854.
- Verkhusha V.V., Lukyanov K.A. The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins // *Nat. Biotechnol.* – 2004. – Vol.22. – P. 289–296.
- Verkhusha V.V., Sorkin A. Conversion of the monomeric red fluorescent protein into a photoactivatable probe // *Chem. Biol.* – 2005. – Vol.12. – P. 279–285.
- Xu X., Gerard A.L.V., Huang B.C.B. et al. Detection of programmed cell death using fluorescence energy transfer // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – Vol.26. – P. 2034–2035.
- Wall M.A., Socolich M., Ranganathan R. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol.7. – P. 1133–1138.
- Wang L., Jackson W.C., Steinbach P.A., Tsien R.Y. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol.101. – P. 16745–16749.
- Wiedenmann J., Ivanchenko S., Oswald F. et al. EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol.101. – P. 15905–15910.
- Yarbrough D., Wachter R.M., Kallio K. et al. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol.98. – P. 462–467.
- Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior // *Chem. Rev.* – 2002. – Vol.102. – P. 759–781.

Представлено: В.В.Давидовим

Рекомендовано до друку: В.А.Бондаренком

© К.С.Морозова, В.В.Верхуша, Є.Е.Перський, 2009