

## ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ БЕЛКИ: ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В КЛЕТОЧНОЙ БИОЛОГИИ

© Олеся В. Степаненко,<sup>1</sup> В. В. Верхуша,<sup>2</sup> И. М. Кузнецова,<sup>1</sup> К. К. Туроверов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия, и

<sup>2</sup> Кафедра анатомии и структурной биологии Медицинского колледжа им. Альберта Эйнштейна, Нью-Йорк 10461, США;

<sup>1</sup> электронный адрес: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

Зеленый флуоресцентный белок (GFP) из медузы *Aequorea victoria* стал одним из наиболее пристально изучаемых и широко используемых в клеточной биологии белков. К настоящему времени удалось обнаружить другие природные цветные белки, подобные GFP, и получить мутантные рекомбинантные GFP-подобные белки, отличающиеся от белков дикого типа стабильностью, величиной квантового выхода, положением спектров поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции и фотохимическими свойствами. Число GFP-подобных белков продолжает постоянно расти. В настоящем обзоре сделана попытка охарактеризовать основные группы известных к настоящему времени GFP-подобных белков, описать их структуру, механизмы сворачивания и образования хромофора, показать основные направления их использования в качестве маркеров и сенсоров в клеточной и молекулярной биологии.

Ключевые слова: флуоресцентные белки, хромопротеины, фотоактивируемые белки.

Принятые сокращения: BFP — голубой флуоресцентный белок, CFP — циановый флуоресцентный белок, CP — хромопротеин, FP — флуоресцентный белок, GFP — зеленый флуоресцентный белок, KFP — «разжигаемый» флуоресцентный белок, RAFP — фотоактивируемый флуоресцентный белок, PS-CFP — фотопереключаемый циановый флуоресцентный белок, RFP — красный флуоресцентный белок, YFP — желтый флуоресцентный белок.

Одним из широко распространенных подходов при проведении исследований в области биохимии, биотехнологии, клеточной биологии и биологии развития является использование флуоресцентных маркеров для меченых отдельных молекул, внутриклеточных структур, живых клеток и целых организмов. Новый этап в использовании этого подхода наступил после клонирования гена зеленого флуоресцентного белка GFP (Shimomura et al., 1962; Prasher et al., 1992) и последующего создания «улучшенных» мутантных форм белка (Heim et al., 1994; Delagrade et al., 1995; Ormö et al., 1996; Tsien, 1998). Очередным толчком развития этого направления в биотехнологии послужило клонирование генов GFP-подобных белков, флуоресцирующих в зеленой, желтой и красной областях спектра (Matz et al., 1999; Fradkov et al., 2000; Labas et al., 2002), и нефлуоресцентных хромопротеинов (Lukyanov et al., 2000; Labas et al., 2002). Всего к настоящему времени клонировано около 200 генов флуоресцентных белков (FPs) и хромопротеинов (CPs), в основном из класса Anthozoa и Hydrozoa типа Cnidaria, и их число постоянно растет (Carter et al., 2004; Shagin et al., 2004).

Большое преимущество GFP-подобных белков как флуоресцентных маркеров по сравнению, например, с низкомолекулярными флуоресцентными метками обусловлено их способностью образовывать хромофор без участия вспомогательных кофакторов, ферментов или

каких-либо субстратов, кроме молекулярного кислорода (Heim et al., 1994; Reid, Flynn, 1997; Tsien, 1998). Таким образом, возникает возможность образования хромофора и возникновения свечения непосредственно в живых организмах, тканях или клетках (Cubitt et al., 1995). Флуоресцентные белки все больше и больше используются в качестве количественных генетически кодируемых маркеров для изучения взаимодействия белков, их локализации и транспорта (Zacharias et al., 2000).

В настоящем обзоре сделана попытка охарактеризовать основные группы известных к настоящему времени GFP-подобных белков, описать их структуру, механизмы сворачивания и образования хромофора, показать основные направления их использования в качестве маркеров и сенсоров в клеточной и молекулярной биологии.

### Спектральные свойства GFP-подобных белков

Несколько десятилетий назад GFPs были обнаружены в медузе *Aequorea victoria* (Johnson et al., 1962) и морском огурце *Renilla reniformis* (Ward, Cormier, 1979). Эти белки оказались компонентами биолюминесцентных систем, преобразующих голубой свет, испускаемый акворином (в *Aequorea victoria*) или комплексом люцифераза—оксикоэлентеразин (*Renilla reniformis*), в зеленый. Вероятно, связь GFPs с биолюминесценцией была глав-

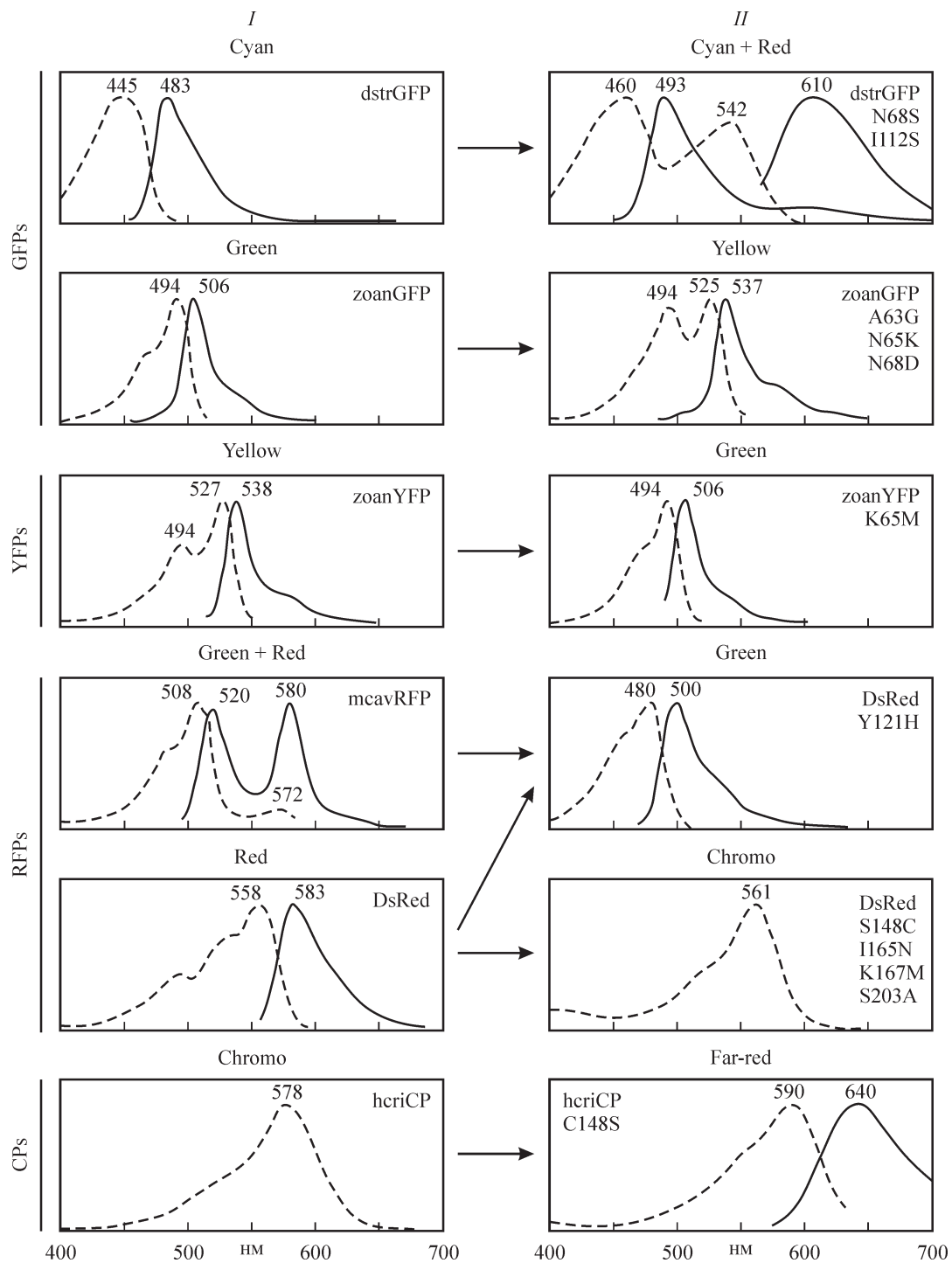


Рис. 1. Спектральные свойства GFP-подобных белков и их мутантных форм, принадлежащих к четырем основным группам в соответствии с положением спектра флуоресценции: зеленые (GFPs), желтые (YFPs), красные флуоресцентные белки (RFPs) и хромопротеины (CPs) (Verkhusha et al., 2003).

Ряд I — спектры белков дикого типа, ряд II — спектры мутантных форм. Штриховые линии — спектры возбуждения для FPs или спектры поглощения для CPs, сплошные линии — спектры флуоресценции. Публикуется с любезного разрешения авторов.

ной причиной того, что исследователи в течение некоторого времени не искали GFP-подобных белков в неблюминесцирующих кораллах. Однако сейчас ясно, что за большинство флуоресцентных и даже обычных окрасок нефлуоресцирующих видов кораллов ответственны многочисленные гомологи GFP.

GFP-подобные белки значительно различаются по спектральным свойствам. В этом разделе кратко рассмотрены флуоресцентные свойства GFP-подобных белков, принадлежащих к разным классам организмов. Спектральные свойства *Aequorea* GFP описаны более подробно, так как этот белок имеет наиболее сложные

спектры поглощения и возбуждения флуоресценции по сравнению с другими флуоресцентными белками. Отдельно рассмотрены флуоресцентные свойства так называемых фотоактивируемых флуоресцентных белков, флуоресцентные характеристики которых изменяются под действием облучения.

GFP-подобные белки из класса Anthozoa. По положению спектра флуоресценции GFP-подобные белки из класса Anthozoa можно разделить на три основные группы (Labas et al., 2002; Carter et al., 2004): зеленые (около 485—520 нм, Anthozoa GFP), желтые (около 540 нм, Anthozoa YFP) и оранжево-красные (более 570 нм, Anthozoa RFP). Кроме того, было обнаружено несколько белков с двухцветной флуоресценцией (красной и зеленой) и нефлуоресцентных CPs (Lukyanov et al., 2000; Labas et al., 2002). Белки последней группы эффективно поглощают свет, однако не флуоресцируют. Спектры поглощения, возбуждения флуоресценции и флуоресценции белков этих групп представлены на рис. 1.

Выяснение зависимости спектральных свойств FPс от структуры белка имеет большой научный и практический интерес. Однако, несмотря на то что в распоряжении исследователей имеется большое число GFP-подобных белков с различными аминокислотными заменами, в настоящее время очень трудно определить роль отдельных аминокислотных остатков в формировании определенных флуоресцентных свойств GFP-подобных белков.

Чтобы определить существенные для формирования спектральных свойств FPс аминокислотные остатки, использовали методы как случайного, так и сайтнонаправленного мутагенеза. Впервые на нефлуоресцентном хромопротеине *asulCP* из морской актинии *Anemonia sulcata* было показано, что в результате единичной аминокислотной замены Ala на Ser в положении 148 этот белок становится RFP (Lukyanov et al., 2000). Были созданы мутантные формы *asulCP* и *DsRed1* (или *drFP583* — красный флуоресцентный белок из коралла *Discosoma* sp.) с двухцветной флуоресценцией (красной и зеленой) и «зеленый» мутант *DsRed1* (Baird et al., 2000; Lukyanov et al., 2000; Wiehler et al., 2001; Terskikh et al., 2002). Была показана возможность взаимного перехода между GFPс и YFPс из класса Anthozoa (Gurskaya et al., 2001). На основании *DsRed1* был создан нефлуоресцентный хромопротеин *DsRed-NF* (Bulina et al., 2002). Анализ трехмерных структур *Aequorea* GFP и *DsRed1* показал, что основная часть аминокислот, замены которых ведут к изменению спектральных свойств белков, как и следовало ожидать, входят в микроокружение хромофора (рис. 2).

Особое внимание уделяли созданию мутантных форм флуоресцентных белков, спектр флуоресценции которых сдвинут в более длинноволновую область, где автофлуоресценция (флуоресценция флавинов, витаминов и NAD(P)H) значительно ниже, чем в сине-зеленой области спектра. Природные красные флуоресцентные белки представителей класса Anthozoa имеют спектры флуоресценции, наиболее длинноволновый максимум которых — 595 нм. На основе *DsRed1* и *dis2RFP* был создан мутант *ds/drFP616*, максимум флуоресценции которого сдвинут в более длинноволновую область — до 616 нм (Fradkov et al., 2000). Дальнейший красный сдвиг был достигнут при создании мутантных форм CPс. Так, *HcRed1*, димерная мутантная форма *hcrlCP* из *Heteractis crispa*, имеет спектры поглощения и флуоресценции с максимумами при 590 и 645 нм соответственно (Fradkov

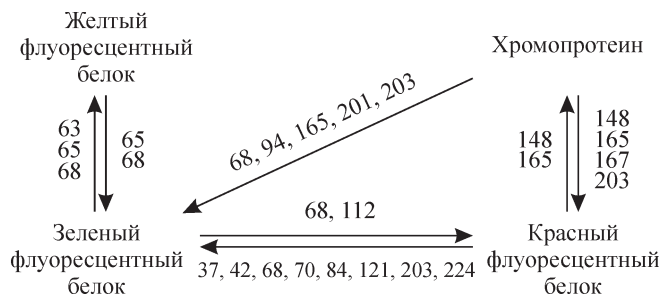


Рис. 2. Схема, показывающая аминокислотные замены, ответственные за изменение цвета флуоресценции GFP-подобных белков.

Цифры соответствуют аминокислотным положениям, в которых были проведены замены.

et al., 2002). Была создана мономерная мутантная форма *mRFP1* белка *DsRed1* (Campbell et al., 2002), обладающая более длинноволновыми положениями спектров возбуждения (584 нм) и флуоресценции (607 нм). Совсем недавно появилась улучшенная генерация мономерных красных FPс, созданных на основе *mRFP1*, таких как *mOrange*, *mStrawberry* и *mCherry* (Shaner et al., 2004), *mRaspberry* и *mPlum* (Wang et al., 2004).

GFP-подобные белки из других классов организмов. Основная часть GFP-подобных белков, выделенных из организмов класса Hydrozoa, принадлежит к классу зеленых флуоресцентных белков с максимумами флуоресценции в области 490—520 нм. Из всех природных GFP-подобных белков этого класса только *Aequorea* GFP имеет спектр поглощения с максимумом в УФ-области. Остальные зеленые белки имеют максимумы спектров поглощения в диапазоне от 465 до 498 нм.

Недавно выделили 4 новых GFP-подобных белка из Hydrozoa (Ianushevich et al., 2005). Два из них (*anm1GFP1* и *anm1GFP2* из *Anthomedusae* sp.) также флуоресцируют в зеленой области спектра. Белок *anm2CP* из *Anthomedusae* sp. оказался хромопротеином, форма и положение спектра поглощения которого сходны с данными характеристиками хромопротеинов и RFPс из класса Anthozoa. Это сходство позволило целенаправленно ввести такие мутации, которые привели к превращению *anm2CP* в RFP, названный *JRed*, с максимумом спектров поглощения и флуоресценции соответственно 584 и 610 нм (Евроген, Россия). *JRed* является первым коммерческим флуоресцентным маркером, специально разработанным для мечения белков. Из медузы *Phialidium* sp. (класс Hydrozoa) был выделен еще один флуоресцентный белок — желтый *phiYFP*. В противоположность *zo-anYFP* (класс Anthozoa) *phiYFP* содержит тирозин в положении 203. Следует заметить, что замена Thr203 на Tug в *Aequorea* GFP приводит к сдвигу спектра флуоресценции в желтую область спектра. Таким образом, *phiYFP* является единственным обнаруженным природным GFP-подобным белком, в котором реализуется та же стратегия, которая была использована при создании желтых флуоресцентных мутантных форм на основе *Aequorea* GFP.

Недавно было выделено шесть GFP-подобных белков из рачков класса Copepoda типа Arthropoda. Два FP были выделены из *Pontellina plumata* (*ppluGFP1* и *ppluGFP2*), один — из *Labidocera aestiva* (*laesGFP*), два — из *Pontella meadi* (*pmeaGFP1* и *pmeaGFP2*) и

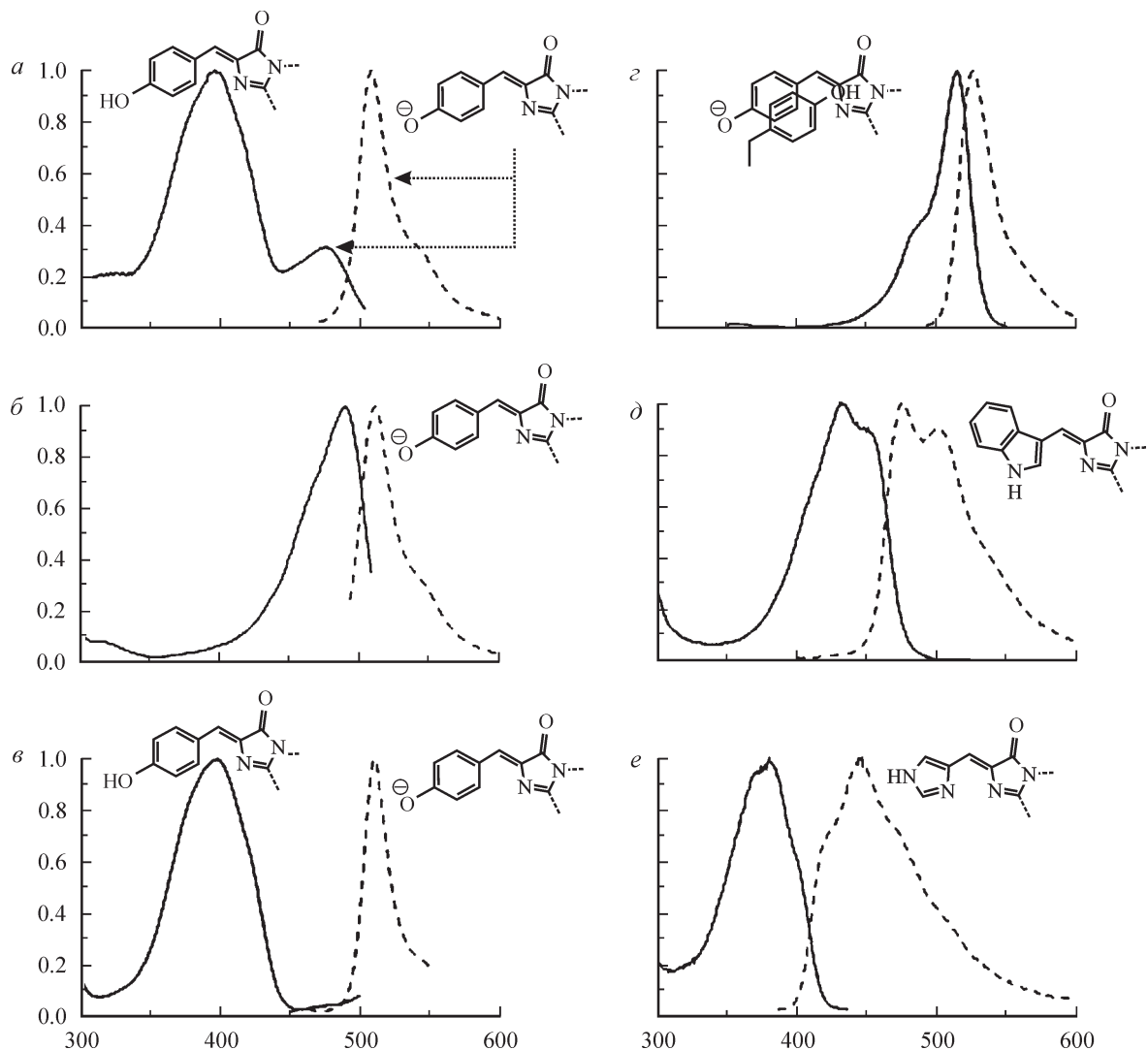


Рис. 3. Спектры возбуждения и флуоресценции (сплошные и штриховые линии соответственно) представителей шести основных классов мутантных форм GFP из *Aequorea* и структуры соответствующих хромофоров (Tsien, 1998).

*a* — GFP дикого типа; *б* — Emerald (замены Ser65 на Thr, Ser72 на Ala, Asn149 на Lys, Met153 на Thr и Ile167 на Thr), содержит хромофор в анионной форме; *в* — Sapphire (замены Thr203 на Ile, Ser72 на Ala и Tyr145 на Phe), содержит нейтральный хромофор; *г* — Toraz из класса YFPs; *д* — W1B из класса CFPs; *е* — P4-3 из класса BFPs.

один — из неустановленного вида (*pdae1GFP*). Все эти белки флуоресцируют в зеленой области спектра с максимумами флуоресценции от 500 до 511 нм. Отличительной особенностью GFPs этого класса является отсутствие в их составе триптофановых остатков (только *laesGFP* содержит Trp в положении 179), что объясняет низкую интенсивность флуоресценции данных белков при возбуждении на длине волны 280 нм.

*Aequorea* GFP и его улучшенные варианты. *Aequorea* GFP дикого типа имеет наиболее сложные спектры поглощения и возбуждения флуоресценции по сравнению с остальными GFP (рис. 3, *a*). Основная полоса спектра возбуждения флуоресценции этого GFP имеет максимум при 395 нм, интенсивность этой полосы примерно в 3 раза больше интенсивности минорной полосы с максимумом при 475 нм. Возбуждение в области полосы с максимумом 395 нм приводит к возникновению спектра флуоресценции с максимумом 508 нм, тогда как возбуждение более длинноволновым светом (475 нм)

приводит к возникновению спектра флуоресценции с максимумом 503 нм (Heim et al., 1994). Зависимость спектра флуоресценции от длины волны возбуждения свидетельствует о том, что существуют по меньшей мере две химически различные формы хромофора, равновесие между которыми не успевает установиться за время жизни в возбужденном состоянии. При pH 10–11, когда белок находится на грани разворачивания, повышение pH приводит к увеличению интенсивности поглощения в полосе с максимумом при 475 нм и уменьшению интенсивности полосы с максимумом при 395 нм. Было высказано предположение о том, что полоса поглощения с максимумом 475 нм появляется за счет молекул GFP, содержащих депротонированный (анионный) хромофор, тогда как полоса с максимумом при 395 нм связана с поглощением GFP, содержащим протонированный (нейтральный) хромофор (Cubitt et al., 1995). По-видимому, хромофор депротонируется в возбужденном состоянии, что характерно для фенолов.

GFP дикого типа из *Aequorea* имеет несколько недостатков с точки зрения его использования. Среди них — низкая эффективность сворачивания при 37 °С. Это связано с тем, что медуза *Aequorea victoria* в природе встречается в холодных водах северо-западной части Тихого океана, поэтому зрелый белок наиболее эффективно образуется при температурах ниже 37 °С. Кроме того, GFP дикого типа имеет низкую интенсивность флуоресценции при возбуждении голубым светом и низкий уровень экспрессии в некоторых видах клеток млекопитающих (Inoué, Tsuji, 1994; Heim et al., 1995). Поэтому была создана улучшенная версия GFP — белок EGFP, у которого произведены замена Phe64 на Leu, повышающая эффективность сворачивания при 37 °С, и замена Ser65 на Thr, приводящая к ионизации хромофора и улучшению спектральных свойств (Cormack et al., 1996).

В связи с проблемой фоновой флуоресценции живых клеток в зеленой области спектра проводили активные работы по мутагенезу *Aequorea* GFP с целью получения белка со спектром флуоресценции, сдвинутым в красную область. В результате были созданы многочисленные мутантные формы *Aequorea* GFP, различающиеся по спектральным свойствам, которые можно разделить на 6 классов (рис. 3).

**Первый класс** — это белки, содержащие хромофор в анионной форме, например EGFP. Эти белки содержат замену Ser65 на Thr, которая приводит к ионизации хромофора. При этом интенсивность полосы с максимумом возбуждения при 395 нм, обусловленная нейтральной формой хромофора белка дикого типа, уменьшается, а интенсивность полосы с максимумом при 470—475 нм, соответствующей возбуждению анионной формы, усиливается в 5—6 раз и сдвигается к 489—490 нм (Heim et al., 1995). Замена Ser65 на глицин, аланин, цистеин или лейцин вызывает приблизительно такой же эффект. Возможно, это объясняется тем, что только Ser65 может выступать в качестве донора водородной связи для боковой цепи Glu222, что приводит к ионизации ее карбоксильной группы, которая находится на расстоянии 3.7 Å от хромофора (Brejc et al., 1996; Ormö et al., 1996). Глицин, аланин и валин не могут образовывать водородную связь, а боковые цепи треонина и цистеина слишком большие, чтобы принять нужную конформацию в плотно упакованном внутреннем пространстве белка. Наличие этих остатков в положении 65 приводит к тому, что карбоксильная группа Glu 222 остается нейтральной. В этом случае другие полярные группы в окружении хромофора способны вызвать его ионизацию до аниона, а если Glu222 заряжена, то электростатическое отталкивание препятствует ионизации хромофора. Эта гипотеза объясняет, почему замена Glu222 на глицин приводит к аналогичным спектральным изменениям (Ehrig et al., 1995).

**Второй класс** — это белки, содержащие нейтральный хромофор, например sapphire-GFP. Замена Thr203 на Leu приводит к значительному уменьшению интенсивности полосы возбуждения с максимумом при 475 нм, но не влияет на интенсивность полосы с коротковолновым максимумом при 399 нм. Предположительно это объясняется тем, что анион хромофора не может быть достаточно сольватирован, поскольку гидроксильная группа Thr203 отсутствует. Таким образом, в основном состоянии хромофор находится преимущественно в нейтральной форме. Однако спектр флуоресценции все еще имеет максимум при 511 нм, так как хромофор в возбужденном состоянии остается достаточно кислот-

ным, чтобы отщепить протон (Heim et al., 1994; Ehrig et al., 1995).

**Третий класс** — это мутанты GFP, в которых имеется так называемое  $\pi$ -стэкинговое взаимодействие ароматического кольца и фенолят-аниона хромофора. Ароматическое кольцо вводится заменой остатка Thr203 на His, Trp, Phe или Tyr. При этом максимумы спектров возбуждения и флуоресценции сдвигаются в красную область, а максимальный сдвиг на 20 нм наблюдается в случае замены остатка Thr203 на Tyr (Ormö et al., 1996). При создании этих мутантов исходили из анализа пространственной структуры GFP/Ser65Thr. Было сделано предположение о том, что дополнительная поляризуемость окружения хромофора и  $\pi$ - $\pi$ -взаимодействие понизят энергию возбужденного состояния, что приведет к увеличению максимумов возбуждения и флуоресценции. Пространственная структура мутантного белка, содержащего Tyr203, свидетельствует о том, что ароматическое кольцо тирозина находится рядом с хромофором и взаимодействует с ним (Wachter et al., 1998). Замена Gln69 на Lys дает дополнительный длинноволновый сдвиг спектра флуоресценции на 1—2 нм, и данный белок имеет самый длинноволновый спектр среди всех известных мутантных форм GFP (529 нм). Такие мутанты были названы EYFP (улучшенные желтые флуоресцентные белки) за их желтоватую окраску.

**Четвертый класс** белков имеет в составе хромофора индольное кольцо вместо фенольного, т. е. содержит замену Tyr66 на Trp (Heim et al., 1995). Максимумы спектров возбуждения флуоресценции и флуоресценции этой мутантной формы (436 и 476 нм соответственно) имеют промежуточное положение между соответствующими максимумами для хромофора с нейтральным фенолом или анионным фенолятом. Такие мутанты были названы улучшенными циановыми флуоресцентными белками (ECFP) из-за их сине-зеленой флуоресценции.

**Пятый класс** — это белки с хромофором, содержащим имидазол вместо фенола. Белки содержат замену Tyr66 на His (Heim et al., 1995). Они были названы EBFP (улучшенные синие флуоресцентные белки), так как максимумы их спектров возбуждения флуоресценции и флуоресценции находятся при 383 и 447 нм соответственно.

**Шестой класс** белков содержит хромофор с фенилаланином вместо тирозина. Этим белкам свойственны самые коротковолновые спектры возбуждения и флуоресценции с максимумами при 360 и 442 нм соответственно (Cubitt et al., 1995; Heim et al., 1995). Эти мутанты мало изучены, так как не нашли практического применения из-за слишком коротковолнового возбуждения. Существование такого мутанта доказывает, что любой ароматический остаток в положении 66 может сформировать хромофор.

Фотоактивируемые флуоресцентные белки. Недавно было разработано несколько так называемых фотоактивируемых флуоресцентных белков — PAFPs. Эти белки способны к существенному изменению флуоресцентных свойств при облучении достаточно интенсивным светом определенной длины волны. Некоторые PAFPs переходят из нефлуоресцентного состояния во флуоресцентное в результате действия облучения (фотоактивация), в то время как другие изменяют цвет флуоресценции при облучении светом (фотопереключение). Созданные к настоящему времени PAFPs могут

быть разделены на четыре основные группы в соответствии с механизмом фотоактивации.

К первой группе относят PAFPs, которые способны к необратимой фотоконверсии хромофора из нейтральной в анионную форму. В эту группу входят PA-GFP (Patterson, Lippincott-Schwartz, 2002), PS-CFP (Chudakov et al., 2004), созданные на основе GFP-подобного белка из *Aequorea coerulescens*, и несколько PAmRFP1s (Verkhusha, Sorkin, 2005). Белок PA-GFP создан на основе GFP из *Aequorea* путем введения единичной замены остатка Thr203 на His, поэтому хромофор PA-GFP находится преимущественно в протонированном состоянии. PA-GFP имеет максимумы поглощения и флуоресценции при 400 и 515 нм соответственно. При возбуждении в полосе поглощения анионной формы хромофора (480—510 нм) интенсивность флуоресценции PA-GFP чрезвычайно низка. Облучение ультрафиолетом (около 400 нм) вызывает необратимый переход хромофора из нейтральной в анионную форму, которая имеет максимумы поглощения и флуоресценции при 504 и 517 нм соответственно. В результате фотоактивации интенсивность зеленой флуоресценции анионной формы PA-GFP увеличивается в 100 раз.

В противоположность PA-GFP белок PS-CFP флуоресцирует в синей области спектра ( $\lambda_{em} = 468$  нм), а облучение белка ультрафиолетовым светом высокой интенсивности приводит к увеличению зеленой флуоресценции при 511 нм в 300 раз и уменьшению синей флуоресценции в 5 раз. Данный переход необратим. Предполагается, что в основе механизма фотоактивации PA-GFP и PS-CFP лежит в процессе декарбоксилирования 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 действие ультрафиолетового облучения была также показана для PAmRFP1s, сконструированных на основе mRFP1 с введением замен в положении 148, 165 и 203. Белок PAmRFP1-1 (мутантная форма mRFP1, обладающая «наилучшими» характеристиками) изначально имеет слабую флуоресценцию в синей области спектра, а фотоактивация приводит к 70-кратному увеличению интенсивности красной флуоресценции.

Вторая группа PAFPs способна к необратимой фотоконверсии из «зеленой» флуоресцентной формы в «красную». Этот класс белков включает в себя белки из коралловых полипов, такие как Kaede из *Trachyphyllia geoffroyi* (Ando et al., 2002), EosFP из *Lobophyllia hemprichii* и его мономерная форма mEosFP (Wiedenmann et al., 2004), KikGR — мутантная форма белка KikG из *Favia fava* (Tsutsui et al., 2005), и другие белки. Хромофор белков данной группы образован трипептидом His65—Tyr66—Gly67. Под действием ультрафиолетового облучения основная цепь между атомами азота и  $C_{\alpha}$  His65 подвергается разрыву и образуется двойная связь между  $C_{\alpha}$  и  $C_{\beta}$  His65. Расширение системы сопряженных  $\pi$ -связей и приводит к сдвигу спектра флуоресценции в красную область.

Третья группа включает в себя dendGFP из окококоралла *Dendronophthya* sp. и недавно созданный новый мономерный PAFP — Dendra (Gurskaya et al., 2006). Белки этого класса способны к необратимой фотоконверсии из зеленого в красное флуоресцентное состояние под действием как ультрафиолетового, так и видимого синего света. Dendra представляет собой первый PAFP, кото-

рый является одновременно мономерным, эффективно сворачивается при 37 °С в бактериальных клетках и клетках животных и может быть фотоактивирован синим светом, обладающим низкой фототоксичностью. Хромофор белков dendGFP и Dendra образован аминокислотами His62—Tyr63—Gly64. Гистидин в этом положении характерен для группы Kaede-подобных фотоактивируемых белков. Однако ни один из белков этой группы не способен к фотоконверсии под действием синего света. Структурные основы чувствительности Dendra к синему свету остаются пока невыясненными. Сравнение аминокислот, входящих в микроокружение хромофора белков dendGFP/Dendra и Kaede, EosFP и KikGR, показало, что в положении 116 в Dendra находится Gln, тогда как в Kaede-подобных белках — Asp. Анализ пространственной структуры EosFP показал, что более длинная боковая цепь остатка Gln в этом положении может взаимодействовать с полипептидной цепочкой вблизи хромофоробразующего остатка His62 (Nienhaus et al., 2005). Возможно, это взаимодействие способствует расщеплению полипептидной цепи и образованию красного хромофора в ответ на облучение синим светом. Чтобы установить механизм фотоконверсии Dendra, необходимо дальнейшее изучение.

Четвертая группа PAFPs включает в себя белки KFP1, мутантную форму хромопротеина asulCP из морской актинии *Anemonia sulcata* (Chudakov et al., 2003a, 2003b) и Dronpa из коралла *Pectiniidae* (Ando et al., 2004). Белок дикого типа asulCP эффективно поглощает свет (максимум поглощения при 568 нм), но не флуоресцирует; 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 ( $t_{1/2} < 10$  с). С другой стороны, 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 дикого типа asulCP в качестве локально активируемой флуоресцентной метки белков и органелл in vivo. Поэтому была создана мутантная форма asulCP, названная KFP1 (kindling fluorescent protein), с более длительным временем жизни флуоресцентного состояния. Этот белок, так же как asulCP, переходит во флуоресцентное состояние при облучении интенсивным зеленым светом и тушится при облучении голубым светом. «Разожженный» KFP1 имеет полосу поглощения с максимумом при длине волны 580 нм и максимумом полосы излучения при длине волны 600 нм. Кроме того, облучение KFP1 зеленым светом еще большей интенсивности или в течение более продолжительного промежутка времени (или и то и другое вместе) вызывает необратимый переход белка во флуоресцентное состояние, при этом интенсивность флуоресценции возрастает по крайней мере в 30 раз по сравнению с необлученным белком.

С помощью сайтнаправленного мутагенеза хромопротеинов scigCP и hcrigCP была создана целая серия «разжигаемых» флуоресцентных белков (Chudakov et al., 2003b). Все эти белки способны как к обратимой, так и к необратимой фотоконверсии из нефлуоресцентного во флуоресцентное состояние. Две мутантные формы

hcr1CP с единичными заменами Asn165 на Ala и Asn165 на Gly соответственно подвергаются фотоконверсии под действием синего света. Преимуществом этих мутантных форм по сравнению с другими KFPs является отсутствие фоновой фотоконверсии в процессе наблюдения флуоресценции «разожженных» белков. KFPs в «разожженном» состоянии имеют максимумы флуоресценции в красной области спектра (длины волн возбуждения 580—590 нм, волн флуоресценции — 600—630 нм).

Белок Dronpa способен к обратной фотоконверсии из флуоресцентной формы в нефлуоресцентную. Изначально Dronpa флуоресцирует в зеленой области спектра с максимумом поглощения при длине волны 503 нм и максимумом излучения при длине волны 518 нм. 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 во флуоресцентное состояние облучением светом с длиной волны 400 нм. Следует заметить, что для белков KFP1 и Dronpa акты активации и тушения могут быть повторены многократно.

Была предложена модель, согласно которой переход asulCP и KFP1 из хромосостояния во флуоресцентное состояние связан с *cis*—*trans*-изомеризацией хромофора (рис. 4). В ряду флуоресцентных белков из класса Anthozoa остаток Ser148 является высококонсервативным, и замена Ala148 на Ser в asulCP приводит к значительному увеличению квантового выхода белка (Wall et al., 2000; Yarbrough et al., 2001). Поэтому было сделано предположение о сходной конформации хромофора asulCP во флуоресцентном состоянии и хромофоров Anthozoa FPs и *Aequorea* GFP. Следовательно, если фотоконверсия связана с *cis*—*trans*-изомеризацией хромофора, остаток Tyr66 asulCP в хромосостоянии должен взаимодействовать с Ser165. В белке DsRed1 реализации данной конформации пространственно препятствует остаток Ile165. Предполагается, что остаток Ser165 отвечает за стабилизацию хромофора asulCP в нефлуоресцентном состоянии, поскольку в других FPs Ser в этом положении не встречается. При этом существует вероятность перехода возбужденного хромофора во флуоресцентное состояние. Предложенная модель хорошо объясняет свойства KFP1 и asulCP и обратимый переход из хромосостояния во флуоресцентное состояние. Механизм необратимой фотоактивации KFP1 неизвестен и требует дальнейшего изучения. Механизм обратимой фотоактивации Dronpa в настоящий момент неизвестен, хотя предполагается, что в его основе также лежат процессы *cis*—*trans*-изомеризации хромофора.

### Структурные свойства GFP-подобных белков

Для объяснения существенного различия спектральных свойств GFP-подобных белков существуют две возможности: различие нековалентных взаимодействий между хромофором и остатками, входящими в микроокружение хромофора, и химическое различие структуры хромофоров. Вероятно, реализуются оба механизма. В этом разделе описываются механизмы образования и структура «зеленого», «красного», «желтого» хромофоров и хромофоров из хромопротеинов. Рассматривается также влияние ключевых аминокислот из микроокружения хромофора на формирование спектральных свойств GFP-подобных белков.

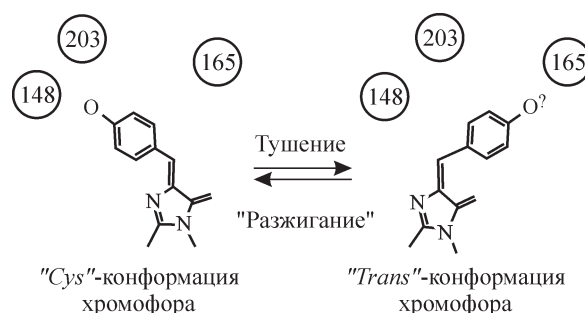
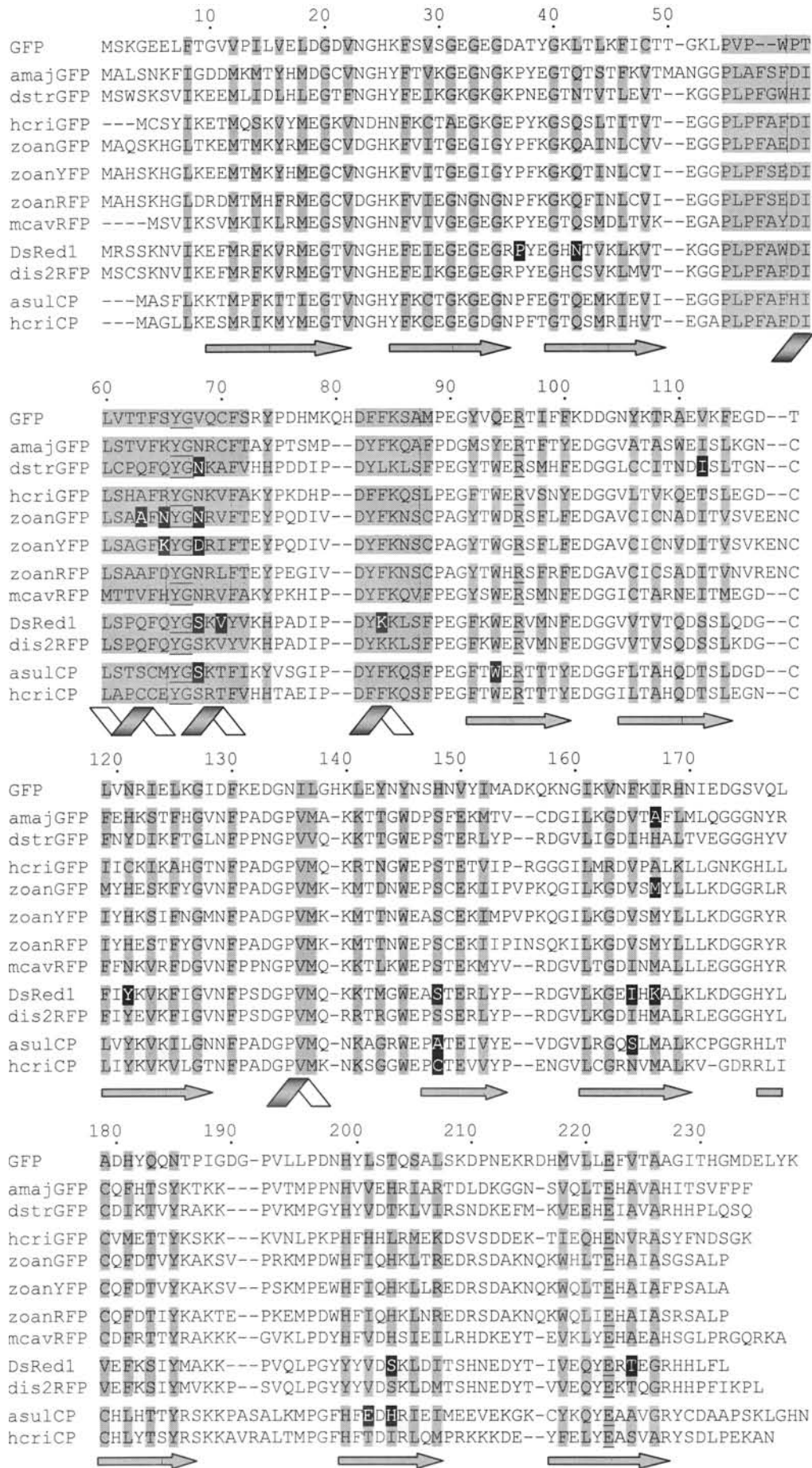


Рис. 4. Схема *cis*—*trans*-изомеризации хромофора разжигаемого флуоресцентного белка KFP1 при обратимом переходе из флуоресцентного состояния в нефлуоресцентное.

Цифры — аминокислоты, взаимодействие с которыми стабилизирует хромофор в флуоресцентном или нефлуоресцентном состоянии.

Пространственная структура, топология и олигомеризация. Несмотря на довольно низкую аминокислотную гомологию между GFP-подобными белками из разных классов (около 25—30%), анализ аминокислотных последовательностей этих белков выявляет ключевые элементы вторичной структуры (рис. 5). Эти белки имеют 11  $\beta$ -ветвей и  $\beta$ -изгибы между ними. Поэтому третичная структура этих белков, по-видимому, является высококонсервативной и представляет собой так называемый  $\beta$ -бочонок-цилиндр, образованный 11  $\beta$ -ветвями, по оси которого проходит  $\alpha$ -спираль с прикрепленным к ней хромофором (рис. 6). Данные об одинаковой топологии пространственной структуры GFP-подобных белков подтверждает сравнение трехмерных структур *Aequorea* GFP и DsRed1. Входящий в состав хромофора остаток Gly67 присутствует во всех известных FPs. В Anthozoa FPs хромофорообразующие остатки (Tyr66 и Gly67) являются абсолютно консервативными (нумерация аминокислот Anthozoa FPs соответствует нумерации аминокислот *Aequorea* GFP после выравнивания). Остатки Arg96 и Glu222 также являются высококонсервативными в ряду GFP-подобных белков. Данные аминокислотные остатки предположительно вовлечены в процесс образования хромофора (Yarbrough et al., 2001).

За исключением GFP из медузы *Aequorea victoria* и недавно обнаруженного хромопротеина anm2CP из *Anthomedusae* sp., зеленые флуоресцентные белки, полученные из других организмов класса гидроидных, даже в разбавленных растворах образуют стабильные димерные или тетрамерные комплексы, которые диссоциируют только в денатурирующих условиях (Ward, Cormier, 1979; Ward, Bokman, 1982). Димеризация *Aequorea* GFP (Prendergast, Mann, 1978) наблюдается только при высоких концентрациях белка в растворе и зависит от ионной силы (константа димеризации оценивается как  $10^{-4}$  М). В зависимости от условий роста кристаллов GFP из *Aequorea* кристаллизуется в виде димера или мономера (Brejc et al., 1996). В димерной структуре GFP поверхность взаимодействия двух мономеров образована как гидрофобными (Ala206, Leu221 и Phe223), так и гидрофильными (Glu146, Asn144, Ser147, Arg168, Tyr200 и др.) полярными аминокислотными остатками. Способность *Aequorea* GFP к олигомеризации приводит к зависимости формы спектра поглощения от концентрации белка. Для *Aequorea* GFP дикога типа при олигомеризации наблюдается уменьшение поглощения в полосе с максимумом при 475 нм (Cubitt et al., 1995).



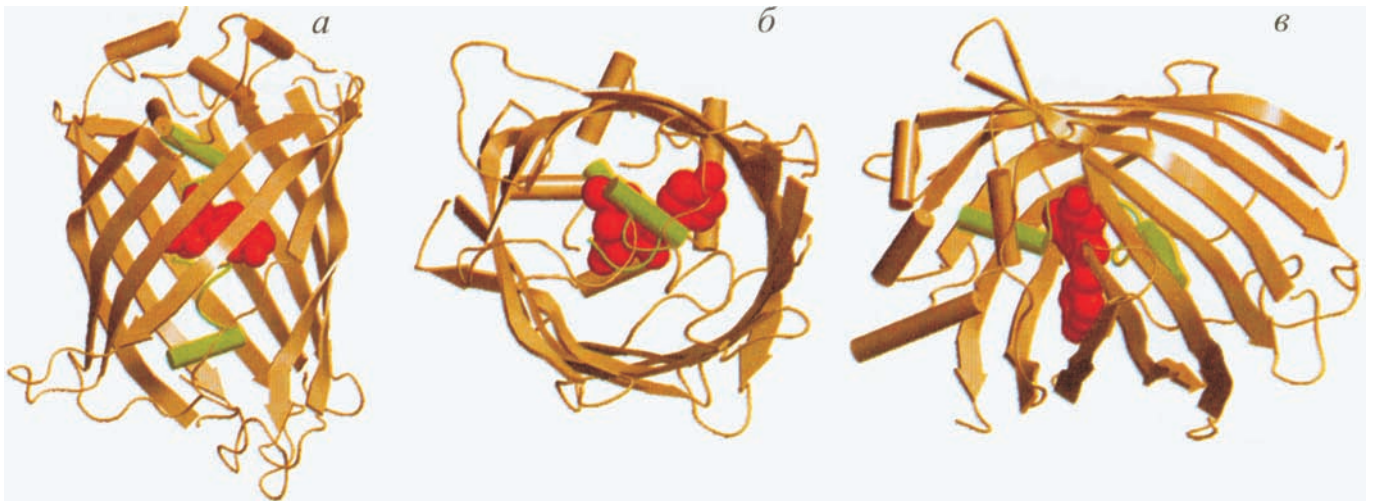


Рис. 6. Пространственная структура GFP из *Aequorea* с заменами S65T и Q80R (1EMA, Ormö et al., 1996; Bernstein et al., 1977) в трех проекциях (а—в).

Хромофор показан красным цветом. Центральная  $\alpha$ -спираль, содержащая хромофор, показана зеленым цветом. Рисунок создан с использованием графических программ VMD (Humphrey et al., 1996) и Raster3D (Merritt, Bacon, 1977).

Димеризация GFP, по-видимому, играет немаловажную роль в природе. Хемилюминесцирующий белок акворин, который является партнером GFP при индуктивно-резонансном переносе энергии в медузе *Aequorea victoria*, связывается только с димерной формой GFP, а не с мономерной. Вероятно, в этом случае обеспечивается более эффективный захват энергии возбужденного состояния акворина (Cubitt et al., 1995). Из всех белков, выделенных из организмов класса Crustacea, третичная структура определена только для rpluGFP2, который является мономером. Большинство природных флуоресцентных белков и хромопротеинов из класса Anthozoa, по-видимому, даже при наномолярных концентрациях представляют собой тетрамеры. Тетрамерная организация была показана для zoanYFP, zoanGFP, asulGFP-amajGFP (Labas et al., 2002), ds/drFP616 и красных флуоресцентных мутантов asulCP методами гель-фильтрации (Fradkov et al., 2000), нативного электрофореза (Baird et al., 2000; Yanushevich et al., 2002), равновесной седиментации (Baird et al., 2000; Vrzhersch et al., 2000; Verkhusha et al., 2001a), флуоресцентной корреляционной спектроскопии (Heikal et al., 2000) и динамического рассеяния света (Verkhusha et al., 2001a).

Рентгеноструктурный анализ DsRed1 показал, что белок имеет тетрамерную организацию (Yarbrough et al., 2001). Каждый мономер в DsRed1 взаимодействует с двумя соседними мономерами, при этом области взаимодействия химически различны (см. таблицу). Гидрофобная область взаимодействия образована центральным кластером плотно упакованных гидрофобных аминокислот, который окружен несколькими полярными аминокислотами. Гидрофильная область взаимодействия со-

держит много электростатических контактов и водородных связей между полярными аминокислотами и молекулами воды, а также содержит редкую структуру «зажим», образованную С-концевыми участками каждого мономера. Существуют две модели пространственной структуры DsRed1, различающиеся по положению двух С-концевых остатков — Phe231 и Leu232. Согласно первой модели (Yarbrough et al., 2001), Phe231 расположен в щели между Arg223 и Glu225 соседних мономеров. Согласно другой модели (Wall et al., 2000), эту щель занимает Leu232, в то время как Phe231 не участвует в образовании тетрамера. Вполне возможно, что в природе встречаются обе эти конформации.

Сравнение участков аминокислотных последовательностей, входящих в состав областей взаимодействия мономеров у различных FPs из Anthozoa, показало, что они существенно различаются у разных белков. Так, например, в гидрофобную область взаимодействия DsRed1 входят Glu19, Lys124 и Glu26, способные образовывать солевые мостики. В то же время гидрофобная область взаимодействия rfoRFP (Labas et al., 2002), вероятно, не содержит солевых мостиков, так как в ее состав входят Val19, Pro26 и His124. Кроме того, в rfoRFP отсутствует Arg157, который мог бы взаимодействовать с Glu101 из гидрофильной области взаимодействия. Белок mcavRFP (Labas et al., 2002), возможно, содержит солевой мостик между Arg109 и Asp126. Следует отметить, что все три близко гомологичных *Zoanthus* FPs (zoanGFP, zoanYFP и zoan2RFP) содержат заметно различающиеся области взаимодействия с различными аминокислотами в положениях 109, 124, 126, 128 и 157. В связи с этим можно предположить, что, скорее всего, флуоресцентные белки

Рис. 5. Аминокислотные последовательности белков, подобных GFP, с различными флуоресцентными свойствами: amajGFP и dstrGFP — подгруппа циановых флуоресцентных белков; hcriGFP и zoanGFP — зеленые флуоресцентные белки; zoanYFP — желтые флуоресцентные белки; DsRed1 и dis2RFP — красные флуоресцентные белки; asulCP и hcriCP — нефлуоресцентные белки или хромопротеины. zoanRFP и mcavRFP обладают дуальной флуоресценцией (Verkhusha et al., 2003).

Нумерация аминокислот соответствует GFP из *Aequorea*. Консервативные аминокислотные остатки Tyr66, Gly67, Arg96 и Glu222 подчеркнуты. Серый фон указывает аминокислоты, боковые цепи которых образуют внутреннюю область  $\beta$ -бочонка. Аминокислоты, влияющие на спектральные свойства флуоресцентных белков, выделены белым шрифтом на черном фоне. Фигуры под аминокислотными последовательностями показывают схематично элементы вторичной структуры. Публикуется с любезного разрешения авторов.

Аминокислоты, образующие области взаимодействия в белке DsRed1, и их консервативность или вариабельность в других GFP-подобных белках (Verkhusha, Lukyanov, 2004)

Положение аминокислот <sup>a</sup>	DsRed1	mRFP1	dstrGFP	amajGFP	zoanGFP	zoanYFP	zoanRFP	rfloRFP	mcavRFP	asulCP	hcriCP	
Гидрофобная область	97	V	V	S	T	S	S	S	T	S	T	T
	105	V	V	L	V	V	V	V	V	I	F	I
	107	T	T	C	T	I	I	I	T	T	T	T
	109	T	T	T	S	N	N	S	T	R	H	H
	126	I	R	T	H	Y	N	Y	M	D	L	L
	128	V	T	L	V	V	M	V	A	V	N	T
	184	I	T	V	S	V	V	I	I	T	T	S
	19	E	E	E	D	E	E	E	V	E	E	E
	124	K	K	K	T	K	I	T	H	R	K	K
	26	E	E	Y	Y	K	K	K	P	N	Y	Y
Гидрофильная область	101	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
	157	R	E	R	C	K	K	S	C	R	V	E
	166	H	K	H	T	S	S	S	A	N	L	V
	180	E	E	D	Q	Q	Q	Q	D	D	H	H
	153	Y	Y	Y	T	I	M	I	F	Y	Y	Y
	176	H	H	H	N	R	R	R	H	H	H	R
	178	L	D	V	R	R	R	R	R	R	T	I
	151	R	R	R	K	K	K	K	I	K	I	V
	168	A	R	A	F	Y	Y	Y	S	A	A	A
	146	E	E	E	D	E	E	E	E	E	E	E
	198	Y	A	Y	N	W	W	W	Y	Y	F	F
	200	Y	K	Y	V	F	F	F	F	F	F	F
	147	A	A	P	P	P	A	P	P	P	P	P
	149	T	T	T	F	C	C	C	T	T	T	T
	229	H	S	H	T	S	S	S	S	G	C	S
	230	L	T	P	S	A	A	A	P	L	D	D
	231	F	G	F	V	L	L	L	L	P	A	L
	232	L	A	Q	F	P	A	P	Q	R	A	P
	223	R	R	I	H	H	H	H	G	H	A	A
	225	E	E	V	V	I	I	I	V	E	V	V
204	K	K	K	R	K	K	K	C	S	R	R	

<sup>a</sup> Взаимодействие между остатками соседних мономеров показано стрелками.

образуют гомо-, а не гетеротетрамеры. Кроме того, методами флуоресцентной микроскопии живых кораллов было показано, что FPs разного цвета обычно экспрессируются в разных клетках организма. Поэтому считается, что вероятность встретить в природе гетеротетрамерный FP очень низка (Wall et al., 2000).

При физиологических условиях флуоресцентные белки дикого типа из биолюминесцентных организмов, в том числе из *Aequorea* и *Renilla*, способны образовывать гетеротетрамеры с соответствующими фотобелками (FP<sub>2</sub> × фотобелок<sub>2</sub>). Это наблюдение вместе с анализом пространственной структуры GFP-подобных белков позволяет предположить, что функции гидрофильной и гидрофобной областей взаимодействия различны. Одна из этих областей обычно участвует в образовании гомодимеров, в то время как функция другой области изменялась в ходе эволюции. В белках у биолюминесцентных видов эта область ответственна за связывание акворина или люциферазы, а у небиолюминесцентных связывает второй гомодимер GFP-подобного белка.

Информация о трехмерной структуре DsRed1 и аминокислотах, входящих в области взаимодействия, оказалась полезной при создании мутантных неолигомерных форм FPs. Генноинженерными методами было показано, что формирование тетрамеров является очень важным этапом при созревании FPs. Единичные аминокислотные замены в областях взаимодействия DsRed1 приводили к резкому уменьшению интенсивности флуоресценции и скорости созревания белка (Campbell et al., 2002). Потеря способности образовывать тетрамеры по-разному сказывается на флуоресцентных свойствах различных FPs из Anthozoa. Так например, флуоресцентный мутант hcriCP удалось перевести из тетрамерной формы в димерную при помощи единичной аминокислотной замены Leu126 на His в гидрофобной области взаимодействия, и при этом не наблюдали существенного уменьшения свечения. Аминокислотная замена в том же самом положении (Ile126 на Arg) в DsRed1 также переводит белок в димерную форму, но при этом практически полностью утрачивается способность к флуоресценции (Campbell et al.,

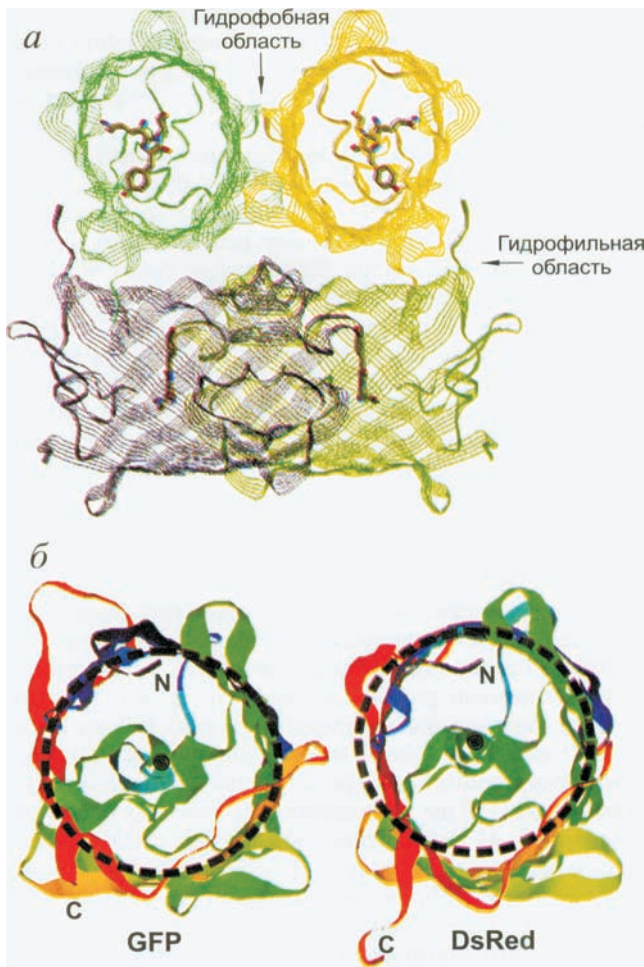


Рис. 7. Четвертичная структура красного флуоресцентного белка DsRed1 (Verkhusha et al., 2003).

*a* — структура тетрамера; мономеры показаны разным цветом; в центре каждого мономера расположен хромофор, атомы которого показаны серым (углерод), синим (азот) и красным (кислород) цветами; *б* — показано, что структура мономера DsRed1 в отличие от мономера GFP из *Aequorea* не вписывается в окружность (штриховая линия), что свидетельствует о деформации β-бочонка. Рисунки получены с помощью программы Rasmol. Публикуется с любезного разрешения авторов.

2002). Для того чтобы димерная форма сохранила способность к флуоресценции, потребовалось введение дополнительных мутаций. Мономерная флуоресцирующая мутантная форма mRFP1 отличается от DsRed1 33 аминокислотными заменами.

Структура мономера DsRed1 очень сходна со структурой GFP из *Aequorea* (рис. 7) и представляет собой β-бочонок (β-can). Однако мономерные субъединицы DsRed1 заметно деформированы. В отличие от GFP, который при рассмотрении сверху имеет форму круга, мономер DsRed1 имеет овальную форму. Подобная деформация непосредственно влияет на микроокружение хромофора и, возможно, имеет значение при созревании белка. Этим можно объяснить потерю флуоресцентных свойств при аминокислотных заменах в областях взаимодействия.

Механизмы образования хромофора. Уникальной особенностью GFP из *Aequorea* является то, что входящий в состав белка хромофор представляет собой не внешнюю простатическую группу (как, например, гем в гемоглобине), а образуется из остатков цепи Ser65—

Tyr66—Gly67 путем реакции автокаталитической циклизации между остатками Ser и Gly (Cody et al., 1993; Ormö et al., 1996), входящими в состав внутренней α-спирали (рис. 8). Хотя подобная аминокислотная последовательность встречается и в других белках, в них хромофор не образуется, что свидетельствует о решающей роли пространственной структуры белка в образовании зеленого хромофора. После процесса циклизации промежуточный продукт подвергается дегидрированию (отщепление атомов водорода происходит по C<sub>α</sub>—C<sub>β</sub>-связи Tyr66) при помощи молекулярного кислорода, в результате чего и возникает зрелый хромофор (4-(p-гидроксифенилиден)-имидазол-5-он). Хромофор имеет плоское строение и состоит из двух ароматических колец и мостика между ними. Одним из ароматических колец является бензольное кольцо Tyr66, а другим — пятичленный гетероцикл. Таким образом, хромофор представляет собой систему сопряженных двойных связей, которая способна поглощать УФ и синий свет и излучать флуоресценцию в зеленой области спектра. Жесткое микроокружение и высокая плотность упаковки ядра GFP, по-видимому, обеспечивают хромофору высокий квантовый выход флуоресценции.

В GFP-подобных белках из Anthozoa было обнаружено большое разнообразие структур хромофора (рис. 9). В частности, изучение хромофора DsRed1 привело к появлению гипотезы о том, что красные флуоресцентные белки содержат химически отличные от GFP поглощающие структуры (Matz et al., 1999). Действительно, значительный длинноволновый сдвиг спектра вряд ли можно объяснить только особенностями микроокружения хромофора. Вскоре была предложена структура хромофора DsRed1 (Gross et al., 2000). Аминокислотами, образующими хромофор в DsRed1, являются Gln65—Tyr66—Gly67. Было показано, что спектральные свойства белка объясняются расширением системы двойных связей за счет дополнительной реакции дегидрирования связи C<sub>α</sub>—N Gln65 (рис. 10, *a*). Кристаллографический анализ белка позволил окончательно подтвердить структуру

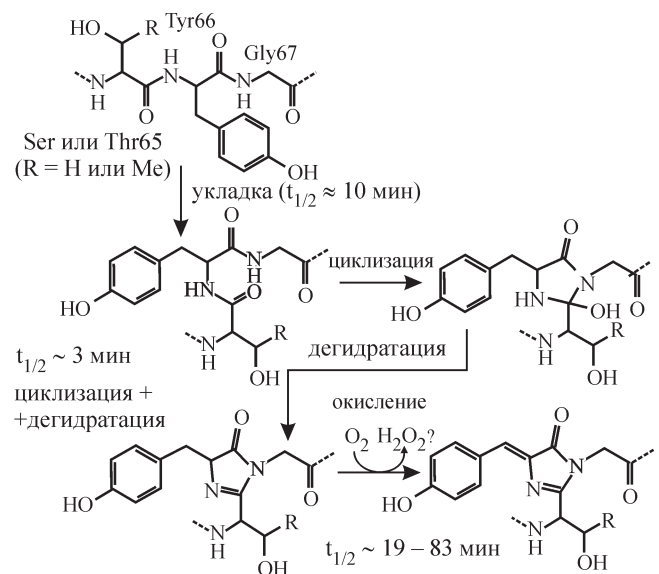


Рис. 8. Схема механизма образования хромофора GFP (по: Heim et al., 1994, с изменениями).

Константы скоростей рассчитаны для мутантной формы GFP, содержащей замену Ser65 на Thr (Heim et al., 1995; Reid, Flynn, 1997).

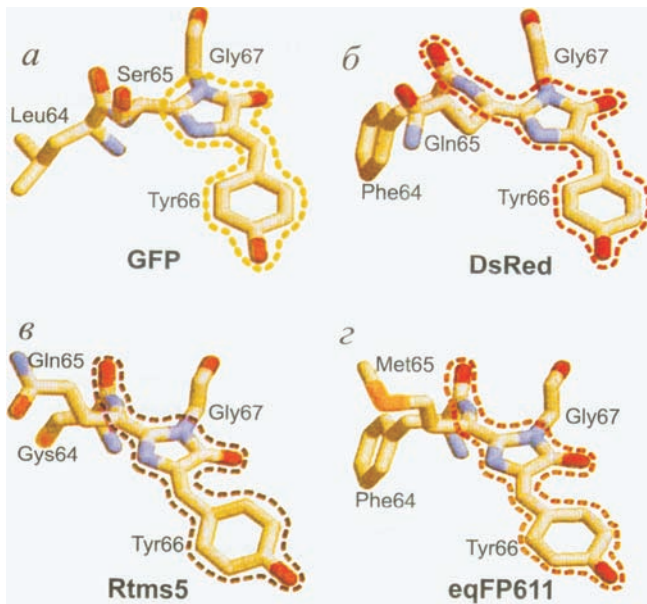


Рис. 9. Виды хромофоров, встречающиеся в GFP-подобных белках (Verkhusha, Lukyanov, 2004).

*а* — GFP из *Aequorea victoria*; *б* — красный флуоресцентный белок DsRed из *Discosoma*; *в* — нефлуоресцентный хромопротеин Rtms5 из *Montipora*; *г* — флуоресцентный белок eqFP611 из *Entactmaea* с максимумом спектра поглощения в дальней красной области. Публикуется с любезного разрешения авторов.

хромофора DsRed1 (рис. 9, б), так как было показано изменение тетраэдрической геометрии  $\alpha$ -углерода Gln65 на плоскую (Yarbrough et al., 2001). Кроме того, химический синтез соединений, похожих по структуре на хромофор DsRed1, показал, что введение дополнительной двойной связи в GFP-подобный хромофор приводит к заметному красному сдвигу спектра (He et al., 2002).

Был предложен следующий механизм образования хромофора DsRed1: на первом этапе происходит образование анионной формы GFP-подобного хромофора (с максимумом спектра поглощения при 480 нм и максимумом спектра флуоресценции при 500 нм), который подвергается окислению, вследствие чего образуется зрелый красный хромофор (с максимумом спектра поглощения при 558 нм и максимумом спектра флуоресценции при 583 нм). Такая схема образования хромофора была предложена на основании следующих наблюдений: во-первых, дикий тип DsRed1 и многие его мутантные формы содержат молекулы, флуоресцирующие в зеленой области (Baird et al., 2000; Wiehler et al., 2001); во-вторых, в процессе созревания хромофора зеленая флуоресценция появляется раньше красной, а затем постепенно уменьшается с той же скоростью, с какой растет красная флуоресценция; в-третьих, химическая структура красного хромофора представляет собой GFP-подобное ядро с расширенной системой сопряженных  $\pi$ -связей.

Однако между зеленым и красным мономерами в тетрамере DsRed1 может существовать эффективный перенос энергии. Поэтому уменьшение зеленой флуоресценции в процессе созревания хромофора может быть вызвано как химической трансформацией зеленого хромофора в красный, так и переносом энергии от зеленого к созревающему позже красному хромофору. Чтобы выяснить, какое из этих двух предположений верно, необходимо измерять спектры поглощения, так как спектры

флуоресценции в данном случае не отражают истинного количества каждой спектральной формы (Wiehler et al., 2001). Первый анализ спектров поглощения в процессе созревания хромофора DsRed1 показал, что спектр поглощения только что синтезированного DsRed1 имеет минорную синюю полосу поглощения с максимумом при 408 нм, которая не представлена в спектре зрелого белка (Wiehler et al., 2001). За появление этой полосы в спектрах поглощения отвечает нейтральная форма GFP-подобного хромофора. Кроме того, было показано постоянное увеличение интенсивности полосы поглощения при 480 нм на протяжении всего времени созревания. К сожалению, основываясь на ошибочной нормировке всех спектров по отношению к интенсивности поглощения в красной области спектра (558 нм), авторы сделали ошибочное заключение об относительном уменьшении зеленого поглощения в процессе созревания хромофора DsRed1 (Wiehler et al., 2001).

Последние данные (Verkhusha et al., 2004) свидетельствуют о необходимости пересмотра схемы созревания хромофора DsRed1. Анализ кривых поглощения на разных стадиях созревания некоторых красных белков показал следующее: 1) полоса поглощения с максимумом при 408 нм (синий пик) появляется первой, в течение некоторого времени растет, после чего падает до нуля; 2) полоса поглощения с максимумом при 480 нм (зеленый пик) появляется позже и растет на протяжении всего времени созревания хромофора; 3) красная полоса с максимумом при 558 нм появляется еще позже и также все время растет; 4) уменьшение синего пика строго коррелирует с ростом красного (рис. 11). Эти данные позволили заключить, что образование красного хромофора проходит через стадию образования нейтральной формы GFP-подобного хромофора, в то время как анионная форма GFP-подобного хромофора не является промежуточным состоянием, как это предполагалось раньше (Baird et al., 2000). Данная схема объясняет не очень понятный ранее факт наличия в зрелом DsRed и во многих его мутантных формах зеленых хромофоров.

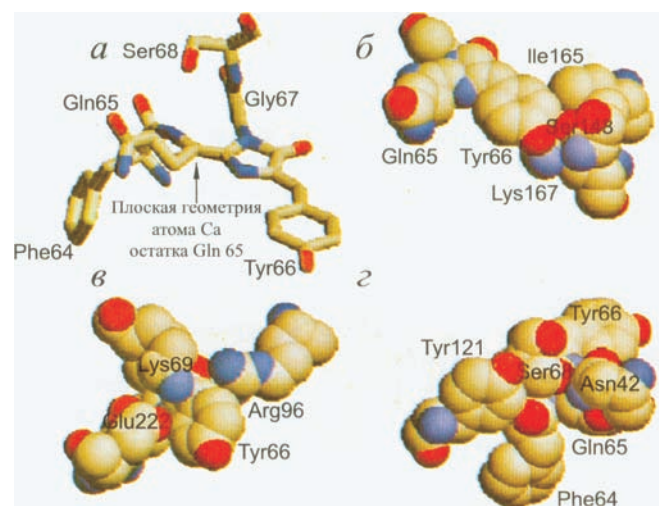


Рис. 10. Структура хромофора DsRed1 и его микроокружение (*а—в*) (Verkhusha et al., 2003).

Атомы углерода, азота и кислорода показаны серым, синим и красным цветами соответственно. Рисунки получены с помощью программы RasMol. Публикуется с любезного разрешения авторов.

Впервые пространственная структура хромофора белков, относящихся к классу хромопротеинов, была определена для Rtm5 из кораллов *Montipora efflorescens* (Prescott et al., 2003). Было показано, что Rtm5 содержит DsRed-подобный хромофор в необычной *trans*-конформации (хромофор в DsRed и GFP из *Aequorea victoria* находится в *cis*-конформации) и имеет неплоское строение (рис. 9, в). Красный флуоресцентный белок eqFP611 из морской актинии *Entactaea quadricolor* тоже содержит DsRed-подобный хромофор в *trans*-конформации (Petersen et al., 2003), однако в противоположность Rtm5 имеет плоское строение (рис. 9, з). На основании этих данных можно предположить, что плоское строение хромофора определяет высокий квантовый выход флуоресценции белка, в то время как неплоское строение хромофора в *trans*-конформации характерно для хромопротеинов. Данное предположение было подтверждено при определении пространственной структуры «разжигаемого» флуоресцентного белка asulCP из морской актинии *Anemonia sulcata* в нефлуоресцентном состоянии. Было показано, что хромофором в asulCP является р-гидроксибензилиден-имидазолон, который имеет неплоское строение и находится в *trans*-конформации. Кроме того, после реакции циклизации полипептидная цепь asulCP подвергается расщеплению между атомом С остатка Cys62 и атомом N1 остатка Met63 (Wilmann et al., 2005).

Еще один флуоресцентный белок, желтый zoanYFP из полипов *Zoanthus* sp., содержит хромофор, образованный тремя циклическими структурами. Зрелый хромофор zoanYFP формируется из аминокислотной последовательности Lys66—Tyr67—Gly68. На первых этапах созревания образуется структура, сходная с хромофором GFP, после чего в результате реакции циклизации Lys66 формируется шестичленный гетероцикл. Как и в случае asulCP, на последнем этапе созревания полипептидная цепь zoanYFP подвергается расщеплению между остатками в положениях 65 и 66 (Remington et al., 2005).

Микроокружение хромофора. На спектральные свойства FPs существенное влияние оказывают нековалентные взаимодействия между хромофором и боковыми цепями остатков микроокружения хромофора. Влияние микроокружения хромофора на его спектральные свойства подтверждено на мутантных формах GFP из *Aequorea* (Remington, 2000) и различных GFP-подобных белков из класса Anthozoa.

Микроокружение хромофора DsRed1 содержит много полярных аминокислот, сложную сеть водородных связей и солевых мостиков. Атом O остатка Tyr66 образует водородную связь с Ser148 (рис. 10, б), который является строго консервативным во всех FPs из Anthozoa, но отсутствует в CPs. По-видимому, взаимодействие между Ser148 и Tyr66 стабилизирует хромофор в состоянии, способном к флуоресценции. Генноинженерные исследования подтвердили, что Ser148 является ключевым остатком при взаимном переходе между FPs и CPs (Lukyanov et al., 2000; Bulina et al., 2002). Так, белок asCP из *Anemonia sulcata* с квантовым выходом менее 0.001 имеет в данном положении Ala, замена которого на Ser приводит к увеличению квантового выхода более чем в 2 раза.

Несмотря на близкое расположение остатков Ser203 и Tyr66 в DsRed1, они в противоположность остаткам Thr203 и Tyr66 в *Aequorea* GFP не образуют водородной связи (Ormö et al., 1996). Однако замены в положении

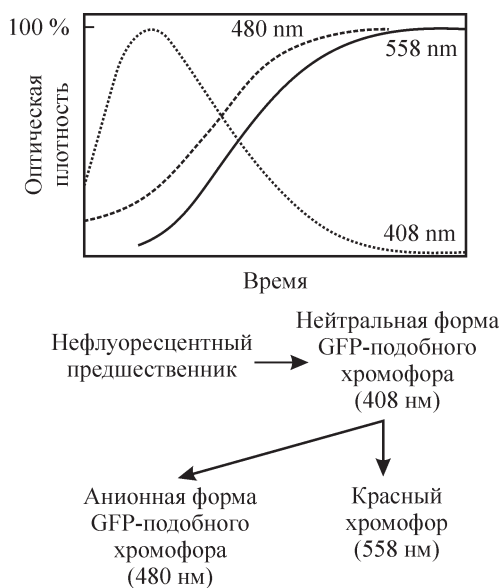


Рис. 11. Временная зависимость образования синей, зеленой и красной форм хромофора DsRed1 с максимумами поглощения при длинах волн 408, 480 и 558 нм соответственно (верхняя панель) и предложенная схема образования данных спектральных форм из предшественника, не обладающего флуоресцентными свойствами (нижняя панель) (по: Verkhusha et al., 2004, с изменениями).

203 приводят к существенным изменениям спектральных характеристик DsRed1. При замене Ser203 на Ala скорость созревания белка увеличивается (Tersikh et al., 2002). Замена Ser203 на Thr существенно увеличивает зеленую флуоресценцию в незрелом белке, в то время как замена Ser203 на Tyr частично подавляет зеленое излучение и увеличивает эффективность сворачивания белка (Verkhusha et al., 2001b).

Особого внимания заслуживает роль остатка в положении 165. В DsRed1 Ile165 расположен в плоскости хромофора, в непосредственной близости от фенольного кольца Tyr66 (рис. 10, б), такое же положение занимает и Phe165 в GFP (Ormö et al., 1996). Данные аминокислоты должны препятствовать *cis*—*trans*-изомеризации хромофора, которая, как полагают, является главной причиной безызлучательной дезактивации возбужденного состояния хромофора (Niwa et al., 1996; Weber et al., 1999). Действительно, во всех FPs в положении 165 локализованы массивные алифатические аминокислоты (Phe, Ile и Val), а в CPs — маленькие гидрофильные остатки (Asn или Ser). При помощи мутагенеза была подтверждена значимость подобных различий. Например, замена Ser165 на Val в asulCP привела к появлению заметной красной флуоресценции, в то время как замена Ile165 на Asn существенна для перевода DsRed1 в нефлуоресцентное состояние (Bulina et al., 2002).

Интересной особенностью DsRed1 является непосредственное взаимодействие атома O Tyr66 и положительно заряженного Lys167 (рис. 10, б). Ни один из известных FPs, включая близко гомологичный красный dis2RFP, не содержит Lys в этом положении. Случайный мутагенез DsRed1 показал, что флуоресцентные свойства белка сохраняются при замене Lys167 на Gln или на Met (Campbell et al., 2002). Однако в комбинации с заменами по положениям 148, 165 и 203 замена Lys167 на

Met приводит к значительному уменьшению квантового выхода белка. Таким образом, данный ионный контакт, по-видимому, не является определяющим в формировании флуоресцентных свойств, но, вероятно, обеспечивает дополнительную стабилизацию хромофора в ионизированном состоянии за счет взаимодействия с Tyr66.

На основании представленных выше данных был создан мутант DsRed-NF, который содержит четыре аминокислотные замены: Ser148 на Cys, Ile165 на Gln, Lys167 на Met и Ser203 на Ala (Bulina et al., 2002). DsRed-NF имеет высокий коэффициент экстинкции ( $57 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) и чрезвычайно низкий квантовый выход (менее 0.001). Данные спектральные характеристики позволяют рассматривать DsRed-NF как истинный хромопротеин. Компьютерное моделирование микроокружения хромофора DsRed-NF показало, что остатки Cys148 и Met167 в DsRed-NF в отличие от остатков Ser148 и Lys167 в DsRed не способны стабилизировать хромофор путем взаимодействия с Tyr66; кроме того, замена Ile165 на Gln приводит к образованию свободного пространства рядом с хромофором, которое, как полагают, достаточно для обеспечения его *cis*—*trans*-изомеризации после поглощения света. Таким образом, отсутствие стабилизирующего взаимодействия с Tyr66 наряду с наличием свободного пространства рядом с хромофором может объяснить чрезвычайно низкий квантовый выход флуоресценции DsRed-NF.

В микроокружение хромофора DsRed1 входят также Arg96, Lys69 и Glu222 (рис. 10, в). Остаток Arg96 присутствует во всех GFP-подобных белках и находится в непосредственной близости от кислорода имидазолинона. Возможно, Arg96 участвует в процессе циклизации при образовании хромофора. Эволюционно консервативный остаток Glu222 располагается ближе к хромофору в DsRed1, чем в GFP. Предполагают, что правильное расположение Glu222 играет важную роль при образовании красного хромофора (Yarbrough et al., 2001). Остаток Glu222 в DsRed1, кроме того, взаимодействует с молекулой воды, расположенной рядом с остатками Gln65 и с положительно заряженным Lys69. Во всех GFP-подобных белках Anthozoa в положении 69 находится либо Arg, либо Lys. По-видимому, положительный заряд этих остатков существен для правильной пространственной организации полипептидной цепи белка независимо от его спектральных свойств.

В DsRed1 рядом с дополнительной двойной связью  $C_{\alpha}=N$  остатка Gln65 расположен остаток Ser68, который, как полагают, участвует в образовании этой связи (рис. 10, а, з). Действительно, атом  $O_{\gamma}$  остатка Ser68 расположен над связью  $C_{\alpha}-N$  остатка Gln65 в положении, которое позволяет ему оттягивать протон (Yarbrough et al., 2001). Сравнение аминокислотных последовательностей GFP-подобных белков показало, что в белках с длинноволновыми спектрами флуоресценции в положении 68 находится остаток Ser. Замена Asn68 на Ser (совместно с заменой Ile112 на Ser) приводит к появлению в *dsrGFP* дополнительной красной полосы в спектре флуоресценции (Gurskaya et al., 2001). Желтый флуоресцентный белок *zoanYFP* в положении 68 содержит Asp, замена которого на Asn приводит к появлению дополнительной зеленой полосы флуоресценции (Gurskaya et al., 2001). Исключением из этого правила является группа недавно открытых природных «флуоресцентных таймеров», таких как *zoan2RFP*, *mcavRFP* и *rfloRFP*, спектральные свойства которых изменяются в процессе созре-

вания (от зеленой флуоресценции к красной или смешанной) (Labas et al., 2002). Несмотря на то что они содержат красный хромофор, в этих белках в положении 68 находится Asn, который характерен для большинства GFPs.

В DsRed1 с остатками Glu222, Gln65 и Ser68 взаимодействует остаток Asn42, который определяет их «правильное» расположение. Возможно, это объясняет существенное увеличение зеленой флуоресценции, связанное с заменой остатка Asn42 в DsRed1 (Wiehler et al., 2001).

Единичная замена Tyr121 на His в DsRed1 приводит к тому, что в спектре флуоресценции этого мутанта доминирующей становится полоса с максимумом при 500 нм и практически полностью исчезает полоса с максимумом при 580 нм (Wiehler et al., 2001). По-видимому, такая замена приводит к «неправильной» ориентации остатка Ser68, который в этом случае не может участвовать в процессе дегидрирования Gln65.

### Использование GFP-подобных белков в клеточной биологии

Главными преимуществами GFP-подобных белков при использовании их в качестве флуоресцентных маркеров являются их высокая стабильность и способность образования хромофора без необходимости добавления вспомогательных кофакторов. Кроме того, сшивка флуоресцентного белка с белком-мишенью редко оказывает влияние на функции последнего. GFP-подобные белки в большинстве случаев оказываются нетоксичными для клеток. Было показано, что GFP-подобные белки обладают высокой устойчивостью к действию многих протеаз (Chalfie et al., 1994), детергентов (Bokman, Ward, 1981; Ward, Bokman, 1982), органических и хаотропных солей, щелочных pH и температуры (Ward et al., 1982). В последующих разделах говорится об основных направлениях использования GFP-подобных белков в клеточной биологии, главных недостатках флуоресцентных белков, ограничивающих их применение, и способах преодоления данных ограничений.

Репортеры генной активации и белки слияния. Используя ген флуоресцентного белка (репортерный), находящийся под контролем промотора какого-либо конкретного гена, можно изучать уровень экспрессии этого гена и его белка в живых клетках и тканях, регистрируя интенсивность флуоресценции. Впервые в качестве репортерного гена был использован ген GFP из *Aequorea* (Chalfie et al., 1994). В дальнейшем GFPs были успешно использованы в клетках различных культур и организмов, таких как бактерии (Jakobs et al., 2000), дрожжи (Rodrigues et al., 2001), растения (Dietrich, Maiss, 2003), черви (Terskikh et al., 2000), насекомые (Verkhusha et al., 2001b; Nolan et al., 2002) и позвоночные (Terskikh et al., 2000; Werdien et al., 2001). Конструирование химерных белков (белков слияния) — Fp и клеточного белка — может быть выполнено с использованием стандартных методик клонирования. Экспрессия подобного химерного белка позволяет визуализировать динамику клеточных событий и наблюдать локализацию исследуемых белков.

Использование GFP-подобных белков в клеточной биологии весьма разнообразно. Иногда используют многоцветное мечение, вводя в клетку одновременно несколько цветных флуоресцентных белков (Hawley et al., 2001a,

2001b). Флуоресцентные белки могут служить репортерами генной активации (Moede et al., 2001; Yang, Hughes, 2001; Hakila et al., 2002), маркерами для изучения последовательности клеточных делений в процессе развития и отслеживания роста клеточных клонов, включая патогенные бактерии и раковые опухоли (Tersikh et al., 2000; Verkhusha et al., 2001b), маркерами локализации белков, органелл и вирусных частиц в живых клетках (Charpilienne et al., 2001; Engqvist-Goldstein et al., 2001; Nelson et al., 2002), маркерами популяций при изучении симбиоза (Bloemberg et al., 2000; Peloquin et al., 2002), маркерами бактерий при фагоцитозе (Maselli et al., 2002; Peloquin et al., 2002) и т. п.

Преимуществом использования красных FPs в качестве флуоресцентных маркеров для внутриклеточных белков является низкий уровень автофлуоресценции биологических тканей в красной области спектра. Кроме того, использование данных белков в дополнение к GFP из *Aequorea* и его мутантам расширяет возможности многоцветного мечения. Наличие в последовательности мРНК DsRed1 дикого типа скрытых интронов может приводить к частичному сплайсингу в клетках млекопитающих и вызывать преждевременную терминацию трансляции и, следовательно, образование неполноразмерного белка с более низкой интенсивностью флуоресценции. Данный недостаток легко преодолевается удалением предполагаемых скрытых сайтов сплайсинга, как в случае коммерческой версии DsRed1 (Clontech, США).

Многие GFP-подобные белки из Anthozoa, включая DsRed1, помимо тетрамеризации проявляют склонность к образованию агрегатов с большой молекулярной массой как *in vivo*, так и *in vitro* (Yanushevich et al., 2002). Агрегация белков имеет значительные последствия при использовании *in vivo* вследствие токсичного действия на клетки. Применение методов, основанных на переносе энергии по индуктивно-резонансному механизму (FRET — Forster resonance energy transfer), изучение межбелковых взаимодействий, наблюдение за отдельными клеточными компартментами невозможны в случае агрегации белка. Обычно агрегация FPs происходит при гетерологичной экспрессии FPs как в бактериальных клетках, так и в клетках эукариот.

Агрегацию можно наблюдать по появлению больших флуоресцентных гранул белка внутри трансфицированных клеток. При этом происходит «размывание» флуоресцентной картины, делающее недоступным для наблюдения ядро клетки. *In vitro* агрегация проявляется в осаждении очищенного белка. Причины агрегации белков в настоящее время мало изучены, нет четких представлений о возможных механизмах образования агрегатов.

Выяснению механизма агрегации в значительной степени содействуют данные о кристаллической структуре DsRed1. Так как не было замечено влияние агрегации на флуоресцентные свойства, предполагают, что агрегаты образуются зрелыми молекулами белка. Выделяют две общие для всех белков возможные причины агрегации. Первая причина — это взаимодействие «липких» гидрофобных участков на поверхности молекулы (Eaton, Hofrichter, 1990). Однако данные рентгеноструктурного анализа (Wall et al., 2000; Yarbrough et al., 2001) указывают на отсутствие четко выраженных гидрофобных областей на поверхности тетрамера DsRed1, которые могут привести к существенному взаимодействию между молекулами. Вторая возможная причина агрега-

ции — электростатические взаимодействия между положительно и отрицательно заряженными участками поверхности. Расчеты электростатического потенциала тетрамера DsRed1 показали, что поверхность белка заряжена отрицательно, за исключением коротких участков вблизи N-конца каждого мономера, образованных группой положительно заряженных аминокислотных остатков (Yanushevich et al., 2002). На основании этих данных предполагается, что каждый тетрамер способен к образованию до четырех солевых мостиков с другими тетрамерами, образуя «сеть» с полимероподобной структурой. Четыре валентности для электростатического взаимодействия обуславливают стабильность подобной структуры (Yanushevich et al., 2002).

Для решения проблемы агрегации DsRed1 был использован подход сайт-специфического мутагенеза, основанный на предположении о решающей роли в образовании агрегатов положительно заряженных остатков вблизи N-конца молекулы. Неагрегирующие мутанты DsRed1 предполагалось получить заменой остатков Arg и Lys на отрицательно заряженные или нейтральные остатки. Для мутагенеза был выбран не дикий тип DsRed1, а его мутант E57 (Val105Ala, Ile161Thr и Ser197Ala). Этот мутант отличается более быстрым созреванием, его красная флуоресценция появляется в 2 раза быстрее, чем у DsRed1 дикого типа (Tersikh et al., 2000). Одним из результатов этой работы стало получение тройного мутанта E57-NA с заменами Arg2 на Ala, Lys5 на Glu и Lys9 на Thr (nonaggregated) с минимальным уровнем агрегации как *in vivo*, так и *in vitro*. Флуоресцентные характеристики E57-NA (интенсивность флуоресценции, максимумы спектров возбуждения и флуоресценции) оказались очень близки к свойствам исходного белка E57, что делает перспективным его дальнейшее использование (Yanushevich et al., 2002). Снижение агрегации при замене от одного до трех положительно заряженных аминокислотных остатков в области N-конца на нейтральные или отрицательные (Yanushevich et al., 2002) было получено также и для других цветных белков (zFP538, zFP506 и amFP486) из кораллов Anthozoa. Это подтверждает предположение об электростатической природе взаимодействий, приводящих к агрегации в данных белках.

Олигомеризация является осложняющим фактором при использовании FPs в качестве партнеров для FRET, а также при получении химерных белков слияния, однако не мешает при применении FPs в качестве маркера генной экспрессии (Lauf et al., 2001; Fradkov et al., 2002). Тетрамерная природа многих GFP-подобных белков может привести к ошибочному определению локализации и функции меченых белков, так же как и их агрегации. Более того, агрегация многих белков, участвующих в передаче сигнала, приводит к их активации, поэтому «сшивки» данного белка с FPs из Anthozoa может вызывать конститутивную передачу сигнала. Для вариантов DsRed эта проблема была решена с помощью сайтнаправленного мутагенеза (Campbell et al., 2002). Была создана мономерная мутантная форма DsRed1 — mRFP1, которая содержит 33 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 неизвестно. Мутант mRFP1 обладает в 1.3 раза меньшим коэффициентом экстинкции и в 3.2 раза меньшим квантовым выходом, чем DsRed1, од-

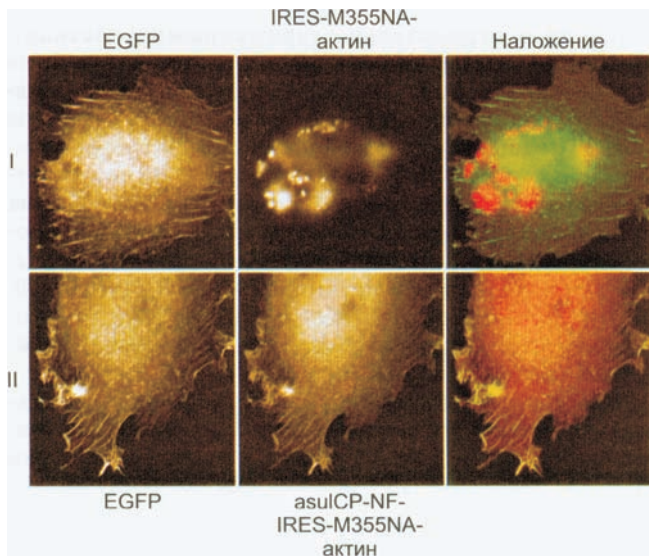


Рис. 12. Фибробласты линии L929, трансфицированные вектором, кодирующим EGFP— $\beta$ -актин и IRES—M355NA— $\beta$ -актин (I) или EGFP— $\beta$ -актин и asulCP-NF—IRES—M355NA— $\beta$ -актин (II). EGFP— $\beta$ -актин использовали в качестве положительного контроля для получения окрашенного цитоскелета (Bulina et al., 2003). Публикуется с любезного разрешения авторов.

нако скорость его созревания более чем в 10 раз выше, чем DsRed1. Недостатком mRFP1 является присутствие фракции белка, содержащего «зеленый» хромофор, что ограничивает применение данного белка в экспериментах с использованием FRET и в случае многоцветного мечения. Новые мономерные RFPs, такие как mOrange, mStrawberry, mCherry, mRaspberry и mPlum, обладают существенно улучшенными характеристиками созревания, яркости и фотостабильности (Shaner et al., 2004; Wang et al., 2004).

Существуют и другие подходы преодоления агрегации белков слияния, в состав которых входят FPs из Anthozoa. Одним из них является ковалентная сшивка «голова к хвосту» двух идентичных копий FPs, в результате чего образуется tandemный димер, что предотвращает агрегацию меченого белка. Этот подход был успешно применен для HcRed1 (Fradkov et al., 2002) и димерных мутантных форм DsRed1 (Campbell et al., 2002). Были протестированы аминокислотные участки разной длины, соединяющие две копии FPs в тандеме. Наилучшие результаты по показателям скорости образования хромофора и конечной интенсивности флуоресценции были получены для аминокислотных участков длиной 4 и 12 остатков для HcRed1 и димерных мутантных форм DsRed1 соответственно. Оба tandemных белка обладали такими же спектральными характеристиками, как и исходные белки. Сшивка tandemного HcRed1 с  $\beta$ -актином показала, что данная конструкция может быть использована при мечении структур цитоскелета *in vivo*. Конечные меченые образцы были неотличимы от полученных при применении широко используемых химерных конструкций, содержащих EGFP. Белок слияния tandemных димерных мутантов DsRed1 и коннексина 43 также правильно транспортировался к мембране и успешно формировал функциональные коннексиновые каналы, которые, однако, были не способны организовываться в большие щелевые контакты.

Другим способом преодолеть агрегацию является использование псевдомомерных форм тетрамерных флуоресцентных белков. Этот подход основан на одновременной коэкспрессии FP, сшитого с конкретным белком, и избыточного количества свободного FP или нефлуоресцентной мутантной формы данного FP (FP-хелпера). Конечные гетеротетрамеры флуоресцентного белка содержат единичный меченый полипептид и, следовательно, могут рассматриваться как псевдомомеры. Осуществимость данного метода была показана при использовании красного флуоресцентного мутанта asulCP — M355NA, сшитого с цитоплазматическим  $\beta$ -актином человека, а в качестве FP-хелпера выступал asulCP-Ala148Cys (Bulina et al., 2003). Фибробласты линии L929 были трансфицированы вектором, содержащим IRES-сайт (внутренний сайт посадки рибосом) для бицистронной экспрессии хелпера asulCP-Ala148Cys и M355NA—актин, или вектором, содержащим M355NA—актин под IRES-контролем, но не содержащим гена asulCP-Ala148Cys. Трансляция по Cap-зависимому механизму в несколько раз эффективнее экспрессии по IRES-зависимому механизму, поэтому в результате asulCP-Ala148Cys синтезируется в гораздо большем количестве, чем M355NA—актин. В случае экспрессии только M355NA—актина образовывалось большое количество цитоплазматических агрегатов, а образцы, полученные при коэкспрессии M355NA—актина с избыточным asulCP-Ala148Cys, были неотличимы от образцов, в которых в качестве метки использовали EGFP (рис. 12).

Флуоресцентные таймеры. Скорость созревания хромофора красных флуоресцентных белков дикого типа из класса Anthozoa (например, DsRed1) гораздо меньше скорости созревания GFP из *Aequorea*. Данное обстоятельство может быть использовано при изучении

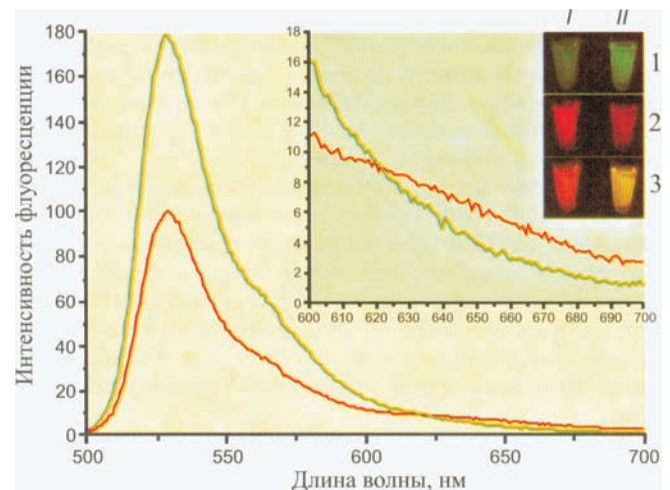


Рис. 13. Спектры флуоресценции белка слияния HcRed2A—HcRed2A—EYFP до (красная линия) и после (зеленая линия) расщепления фактором  $X_a$  (Fradkov et al., 2002).

Вставка более подробно показывает длинноволновую область спектра. На малой вставке в правом верхнем углу показаны фотографии образцов нерасщепленного (колонка I) и расщепленного (колонка II) белков слияния, полученные при помощи стереомикроскопии. Ряд 1 — возбуждение синим светом и регистрация в зеленой области спектра; ряд 2 — возбуждение синим светом и регистрация в красной области спектра; ряд 3 — наложение изображений 1 и 2. Увеличение интенсивности зеленого сигнала и одновременное уменьшение интенсивности красного сигнала вызваны уменьшением эффективности FRET при воздействии протеазой. Публикуется с любезного разрешения авторов.

хронологии процессов развития. При экспрессии гена DsRed1 и гена GFP (или EGFP) с использованием одного и того же промотора красная флуоресценция регистрируется на 18—20 ч 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., 2001b).

Так как созревание хромофора DsRed1 проходит через стадию образования GFP-подобного хромофора, эту временную зеленую флуоресценцию можно использовать без необходимости коэкспрессии GFP из *Aequorea*. Как уже упоминалось, при созревании некоторых Anthozoa RFPs, таких как zoan2RFP, mcavRFP, rfloRFP (Labas et al., 2002), и мутанта DsRed-E5 (Terskikh et al., 2000) происходит изменение спектральных свойств. При этом DsRed-E5 и zoan2RFP могут рассматриваться как абсолютные флуоресцентные таймеры, поскольку на ранних стадиях созревания они флуоресцируют в зеленой области спектра, а в полностью созревшем состоянии — в красной. В противоположность им спектр флуоресценции mcavRFP и rfloRFP в созревшем состоянии содержит и зеленый, и красный пики.

Экспрессия DsRed-E5 и zoan2RFP может дать точную информацию об активации и ингибировании промоторов соответствующих генов. Теоретически появление зеленой флуоресценции показывает, что активация промотора произошла недавно, желто-оранжевая флуоресценция означает длительную активность, а красная указывает на прекращение активности промотора.

Мутантную форму DsRed, обладающую свойствами флуоресцентного таймера, использовали при изучении активности гена *Otx-2* в *Xenopus laevis*. Для этого в эмбрионы *X. laevis* вводили микроинъекцией плазмиду, содержащую ген флуоресцентного таймера под контролем промотора *Otx-2*. Было показано, что экспрессия гена *Otx-2* на начальных этапах развития наблюдается в области конечного мозга и в вентральном отделе промежуточного мозга. На стадии головастика активность гена *Otx-2* в этих областях практически полностью подавляется, но наблюдается высокий уровень экспрессии в мезэнцефальной области мозга (Ermaikova et al., 1999).

Изучение диффузии и транспорта белков, органелл и клеток. *Aequorea* GFP и большинство Anthozoa FPs могут быть необратимо обесцвечены при облучении интенсивным светом в максимуме поглощения данных белков в течение длительного времени (обычно 10—10<sup>3</sup> с). Кинетика обесцвечивания Anthozoa RFPs более сложная, чем кинетика обесцвечивания *Aequorea* EGFP, возможно из-за более сложной структуры хромофора или из-за наличия нескольких форм белка. DsRed1 и его мутантные формы, включая мономерный mRFP1, характеризуются двухэкспоненциальной кинетикой обесцвечивания, в то время как EGFP — моноэкспоненциальной. Такое пространственно ограниченное фотодинамическое повреждение хромофоров может использоваться для изучения внутриклеточной подвижности белков и органелл (Lippincott-Schwartz et al., 2001), меченных FPs, методами восстановления флуоресценции после обесцвечивания (fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) и затухания флуоресценции при фотообесцвечивании (fluorescence loss in photobleaching, FLIP).

Фотообесцвечивание Anthozoa RFPs и YFPs, которые содержат по крайней мере два различных вида хро-

мофоров (зеленый и красный/зеленый и желтый) (Baird et al., 2000; Terskikh et al., 2000; Verkhusha et al., 2001b; Yarbrough et al., 2001), может приводить к изменению спектральных характеристик белков. В тетрамере флуоресцентного белка, состоящего из мономеров с хромофорами обоих типов, зеленая флуоресценция подавлена вследствие наличия высокоэффективного переноса энергии от зеленого хромофора к красному (желтому) хромофору. Избирательное обесцвечивание красного (желтого) хромофора приводит к увеличению интенсивности зеленой флуоресценции. При использовании DsRed1 для мечения внутриклеточных структур и целых клеток изменение интенсивности зеленой флуоресценции по отношению к красной флуоресценции составляло  $1.2 \cdot 10^2$ — $2.0 \cdot 10^2$  в клетках HEK293 и CHO-K1, причем это изменение спектральных свойств DsRed1 сохранялось и более чем через 30 ч после обесцвечивания (Marchant et al., 2001). Данный вид фотоконверсии может быть использован для избирательного оптического мечения отдельных клеток, органелл и белков при изучении последовательности клеточных делений, динамики внутриклеточных органелл и белкового транспорта.

Облучение некоторых Anthozoa RFPs светом высокой интенсивности в красной области поглощения может привести к фотоконверсии красного хромофора в формы со спектрами, сдвинутыми в синюю и дальнюю красную области. Облучение растворенного или иммобилизованного DsRed1 интенсивным светом с длиной волны 532 нм в течение 14 ч приводит к уменьшению пика поглощения при 558 нм и его сдвигу к 574 нм; кроме того, появляется новый пик поглощения при 386 нм (Cotlet et al., 2001), по амплитуде составляющий примерно 25 % от амплитуды первоначального пика при 558 нм. При этом полоса поглощения, обусловленная зеленым хромофором (максимум при 475 нм), не изменяется ни по интенсивности, ни по положению. Спектр флуоресценции DsRed1, подвергнутого фотоконверсии, при возбуждении на длине волны 390 нм имеет максимум при 500 нм (который объясняется наличием безызлучательного переноса энергии между голубым и зеленым хромофорами) и ярко выраженное плечо при 450 нм (50 % от амплитуды максимума); при возбуждении на длине волны 570 нм максимум флуоресценции DsRed1 находится около 595 нм. После выдерживания фотомодифицированного белка в темноте в течение 24 ч изменения спектра поглощения и излучения не наблюдали. Данный вид фотоконверсии вряд ли может быть применим в клеточной биологии, он может быть использован в биотехнологии для мечения DsRed1-содержащих иммобилизованных структур спектрально различимой синей флуоресценцией (Cotler et al., 2001).

Белки FFPs и PAFPs дают уникальную возможность пространственно-временного мечения и наблюдения за живыми клетками, органеллами и молекулами внутри клетки. Возможно, наиболее важной областью применения PAFPs является мечение белков. Используя PAFP-меченные белки и облучая определенную область внутри клетки излучением определенной длины волны и интенсивности, индуцируют фотохимические изменения хромофора (переход PAFP из нефлуоресцентного во флуоресцентное состояние или изменение цвета флуоресценции). Далее можно отслеживать судьбу меченого белка с помощью конфокальной микроскопии (Patterson, Lippincott-Schwartz, 2004). Например, при помощи белка слияния PA-GFP— $\alpha$ -тубулин изучали движение микро-

трубочек и включение их в митотическое веретено (Tulu et al., 2003). Молекулы ДНК и РНК также могут быть помечены PAFPs. Данный тип мечения включает взаимодействие белка слияния специфического ДНК(РНК)-связывающего домена с PAFP и соответствующей нуклеотидной последовательности, которая может быть введена в исследуемую молекулу ДНК или РНК (Shav-Tal et al., 2004). В отличие от необратимо фотоактивируемых проб, обратимо фотореактивируемые KFP1 и Dronpa допускают многократную или последовательную фотоактивацию. Используя белок слияния Dronpa—ERK1 и многократные акты фотоактивации и тушения сигнала флуоресценции в ядре и цитоплазме отдельной клетки, изучали транспорт в ядро и из ядра киназы ERK1 в ответ на стимуляцию клетки (Ando et al., 2004).

Различные клеточные органеллы могут быть мечены PAFPs с помощью пришивки к PAFP полипептидного сигнала локализации или белка, имеющего соответствующую локализацию. PAFPs использовали для изучения эндоцитоза (Chudakov et al., 2004), экзоцитоза и фагоцитоза (Lee et al., 2005), образования и распада клеточных органелл (Chudakov et al., 2003a; Jakobs et al., 2003; Arimura et al., 2004; Karbowski et al., 2004; Lee et al., 2005) и наблюдения за обменом содержимого органелл (Patterson, Lippincott-Schwartz, 2002; Chudakov et al., 2004; Verkhusha, Sorkin, 2005).

С использованием KFP1 изучали эмбриональное развитие *Xenopus laevis*, вводя мРНК фотоактивируемого белка в клетку микроинъекцией (Chudakov et al., 2003a). Мечение клеток PAFPs может использоваться для изучения не только эмбриогенеза, но и, например, для наблюдения за образованием метастазов и формированием опухоли, миграцией небольших паразитов внутри хозяина и реакциями таксиса небольших одноклеточных организмов (Lukyanov et al., 2005).

### Биосенсоры на основе GFP-подобных белков

Были созданы многочисленные мутантные формы GFP из *Aequorea* и его «улучшенных» вариантов, которые представляют собой генетически кодируемые биосенсоры различных внутриклеточных процессов. Флуоресцентные свойства этих белков зависят от pH окружающей среды, окислительно-восстановительного потенциала клетки и концентрации ионов металлов. Широко применяются FRET-биосенсоры, цвет флуоресценции которых изменяется в ответ на различные физиологические и биохимические сигналы.

В химерных конструкциях GFP-подобных белков с множеством самых различных исследуемых белков FP был пришит к С- или N-концу исследуемого белка. В нескольких случаях FP был вставлен в исследуемый пептид без значительных перестроек структуры самого FP. Однако для создания биосенсоров весьма перспективны введение значительных изменений в структуру флуоресцентного белка, а именно вставка внешнего белка в FP в положение, близкое к хромофору, и создание белков слияния исследуемых белков и так называемых циркулярно измененных (circular-permuted) FPs (cpFPs).

FRET-биосенсоры. Перенос энергии по индуктивно-резонансному механизму, при котором передача энергии от молекулы донора к молекуле акцептора происходит безызлучательно посредством диполь-дипольного взаимодействия, недавно стал широко использо-

ваться в клеточной биологии для регистрации белок-белкового взаимодействия. Эффективность FRET зависит от степени перекрытия спектров испускания донора и поглощения акцептора, расстояния между ними (эффективность переноса зависит от расстояния между донором и акцептором как  $1/R^6$ ) и относительной ориентации диполей перехода хромофоров (Lakowicz, 1983). Таким образом, с помощью FRET можно регистрировать любые биохимические сигналы, изменяющие взаимную ориентацию диполей перехода хромофоров или расстояние между ними (Tsien, 1998; Zimmer, 2002). FRET можно детектировать, регистрируя сенсibilизированную флуоресценцию акцептора, уменьшение времени жизни возбужденного состояния донора или увеличение устойчивости к обесцвечиванию донора. В течение долгого времени использование FRET было ограничено белками, которые возможно было пометить антителами, гормонами или другими лигандами, связанными с подходящими парами красителей или элементами группы лантанидов. Создание улучшенных мутантов GFP из *Aequorea* с различными спектральными свойствами (EBFP, ECFP и EYFP) позволило генетически вводить в клетки белки слияния, обладающие собственной флуоресценцией, которые сохраняют локализацию и функции исследуемых белков. Первыми широко применяющимися парами для FRET были EBFP—EGFP и ECFP—EYFP (донор—акцептор). Несмотря на то что использование этих пар донора и акцептора оказалось эффективным, существует несколько значительных недостатков, а именно низкий квантовый выход EBFP и ECFP, низкая флоростабильность EBFP, одновременное возбуждение акцептора EYFP в области поглощения донора ECFP и паразитическая эмиссия донора в области флуоресценции акцептора (Selvin, 2000). Клонирование YFP и RFPs из *Anthozoa* позволило использовать две независимые пары донор—акцептор одновременно в одной клетке, что привело к увеличению чувствительности и информативности анализа.

Был рассчитан Фёрстеровский радиус (расстояние между донором и акцептором, при котором эффективность переноса энергии составляет 50 %) для различных пар донор—акцептор. Расчет проводился в условиях случайной ориентации хромофоров. Наибольшее значение данного параметра имеет для пар EGFP/DsRed1, sapphire-GFP/DsRed1 и EYFP/DsRed1 и составляет 4.73, 4.90 и 4.94 нм соответственно (Patterson et al., 2000). Данные величины близки к значению радиуса Фёрстера для наилучшей пары донор—акцептор ECFP—EYFP (4.92 нм), что наряду с длинноволновыми спектрами флуоресценции мутантов DsRed облегчает регистрацию сенсibilизированного излучения от вышеупомянутых и других зеленых и желтых доноров. Действительно, когда красные мономеры, входящие в состав тетрамера DsRed1, были подвергнуты фотообесцвечиванию в клетках HeLa, интенсивность флуоресценции от зеленых мономеров увеличилась в 2.7—5.6 раза, что соответствует эффективности переноса энергии между зелеными и красными мономерами около 68—83 % (Baird et al., 2000). Эта величина равна или даже превосходит наибольшее зарегистрированное значение эффективности переноса энергии (68 %) для ECFP и EYFP, сшитых с мотивом «цинковый палец» (Miyawaki, Tsien, 2000).

Существуют два ограничения использования RFPs в качестве FRET-партнера — их тетрамерная организация и широкие спектры поглощения, перекрывающиеся со

спектрами возбуждения зеленых доноров. В настоящее время обе проблемы решены. Первая — с помощью использования в качестве акцептора тандемных димерных конструкций DsRed1 и HcRed1 (Campbell et al., 2002; Fradkov et al., 2002), вторая — с помощью использования трех вышеупомянутых мутантных форм *Aequorea* GFP (EGFP, sapphire-GFP и EYFP). Sapphire-GFP относится к классу мутантных форм GFP, содержащих нейтральную форму хромофора. Как предполагают, в возбужденном состоянии хромофор ионизирован (депротонирован), что объясняет большой Stokes сдвиг излучения (максимум поглощения — 399 нм, максимум флуоресценции — 511 нм). Таким образом, использование sapphire-GFP решает проблему нежелательного возбуждения акцептора в области поглощения донора.

Преимущество sapphire-GFP как FRET-партнера для DsRed1 было показано на так называемых хамелеонах. «Хамелеоны» представляют собой генетически кодируемые индикаторы кальция, в состав которых входят последовательно сшитые FP1-донор, кальмодулин, кальмодулинсвязывающий домен (M13) и FP2-акцептор (Miyawaki et al., 1997, 1998). В отсутствие кальция донор и акцептор удалены друг от друга; при связывании кальция кальмодулин взаимодействует с M13, что вызывает пространственное сближение FP1 и FP2, а следовательно, увеличение эффективности FRET. Максимальное изменение интенсивности флуоресценции DsRed1 (акцептора) по отношению к интенсивности флуоресценции донора в клетках HeLa при стимуляции 10 мкМ гистамина составило 1.10, 1.25, и 1.28 для «хамелеонов», в качестве донора в которых использовали ECFP, EYFP и sapphire-GFP соответственно (Mizuno et al., 2001). В случае изменения концентрации кальция при деполяризации нейронов в гиппокампальной формации (имеет особое значение на ранних стадиях обучения и условнорефлекторной деятельности) увеличение флуоресценции акцептора по отношению к донору составляет 1.32 и 1.26 для «хамелеонов» с EYFP и sapphire-GFP в качестве доноров соответственно. При изучении белок-белкового взаимодействия в клетках растения *Arabidopsis* методом FRET было показано, что EGFP является приемлемым донором для RFPs. При взаимодействии белков слияния фитохрома B-EGFP и криптохрома 2—DsRed1 в ядре наблюдали сенсублизованную флуоресценцию от DsRed1 (Mas et al., 2000).

Была показана потенциальная возможность использования тандемных RFPs в качестве акцептора для FP-доноров, таких как EYFP (Fradkov et al., 2002). Использовали простую модельную систему, которая представляет собой fusion-конструкцию, состоящую из последовательно сшитых EYFP и t-HcRed1 (тандемный белок) и сайта расщепления для фактора  $X_a$  (сериновая протеаза) между вторым номером HcRed1 и EYFP. При инкубации очищенного белка слияния с фактором  $X_a$  наблюдали постепенное увеличение интенсивности желтой флуоресценции на длине волны 528 нм и одновременное уменьшение интенсивности красной флуоресценции на длине волны 650 нм (рис. 13). Расщепление белка слияния приводит к увеличению на 80 % желтого излучения и уменьшению на 30 % красного. Отношение интенсивности флуоресценции донора к интенсивности флуоресценции акцептора изменяется в 2.6 раза, что сравнимо с эффективностью FRET для других широко используемых пар GFP-подобных белков (Miyawaki et al., 1997). Таким образом, t-HcRed1 может использоваться в FRET-анализе

для изучения активности протеаз *in vivo*, белок-белкового взаимодействия и создания внутриклеточных биосенсоров. Следует подчеркнуть преимущество использования тандемных димерных мутантов RFP в качестве акцепторов над мономерным mRFP1, который содержит определенную долю молекул с «зеленым» хромофором, в случае когда в качестве FRET-партнеров выступают мутанты GFP из *Aequorea* (Campbell et al., 2002). Тандемные конструкции нефлуоресцентных мутантных форм FPs из Anthozoa и хромопротеины, такие как DsRed-NF и asulCP-Ala148Cys (Bulina et al., 2002), могут быть использованы как эффективные тушители флуоресценции.

Кроме GFP-подобных белков подходящими донорами для FRET, BRET (перенос энергии от биолюминесцентного донора) и LRET (перенос энергии от люминесцентного донора) являются органические красители, люциферазы (Wilson, Hastings, 1998) и лантаниды (Weiss, 1999) соответственно, так как спектры излучения этих веществ перекрываются со спектрами поглощения RFPs из Anthozoa. Из красителей в качестве доноров могут использоваться производные флуоресцеина (Griffin et al., 1998; Zlokarnik et al., 1998), флуоресцирующие в зеленой области спектра. Использование желтых и оранжевых красителей с большим Stokes сдвигом и высоким квантовым выходом, таких как SYPRO Оранжевый (максимум поглощения 480 нм, максимум излучения 568 нм), R-фикоэритрин (максимум поглощения 480 нм, максимум излучения 578 нм) и AttoPhos (максимум поглощения 440 нм, максимум излучения 555 нм), будет способствовать уменьшению прямого возбуждения акцептора и обеспечит относительно большие значения величины Фёрстеровского радиуса. Метод FRET может быть неприменим в фоточувствительных тканях (например, в сетчатке глаза) или тканях, которые повреждаются светом, возбуждающим флуоресценцию донора. В случае использования BRET отсутствуют и нежелательные следствия возбуждения флуоресценции, и прямое возбуждение акцептора. Однако BRET имеет и недостатки, например необходимость добавления кофакторов (люциферин) в силу химической природы биолюминесценции. Были описаны случаи использования в качестве донора люциферазы из *Renilla* (Xu et al., 1999), излучающей в синей области спектра с максимумом при длине волны 480 нм, и в качестве акцептора мутантов GFP из *Aequorea* (например, EYFP). Предполагается, что люциферазы насекомых с максимумами излучения при 550—575 нм могут быть подходящими донорами для RFPs из Anthozoa. Лантаниды представляют собой люминесцентные элементы, которые в связанном с подходящим хелатным соединением состоянии обладают высоким квантовым выходом, спектром излучения с многочисленными пиками в зеленой и красной областях спектра и большим временем жизни возбужденного состояния (миллисекунды). Метод LRET с использованием тербия и европия в качестве доноров широко применяется для изучения конформационных переходов белков и в высокопроизводительном скрининге (Selvin, 2000).

Биосенсоры на основе модификации хромофора. Флуоресцентные свойства GFP дикого типа из *Aequorea* и многих его мутантов зависят от уровня pH. В слабощелочных растворах (pH 8.0) максимумы возбуждения для GFP находятся при 395 и 475 нм, а максимумы флуоресценции — при 509 и 508 нм соответственно. При высоких значениях pH (10.0—12.2) интенсив-

ность флуоресценции нативного GFP резко возрастает, при этом наблюдается большой сдвиг спектра поглощения и возбуждения флуоресценции. Максимум при 395 нм уменьшается по интенсивности, а амплитуда пика поглощения при 475 нм увеличивается в 3 раза (Ward, Bokman, 1982). Такой рН-зависимый сдвиг спектров поглощения и возбуждения флуоресценции в экстремально щелочном диапазоне рН может быть результатом ионизации Туг66 в хромофоре и(или) депротонирования Arg96, который стабилизирует енольную форму имидазолидона хромофора. В кислом растворе (рН 4—6) наблюдается тушение флуоресценции с  $pK_a$ , равной примерно 4.5 (рН, при котором интенсивность флуоресценции уменьшается на 50 % от начальной величины). Несмотря на многочисленные работы в этой области, механизм такого рН-зависимого тушения флуоресценции не был установлен. Поскольку флуоресцентный ответ GFP на изменения кислотности среды происходит быстро и обратимо, было предложено использовать этот белок в качестве неинвазивного индикатора внутриклеточного рН, в тех случаях когда традиционные синтетические рН-индикаторы не подходят (Robey et al., 1998; Elsliger et al., 1999; Yuste et al., 2000). Некоторые мутанты GFP из *Aequorea* с улучшенными спектральными свойствами еще более чувствительны к изменениям рН, чем белок дикого типа: EGFP затушен на 50 % при рН 5.5. EYFP имеет значение  $pK_a$  равное 7.1, и был успешно использован для измерения рН цитоплазмы и аппарата Гольджи. Для измерения рН органелл с более кислыми средами следует использовать EGFP или GFP дикого типа, так как EYFP при данных значениях рН практически не флуоресцирует. EGFP обладает меньшей рН-чувствительностью по сравнению с EGFP или EYFP и редко используется в такого рода измерениях.

С помощью сайтнаправленного мутагенеза GFP из *Aequorea* были созданы различные рН-чувствительные мутантные формы, используемые в качестве индикаторов рН (Yuste et al., 2000). Существуют два типа индикаторов рН — ратиометрические и эклиптические. В случае ратиометрических индикаторов понижение рН приводит к изменению отношения интенсивностей флуоресценции при возбуждении на длинах волн 395 и 475 нм. Пик возбуждения при 475 нм эклиптических индикаторов при рН ниже 6.0 становится нефлуоресцентным (исчезает). В обоих случаях изменения спектральных свойств индикаторов обратимы.

Было предложено использовать эклиптические индикаторы рН (рН-луорины) для изучения пресинаптической активности в нервных тканях (Sankaranarayanan et al., 2000). Для этого был создан белок слияния эклиптического рН-луорина с белком VAMP (белком мембраны синаптических везикул), причем в этой конструкции эклиптический рН-луорин пришит к люминальному домену VAMP, т. е. при встраивании белка слияния в мембрану везикулы эклиптический рН-индикатор будет находиться во внутреннем пространстве везикулы. Синаптические везикулы представляют собой специализированные эндосомы, в которых поддерживается рН 5.6. При таких условиях эклиптический рН-луорин полностью затушен. При действии электрического потенциала при передаче нервного импульса синаптические везикулы сливаются с мембраной нервной клетки для выброса нейромедиатора в синаптическую щель, в результате чего значение рН на люминальной стороне мембраны везикулы становится щелочным (рН 7.4), что в свою очередь приводит к пере-

ходу рН-луорина во флуоресцентное состояние. Последующий эндоцитоз везикул и закисление внутривезикулярного пространства снова вызывают тушение флуоресценции. Таким образом, изменение интенсивности флуоресценции во время действия потенциала отражает соотношение доли экстернализованных на поверхности плазматической мембраны молекул рН-луорина, являющихся флуоресцентными, и доли молекул рН-луорина, находящихся внутри синаптических везикул, являющихся полностью затушенными (Sankaranarayanan et al., 2000).

Недавно были сконструированы мутанты GFP, спектральные характеристики которых зависят от рН среды (Hanson et al., 2002). Этот новый класс белков, названный deGFPs, был получен путем замещения 65-го остатка треонином и 148-го и(или) 203-го остатков цистеином. Эти белки имеют  $pK$  от 6.8 до 8.0. При закислении раствора соотношение интенсивностей флуоресценции при 515 (зеленая флуоресценция) и 460 (голубая флуоресценция) им изменяется. Для этих белков была определена пространственная структура при высоких и низких значениях рН. При низких значениях рН структура не имеет гидрофобных связей, которые способствовали бы быстрой дезактивации возбужденного состояния посредством переноса протона. Вследствие этого наблюдается голубая флуоресценция. При высоких значениях рН изменение структуры приводит к возникновению системы водородных связей, вследствие чего протон от нейтральной формы хромофора в возбужденном состоянии через Ser147 и молекулы связанной воды переходит в растворитель, вследствие чего возникает зеленая флуоресценция анионной формы хромофора (Hanson et al., 2002).

Индикаторы на основе модификации поверхности  $\beta$ -бочонка. Дикий тип GFP из *Aequorea* обладает сильным сродством к ионам  $Cu^{2+}$ , меньшим — к ионам  $Ni^{2+}$  и слабо взаимодействует с ионами  $Zn^{2+}$  и  $Co^{2+}$  (Li et al., 2001). GFP содержит 10 остатков гистидина, из которых His77, His81 и His231 находятся на расстоянии не более 7.5 Å друг от друга, вследствие чего было сделано предположение о том, что они могут служить возможными сайтами связывания ионов металлов.

Известно, что ионы металлов в непосредственной близости от хромофора вызывают тушение флуоресценции, поэтому были созданы две мутантные формы GFP с повышенным сродством к ионам металлов, которые могут служить индикаторами ионов металлов *in vivo* (Richmond et al., 2000). Для мутагенеза использовали белок 10C, содержащий замены Thr203 на Tyr, Ser54 на Gly, Val68 на Leu и Ser72 на Ala. Один из мутантных белков содержит сайт связывания ионов металлов, образованный двумя остатками гистидина (введены замены Ser147 на His и Gln204 на His), сайт связывания второго мутантного белка образован тремя аминокислотами (введены замены Ser147 на His, Gln204 на His и Ser202 на Asp). Тушение флуоресценции обоих мутантов происходило при гораздо меньшей концентрации металлов (меди, кобальта и никеля), чем тушение флуоресценции белка 10C (Richmond et al., 2000).

Недавно были созданы так называемые roGFPs, которые позволяют измерять окислительно-восстановительный потенциал клетки (Hanson et al., 2004). Данные белки содержат замены в положениях 147 и 204 или 149 и 202, которые расположены близко к хромофору на соседних  $\beta$ -ветвях, на остаток Cys. Образование дисульфидной связи между этими остатками вызывает структурные изменения в микроокружении хромофора и спо-

собствует депротонированию хромофора, в результате чего увеличивается интенсивность пика возбуждения при 400 нм и уменьшается интенсивность пика возбуждения при 490 нм. Отношение интенсивностей флуоресценции при возбуждении на длинах волн 400 и 490 нм показывает долю окисленного *roGFP* и, таким образом, окислительно-восстановительный статус клетки. Белок *roGFP1* использовали для определения окислительно-восстановительного потенциала митохондрий клеток культуры HeLa (Hanson et al., 2004). Белки данного класса могут быть использованы для изучения многочисленных клеточных функций, которые зависят от окислительно-восстановительного равновесия в клетке, таких как пролиферация, дифференцировка, миграция клеток, ответы на стресс, иммунные ответы, транскрипция генов и т. д. (Dooley et al., 2004).

Биосенсоры на основе существенных перестроек структуры GFP-подобных белков. Как уже было сказано, созревание GFP-подобных белков является сложным процессом, который включает в себя помимо сворачивания аминокислотной последовательности в нативную структуру образование хромофора. Зрелый GFP-подобный белок представляет собой высококомпактную жесткую структуру, которая, как полагают, не будет устойчивой к значительным перестройкам структуры или вставкам других белков. Тем не менее было показано, что вставка пептида длиной от нескольких аминокислот до полноразмерного белка внутрь последовательности GFP-подобного белка возможна (Heinemann, Nahn, 1995; Baird et al., 1999). GFP из *Aequorea* устойчив к вставке белков в несколько положений без потери флуоресцентных свойств (Abedi et al., 1998). В случае вставки рецептора в FP изменение конформации при связывании лиганда может приводить к модификации флуоресцентных свойств FP. Таким образом, вставка рецептора в FP может служить новым приемом конструирования генетически кодируемых индикаторов важных биохимических и физиологических сигналов (Baird et al., 1999). Вставка кальмодулина в положение 145 в ECFP, EGFP или EYFP привела к образованию белков слияния, которые сохранили флуоресцентные свойства и приобрели чувствительность к ионам  $Ca^{2+}$  (Baird et al., 1999). Из них EYFP—кальмодулин обладает наибольшей чувствительностью к кальцию. При pH 7.5 и в отсутствие ионов  $Ca^{2+}$  спектр поглощения данного белка содержит полосу поглощения с максимумом при 400 нм и небольшое плечо при 490 нм. Это свидетельствует о том, что хромофор EYFP находится преимущественно в протонированном состоянии. В присутствии ионов  $Ca^{2+}$  при тех же значениях pH значительно увеличивается пик поглощения при 490 нм при одновременном уменьшении пика с максимумом при 400 нм. Это обусловлено тем, что связывание  $Ca^{2+}$  с кальмодулином вызывает депротонирование хромофора. Спектры возбуждения флуоресценции белка слияния EYFP—кальмодулин в отсутствие и при высокой концентрации ионов  $Ca^{2+}$  содержат только пик при 490 нм, что согласуется с данными, согласно которым молекулы EYFP, содержащие хромофор в протонированном состоянии, не флуоресцируют. В обоих случаях при регистрации спектров возбуждения флуоресценции и спектров флуоресценции при насыщении кальмодулина ионами  $Ca^{2+}$  происходило увеличение амплитуды пиков возбуждения или флуоресценции примерно в 7 раз без изменения положения соответствующего максимума. В случае вставки в положение 145

EYFP мотива «цинковый палец» при связывании ионов  $Zn^{2+}$  происходило увеличение интенсивности флуоресценции в 1.7 раза без изменения положения максимума флуоресценции (Baird et al., 1999).

Другой способ введения исследуемых белков в различные положения FP основан на конструировании *srFPs*, в которых старые С- и N-концы соединены подвижным линкером и введены новые С- и N-концы в другое положение. Циркулярная пермутация, как известно, допустима в тех случаях, когда С- и N-концы белка расположены достаточно близко друг к другу, что соблюдается для GFP-подобных белков. Если белок состоит из нескольких автономных доменов, связанных подвижными линкерами, нетрудно представить, что перестановка этих доменов не приведет к нарушению функций белка. Однако сохранение функциональной активности при подобных перестройках в GFPs с их однодоменной цилиндрической структурой, жесткой антипараллельной упаковкой  $\beta$ -слоев в  $\beta$ -бочонке и сложным процессом созревания представлялось маловероятным. Тем не менее было показано, что столь значительное преобразование первичной структуры GFP-подобных белков, как циркулярная пермутация, не нарушает их способности правильно сворачиваться и образовывать внутренний хромофор. Были созданы циркулярно измененные формы GFP из *Aequorea* и его мутантов — *srEGFP*, *srEYFP* и *srECFP* (Baird et al., 1999). Белок *srGFP* не теряет флуоресцентных свойств при введении новых С- и N-концов в положениях Glu142, Tyr143, Tyr145, His148, Asp155, His169, Glu172, Asp173, Ala227 и Ile229.

На основании *srEYFP* были созданы так называемые перикамы (*pericams*) — химерные молекулы, содержащие кальмодулин и *srEYFP* и служащие индикаторами  $Ca^{2+}$  (Nagai et al., 2001). В *srEYFP* старые N- и С-концы соединены пентапептидом GlyGlySerGlyGly, а новые N- и С-концы образованы в положениях 145 и 144 соответственно. В перикамах к N-концу *srEYFP* пришит M13, а к С-концу — кальмодулин. В ответ на увеличение концентрации ионов  $Ca^{2+}$  изменяются спектральные свойства перикамов, возможно за счет того, что взаимодействие M13 и кальмодулина при связывании последним  $Ca^{2+}$  приводит к изменению микроокружения хромофора. С помощью аминокислотных замен в микроокружении хромофора были созданы три типа перикамов. Первый из них, «вспыхивающие перикамы» (*flash-pericam*), характеризуется при связывании  $Ca^{2+}$  увеличением интенсивности флуоресценции на длине волны 520 нм в 8 раз. Второй класс перикамов («рatiометрические перикамы») имеет спектры возбуждения, содержащие два максимума — на длинах волн 415 и 494 нм. В присутствии  $Ca^{2+}$  отношение интенсивностей флуоресценции при возбуждении на длинах волн 415 и 494 нм изменяется примерно в 10 раз. Третий класс перикамов («кинверсные») в противоположность «вспыхивающим» в присутствии ионов  $Ca^{2+}$  характеризуется уменьшением интенсивности флуоресценции примерно на 15%. Экспрессия всех трех видов перикамов в клетках HeLa позволила измерить изменение концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в цитоплазме и ядре. Концентрацию ионов  $Ca^{2+}$  в митохондриях и ядре измеряли с помощью ратиометрических перикамов, имеющих соответствующий сигнал локализации (Nagai et al., 2001).

На рис. 14 показаны возможные способы сшивки GFP или *srGFP* и внешнего белка. Так как возможно введение новых N- и С-концов в нескольких положениях, пространственная ориентация пришиваемого белка по

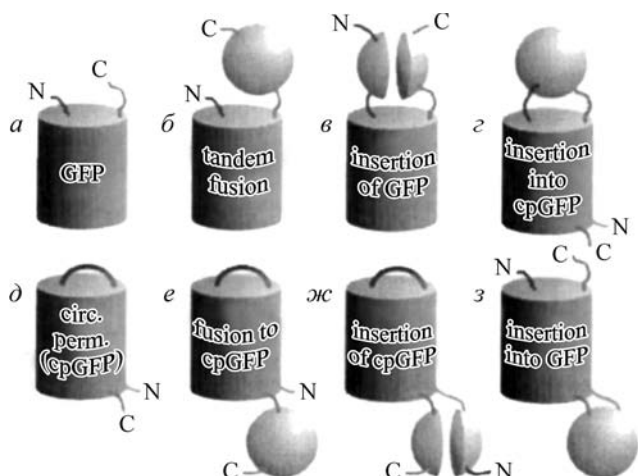


Рис. 14. Возможная топология зеленого флуоресцентного белка (GFP), циркулярно измененного GFP (cpGFP) и белков слияния с внешними белками (сферы или две полусферы) на их основе (по: Baird et al., 1999, с изменениями).

отношению к cpGFP может быть различной. В случае вставки внешнего белка в положение, близкое к хромофору, или пришивание его к N- или C-концу cpFP, также расположенному близко к хромофору, любые конформационные изменения данного белка будут приводить к изменению микроокружения хромофора, что в свою очередь будет влиять на флуоресцентные свойства FP. Поэтому и вставка внешнего белка в FP, и конструирование белков слияния, содержащих cpFP, весьма перспективны для создания биосенсоров.

Поскольку пространственные структуры мутантных форм GFP из *Aequorea* (Ormö et al., 1996) и GFP-подобных белков из Anthozoa, таких как DsRed (Wall et al., 2000; Yarbrough et al., 2001), и мутантных форм asulCP похожи, возможно, что вставка внешнего белка в KFPs и их мономерные формы не приведет к потере хромофором способности к *cis*–*trans*-изомеризации. В случае создания биосенсоров, основанных на KFP, можно ожидать, что изменение микроокружения хромофора, опосредованное конформационными изменениями вставленного белка, будет приводить к переключению KFP из нефлуоресцентного во флуоресцентное состояние.

## Заключение

Активное изучение в течение более 10 лет GFP-подобных белков привело к тому, что полезные свойства этих белков были многократно улучшены, а недостатки устранены. Дальнейшее изучение структурных свойств GFP-подобных белков параллельно с клонированием новых цветных белков обеспечит создание мутантных форм со спектрами флуоресценции в дальней красной и инфракрасной областях (680–900 нм), где автофлуоресценция тканей животных минимальна, а также новых фотоактивируемых белков и «красных» флуоресцентных внутриклеточных биосенсоров. Новое поколение лазерных сканирующих микроскопов с многоканальными детекторами может преодолеть ограничения существующих методов многоцветного мечения и детекции FRET (Zimmermann et al., 2003). Мы также ожидаем более широкого использования GFP-подобных белков при изуче-

нии процессов в интактных тканях и небольших модельных организмах, для которых разработаны методы введения кДНК. Сочетание мультифотонного лазерного возбуждения с высокоэффективной эндоскопией и использование GFP-подобных белков позволят изучать различные биологические процессы в трансгенных животных.

Авторы благодарны К. А. Лукьянову за плодотворное обсуждение работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-49290), Фонда содействия отечественной науке (Степаненко Олеся В., 2007) ИИТАС (грант 2001-2347), программы МКБ РАН и программы «Ведущие научные школы России» (грант НШ-9396.2006.4).

## Список литературы

- Abedi M. R., Caponigro G., Kamb A. 1998. Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides. *Nucl. Acids Res.* 26 : 623–630.
- Ando R., Hama H., Yamamoto-Hino M., Mizuno H., Miyawaki A. 2002. An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 12 651–12 656.
- Ando R., Mizuno H., Miyawaki A. 2004. Regulated fact nucleocytoplasmic shuttling observed by reversible protein highlighting. *Science.* 306 : 1370–1373.
- Arimura S., Yamamoto J., Aida G. P., Nakazono M., Tsutsumi N. 2004. Frequent fusion and fission of plant mitochondria with unequal nucleoid distribution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 7805–7808.
- Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y. 1999. Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 11 241–11 246.
- Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y. 2000. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 97 : 11 984–11 989.
- Bell A. F., Stoner-Ma D., Wachter R. M., Tonge P. J. 2003. Light-driven decarboxylation of wild-type green fluorescent protein. *J. Amer. Chem. Soc.* 125 : 6919–6926.
- Bernstein F. C., Koetzle T. F., Williams G. J. B., Meyer E. F., Jr., Brice M. D., Rodgers J. R., Kennard O., Shimanouchi T., Tasumi M. 1997. The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* 112 : 535–542.
- Bloemberg G. V., Wijffes A. H., Lamers G. E., Stuurman N., Lugtenberg B. J. 2000. Simultaneous imaging of *Pseudomonas fluorescens* WCS365 populations expressing three different autofluorescent proteins in the rhizosphere: new perspectives for studying microbial communities. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13 : 1170–1176.
- Bokman S. H., Ward W. W. 1981. Renaturation of *Aequorea* Green-Fluorescent Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 101 : 1372–1380.
- Brejč K., Sixma T. K., Kitts P. A., Kain S. R., Tsien R. Y., Ormö M., Remington S. J. 1996. Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 94 : 2306–2311.
- Bulina M. E., Chudakov D. M., Mudrik N. N., Lukyanov K. A. 2002. Interconversion of Anthozoa GFP-like fluorescent and non-fluorescent proteins by mutagenesis. *BMC Biochem.* 3 : 1–8.
- Bulina M. E., Verkhusha V. V., Staroverov D. B., Chudakov D. M., Lukyanov K. A. 2003. Heterooligomeric tagging diminishes non-specific aggregation of target proteins fused with Anthozoa fluorescent proteins. *Biochem. J.* 371 : 109–114.
- Campbell R. E., Tour O., Palmer A. E., Steinbach P. A., Baird G. S., Zacharias D. A., Tsien R. Y. 2002. A monomeric red fluorescent protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 7877–7882.

- Carter R. W., Schmale M. C., Gibbs P. D. 2004. Cloning of anthozoan fluorescent protein genes. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 138 : 259—270.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263 : 802—805.
- Charpilienne A., Nejmeddine M., Berois M., Parez N., Neumann E., Hewat E., Trugnan G., Cohen J. 2001. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J. Biol. Chem.* 276 : 29 361—29 367.
- Chudakov D. M., Belousov V. V., Zeraisky A. G., Novoselov V. V., Staroverov D. B., Zorov D. B., Lukyanov S. A., Lukyanov K. A. 2003a. Kindling fluorescent proteins for precise *in vivo* photolabeling. *Nat. Biotechnol.* 21 : 191—194.
- Chudakov D. M., Feofanov A. V., Mudrik N. N., Lukyanov S. A., Lukyanov K. A. 2003b. Chromophore environment provides clue to «kindling fluorescent protein» riddle. *J. Biol. Chem.* 278 : 7215—7219.
- Chudakov D. M., Verkhusha V. V., Staroverov D. B., Souslova E. A., Lukyanov S., Lukyanov K. A. 2004. Photoswitchable cyan fluorescent protein for protein tracking. *Nat. Biotechnol.* 22 : 1435—1439.
- Cody C. W., Prasher D. C., Wester W. W., Prendergast F. G., Ward W. W. 1993. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry*. 32 : 1212—1218.
- Cormack B. P., Valdivia R. H., Falkow S. 1996. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*. 173 : 33—38.
- Cotlet M., Hofkens J., Habuchi S., Ditrux G., Van Guyse M., Michiels J., Vanderleyden J., De Schryver F. C. 2001. Identification of different emitting species in the red fluorescent protein DsRed by means of ensemble and single-molecule spectroscopy. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98 : 14 398—14 403.
- Cubitt A. B., Heim R., Adams S. R., Boyd A. E., Gross L. A., Tsien R. Y. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem. Sci.* 20 : 448—455.
- Delagrade S., Hawtin R. E., Silva C. M., Yang M. M., Youvan D. C. 1995. Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. *Biotechnology*. 13 : 151—154.
- Dietrich C., Maiss E. 2003. Fluorescent labelling reveals spatial separation of potyvirus populations in mixed infected *Nicotiana benthamiana* plants. *J. Gen. Virol.* 84 : 2871—2876.
- Dooley C. T., Dore T. M., Hanson G. T., Jackson W. C., Remington S. J., Tsien R. Y. 2004. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279 : 22 284—22 293.
- Eaton W. A., Hofrichter J. 1990. Sick cell hemoglobin polymerization. *Adv. Protein. Chem.* 40 : 63—279.
- Ehrig T., O'Kane D. J., Prendergast F. G. 1995. Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra. *FEBS Lett.* 367 : 163—166.
- Elslinger M. A., Wachter R. M., Hanson G. T., Kallio K., Remington S. J. 1999. Structural and spectral response of green fluorescent protein variants to changes in pH. *Biochemistry*. 38 : 5296—5301.
- Engqvist-Goldstein A. E., Warren R. A., Kessels M. M., Keen J. H., Heuser J., Drubin D. G. 2001. The actin-binding protein Hip1R associates with clathrin during early stages of endocytosis and promotes clathrin assembly *in vitro*. *J. Cell Biol.* 154 : 1209—1223.
- Ermakova G. V., Alexandrova E. M., Kazanskaya O. V., Vasiliev O. L., Smith M. W., Zeraisky A. G. 1999. The homeobox gene, Xanf-1, can control both neural differentiation and patterning in the presumptive anterior neuroectoderm of the *Xenopus laevis* embryo. *Development*. 126 : 4513—4523.
- Fradkov A. F., Chen Y., Ding L., Barsova E. V., Matz M. V., Lukyanov S. A. 2000. Novel fluorescent protein from *Discosoma* coral and its mutants possesses a unique far-red fluorescence. *FEBS Lett.* 479 : 127—130.
- Fradkov A. E., Verkhusha V. V., Staroverov D. B., Bulina M. E., Yanushevich Y. G., Martynov V. I., Lukyanov S. A., Lukyanov K. A. 2002. Far-red fluorescent tag for protein labeling. *Biochem. J.* 368 : 17—21.
- Griffin B. A., Adams S. R., Tsien R. Y. 1998. Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*. 281 : 269—272.
- Gross L. A., Baird G. S., Hoffman R. C., Baldrige K. K., Tsien R. Y. 2000. The structure of the chromophore within DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97 : 11 990—11 995.
- Gurskaya N. G., Savitsky A. P., Yanushevich Y. G., Lukyanov K. A. 2001. Color transitions in coral's fluorescent proteins by site-directed mutagenesis. *BMC Biochem.* 2 : 6.
- Gurskaya N. G., Verkhusha V. V., Shcheglov A. S., Staroverov D. B., Chepurnykh T. V., Fradkov A. F., Lukyanov S., Lukyanov K. A. 2006. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat. Biotechnol.* 24 : 461—465.
- Hakkila K., Matsimov M., Karp M., Virta M. 2002. Reporter genes lucFF, luxCDABE, gfp, and dsred have different characteristics in whole-cell bacterial sensors. *Anal. Biochem.* 301 : 235—242.
- Hanson G. T., Aggeler R., Oglesbee D., Cannon M., Capaldi R. A., Tsien R. Y., Remington S. J. 2004. Investigating mitochondrial redox potential with redox-sensitive green fluorescent protein indicators. *J. Biol. Chem.* 279 : 13 044—13 053.
- Hanson G. T., McAnaney T. B., Park E. S., Rendell M. E., Yarbrough D. K., Chu S., Xi L., Boxer S. G., Montrose M. H., Remington S. J. 2002. Green fluorescent protein variants as ratiometric dual emission pH sensors. Structural characterization and preliminary application. *Biochemistry*. 41 : 15 477—15 488.
- Hawley T. S., Telford W. G., Hawley R. G. 2001a. «Rainbow» reporters for multispectral marking and lineage analysis of hematopoietic stem cells. *Stem Cells*. 19 : 118—124.
- Hawley T. S., Telford W. G., Ramezani A., Hawley R. G. 2001b. Four-color flow cytometric detection of retrovirally expressed red, yellow, green, and cyan fluorescent proteins. *Biotechniques*. 30 : 1028—1034.
- He X., Bell A. F., Tonge P. J. 2002. Synthesis and spectroscopic studies of model red fluorescent protein chromophores. *Org. Lett.* 4 : 1523—1536.
- Heikal A. A., Hess S. T., Baird G. S., Tsien R. Y., Webb W. W. 2000. Molecular spectroscopy and dynamics of intrinsically fluorescent proteins: coral red (dsRed) and yellow (Citrine). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97 : 11 996—12 001.
- Heim R., Cubitt A. B., Tsien R. Y. 1995. Improved green fluorescence. *Nature*. 373 : 663—664.
- Heim R., Prasher D. C., Tsien R. Y. 1994. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 91 : 12 501—12 504.
- Heinemann U., Hahn M. 1995. Circular permutation of polypeptide chains: implications for protein folding and stability. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 64 : 121—143.
- Humphrey W., Dalke A., Schulten K. 1996. VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graphics*. 14 : 33—38.
- Ianushevich Iu. G., Shagin D. A., Fradkov A. F., Shakhbuzov K. S., Barsova E. V., Gurskaina N. G., Labas Iu. A., Mats M. V., Luk'ianov A., Luk'ianov S. A. 2005. Spectral diversity among the members of the family of green fluorescent protein in hydroid jellyfish (Cnidaria, Hydrozoa). *Bioorg. Khim.* 31 : 49—53.
- Inouye S., Tsuji F. I. 1994. Evidence for redox forms of the *Aequorea* green fluorescent protein. *FEBS Lett.* 351 : 211—214.
- Jakobs S., Schauss A. C., Hell S. W. 2003. Photoconversion of matrix targeted GFP enables analysis of continuity and intermixing of the mitochondrial lumen. *FEBS Lett.* 554 : 194—200.
- Jakobs S., Subramaniam V., Schönle A., Jovin T. M., Hell S. W. 2000. EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal, two-photon and fluorescence lifetime microscopy. *FEBS Lett.* 479 : 131—135.
- Johnson F. H., Shimomura O., Saiga Y., Gershman L. C., Reynolds G. T., Waters J. R. 1962. Action of cyanide on Cypridina luciferin. *J. Cell. Comp. Physiol.* 60 : 85—104.

- Karbowsky M., Arnoult D., Chen H., Chan D. C., Smith C. L., Youle R. J. 2004. Quantitation of mitochondrial dynamics by photo-labeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J. Cell Biol.* 164 : 493—499.
- Labas Y. A., Gurskaya N. G., Yanushevich Y. G., Fradkov A. F., Lukyanov K. A., Lukyanov S. A., Matz M. V. 2002. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 4256—4261.
- Lakowicz J. R. 1983. Principles of fluorescence spectroscopy. New York: Plenum Press.
- Lauf U., Lopez P., Falk M. M. 2001. Expression of fluorescently tagged connexins: a novel approach to rescue function of oligomeric DsRed-tagged proteins. *FEBS Lett.* 498 : 11—15.
- Lee W. L., Kim M. K., Schreiber A. D., Grinstein S. 2005. Role of ubiquitin and proteasomes in phagosome maturation. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 2077—2090.
- Li Y., Agrawal A., Sakon J., Beitle R. R. 2001. Characterization of metal affinity of green fluorescent protein and its purification through salt promoted, immobilized metal affinity chromatography. *J. Chromatogr. A.* 909 : 183—190.
- Lippincott-Schwartz J., Snapp E., Kenworthy A. 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2 : 444—456.
- Lukyanov K. A., Chudakov D. M., Lukyanov S., Verkhusha V. V. 2005. Photoactivatable fluorescent proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6 : 885—891.
- Lukyanov K. A., Fradkov A. F., Gurskaya N. G., Matz M. V., Labas Y. A., Savitsky A. P., Markelov M. L., Zaraisky A. G., Zhao X., Fang Y., Tan W., Lukyanov S. A. 2000. Natural animal coloration can be determined by a nonfluorescent green fluorescent protein homolog. *J. Biol. Chem.* 275 : 25 879—25 882.
- Marchant J. S., Stutzmann G. E., Leissring M. A., LaFera F. M., Parker I. 2001. Multiphoton-evoked color change of DsRed as an optical highlighter for cellular and subcellular labeling. *Nat. Biotechnol.* 19 : 645—649.
- Mas P., Devlin P. F., Panda S., Kay S. A. 2000. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature.* 408 : 207—211.
- Maselli A., Laevsky G., Knecht D. A. 2002. Kinetics of binding, uptake and degradation of live fluorescent (DsRed) bacteria by *Dictyostelium discoideum*. *Microbiology.* 148 : 413—420.
- Matz M. V., Fradkov A. F., Labas Y. A., Savitsky A. P., Zaraisky A. G., Markelov M. L., Lukyanov S. A. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat. Biotechnol.* 17 : 969—973.
- Merritt E. A., Bacon D. J. 1977. Raster3D: photorealistic molecular graphics. *Methods Enzymol.* 277 : 505—524.
- Miyawaki A., Griesbeck O., Heim R., Tsien R. Y. 1998. Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 2135—2140.
- Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J. M., Adams J. A., Ikura M., Tsien R. Y. 1997. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature.* 388 : 882—887.
- Miyawaki A., Tsien R. Y. 2000. Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol.* 327 : 472—500.
- Mizuno H., Sawano A., Eli P., Hama H., Miyawaki A. 2001. Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry.* 40 : 2502—2510.
- Moede T., Leibiger B., Berggren P. O., Leibiger I. B. 2001. Online monitoring of stimulus-induced gene expression in pancreatic beta-cells. *Diabetes.* 50 : 15—19.
- Nagai T., Sawano A., Park E. S., Miyawaki A. 2001. Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 3197—3202.
- Nelson G., Paraoan L., Spiller D. G., Wilde G. J., Browne M. A., Djali P. K., Unitt J. F., Sullivan E., Floettmann E., White M. R. 2002. Multi-parameter analysis of the kinetics of NF- $\kappa$ B signalling and transcription in single living cells. *J. Cell Sci.* 115 : 1137—1148.
- Nienhaus K., Nienhaus G. U., Wiedenmann J., Nar H. 2005. Structural basis for photo-induced protein cleavage and green-to-red conversion of fluorescent protein EosFP. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 9156—9159.
- Niwa H., Inouye S., Hirano T., Matsuno T., Kojima S., Kubota M., Ohashi M., Tsuji F. I. 1996. Chemical nature of the light emitter of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 13 617—13 622.
- Nolan T., Bower T. M., Brown A. E., Crisanti A., Catterucia F. 2002. PiggyBac-mediated germline transformation of the malaria mosquito *Anopheles stephensi* using the red fluorescent protein dsRED as a selectable marker. *J. Biol. Chem.* 277 : 8759—8762.
- Ormö M., Cubitt A. B., Kallio K., Gross L. A., Tsien R. Y., Remington S. J. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science.* 273 : 1392—1395.
- Patterson G. H., Lippincott-Schwartz J. 2002. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science.* 13 : 1873—1877.
- Patterson G. H., Lippincott-Schwartz J. 2004. Selective photolabeling of proteins using photoactivatable GFP. *Methods.* 32 : 445—450.
- Patterson G. H., Piston D. W., Barisas B. G. 2000. Forster distances between green fluorescent protein pairs. *Anal. Biochem.* 284 : 438—440.
- Peloquin J. J., Lauzon C. R., Potter S., Miller T. A. 2002. Transformed bacterial symbionts reintroduced to and detected in host gut. *Curr. Microbiol.* 45 : 41—45.
- Petersen J., Wilmann P. G., Beddoe T., Oakley A. J., Devenish R. J., Prescott M., Rossjohn J. 2003. The 2.0-Å crystal structure of eqFP611, a far red fluorescent protein from the sea anemone *Entacmaea quadricolor*. *J. Biol. Chem.* 278 : 44 626—44 631.
- Prasher D. C., Eckenrode V. K., Ward W. W., Prendergast F. G., Cormier M. J. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene.* 111 : 229—233.
- Prendergast F. G., Mann K. G. 1978. Chemical and physical properties of aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequorea forskalea*. *Biochemistry.* 17 : 3448—3453.
- Prescott M., Ling M., Beddoe T., Oakley A. J., Dove S., Hoegh-Guldberg O., Devenish R. J., Rossjohn J. 2003. The 2.2 Å crystal structure of a pocilloporin pigment reveals a nonplanar chromophore conformation. *Structure.* 11 : 275—284.
- Reid B. G., Flynn G. C. 1997. Chromophore formation in green fluorescent protein. *Biochemistry.* 36 : 6786—6791.
- Remington S. J. 2000. Structural basis for understanding spectral variations in green fluorescent protein. *Methods Enzymol.* 305 : 196—211.
- Remington S. J., Wachter R. M., Yarbrough D. K., Branchaud B., Anderson D. C., Kallio K., Lukyanov K. A. 2005. zFP538, a yellow-fluorescent protein from *Zoanthus*, contains a novel three-ring chromophore. *Biochemistry.* 44 : 202—212.
- Richmond T. A., Takahashi T., Shimkhada R., Bernsdorf J. 2000. Engineered metal binding sites on green fluorescence protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268 : 462—465.
- Robey R. B., Ruiz O., Santos A. V. P., Ma J., Kear F., Wang L.-J., Li C.-J., Bernardo A. A., Arruda J. A. L. 1998. pH-dependent fluorescence of a heterologously expressed *Aequorea* green fluorescent protein mutant: *in situ* spectral characteristics and applicability to intracellular pH estimation. *Biochemistry.* 37 : 9894—9901.
- Rodrigues F., van Hemert M., Steensma H. Y., Corte-Real M., Leao C. 2001. Red fluorescent protein (DsRed) as a reporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 183 : 3791—3794.
- Sankaranarayanan S., De Angelis D., Rothman J. E., Ryan T. A. 2000. The use of pHluorins for optical measurements of presynaptic activity. *Biophys. J.* 79 : 2199—2208.
- Selvin P. R. 2000. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Struct. Biol.* 7 : 730—734.
- Shagin D. A., Barsova E. V., Yanushevich Y. G., Fradkov A. F., Lukyanov K. A., Labas Y. A., Semenova T. N., Ugal-

- de J. A., Meyers A., Nunez J. M., Widder E. A., Lukyanov S. A., Matz M. V. 2004. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity. *Mol. Biol. Evol.* 5 : 841—850.
- Shaner N. C., Campbell R. E., Steinbach P. A., Giepmans B. N., Palmer A. E., Tsien R. Y. 2004. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* 22 : 1567—1572.
- Shav-Tal Y., Darzacq X., Shenoy S. M., Fusco D., Janicki S. M., Spector D. L., Singer R. H. 2004. Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science*. 304 : 1797—1800.
- Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59 : 223—239.
- Terskikh A., Fradkov A., Ermakova G., Zاراisky A., Tan P., Kajava A. V., Zhao X., Lukyanov S., Matz M., Kim S., Weissman I., Siebert P. 2000. «Fluorescent timer»: protein that changes color with time. *Science*. 290 : 1585—1588.
- Terskikh A. V., Fradkov A. F., Zاراisky A. G., Kajava A. V., Angres B. 2002. Analysis of DsRed mutants: space around the fluorophore accelerates fluorescence development. *J. Biol. Chem.* 277 : 7633—7636.
- Tsien R. Y. 1998. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67 : 509—544.
- Tsutsui H., Karasawa S., Shimizu H., Nukina N., Miyawaki A. 2005. Semi-rational engineering of a coral fluorescent protein into an efficient highlighter. *EMBO Rep.* 6 : 233—238.
- Tulu U. S., Rusan N. M., Wadsworth P. 2003. Peripheral, non-centrosome-associated microtubules contribute to spindle formation in centrosome-containing cells. *Curr. Biol.* 13 : 1894—1899.
- Van Thor J. J., Gensch T., Hellingwerf K. J., Johnson L. N. 2002. Phototransformation of green fluorescent protein with UV and visible light leads to decarboxylation of glutamate 222. *Nat. Struct. Biol.* 9 : 37—41.
- Verkhusha V. V., Akovbian N. A., Efremenko E. N., Varfolomeyev S. D., Vrzhershch P. V. 2001a. Kinetic analysis of maturation and denaturation of DsRed, a coral-derived red fluorescent protein. *Biochemistry*. 66 : 1342—1351.
- Verkhusha V. V., Chudakov D. M., Gurskaya N. G., Lukyanov S. A., Lukyanov K. A. 2004. Common pathway for the red chromophore formation in fluorescent proteins and chromoproteins. *Chem. Biol.* 11 : 845—854.
- Verkhusha V. V., Lukyanov K. A. 2004. The molecular properties and applications of Anthozoa fluorescent proteins and chromoproteins. *Nat. Biotechnol.* 22 : 289—296.
- Verkhusha V. V., Matz M. V., Sakurai T., Lukyanov K. A. 2003. GFP-like fluorescent proteins and chromoproteins of the class *Anthozoa*. In: Protein structures: kaleidoscope of structural properties and function. Trivandrum, India: Research Signpost. 405—439.
- Verkhusha V. V., Otsuna H., Awasaki T., Oda H., Tsukita S., Ito K. 2001b. An enhanced mutant of red fluorescent protein DsRed fore double labeling and developmental timer of neural fiber bundle formation. *J. Biol. Chem.* 276 : 29 621—29 624.
- Verkhusha V. V., Sorkin A. 2005. Conversion of the monomeric red fluorescent protein into a photoactivatable probe. *Chem. Biol.* 12 : 279—285.
- Vrzhershch P. V., Akovbian N. A., Varfolomeyev S. D., Verkhusha V. V. 2000. Denaturation and renaturation of a tightly tetramerized DsRed protein under mildly acidic conditions. *FEBS Lett.* 487 : 203—208.
- Wachter R. M., Elsliger M. A., Kallio K., Hanson G. T., Remington S. J. 1998. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6 : 1267—1277.
- Wall M. A., Socolich M., Ranganathan R. 2000. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed. *Nat. Struct. Biol.* 7 : 1133—1138.
- Wang L., Jackson W. C., Steinbach P. A., Tsien R. Y. 2004. Evolution of new nonantibody proteins via iterative somatic hypermutation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 16 745—16 749.
- Ward W. W., Bokman S. H. 1982. Reversible denaturation of *Aequorea* Green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*. 21 : 4535—4540.
- Ward W. W., Cormier M. J. 1979. An energy transfer protein in coelenterate bioluminescence. Characterization of the Renilla green-fluorescent protein. *J. Biol. Chem.* 254 : 781—788.
- Ward W. W., Prentice H. J., Poth A. F., Cody C. W., Reeves S. C. 1982. Spectral perturbations of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Photochem. Photobiol.* 35 : 803—808.
- Weber W., Helms V., McCammon J. A., Langhoff P. W. 1999. Shedding light on the dark and weakly fluorescent states of green fluorescent proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 6177—6182.
- Weiss S. 1999. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science*. 283 : 1676—1683.
- Werdien D., Peiler G., Ryffel G. U. 2001. FLP and Cre recombinase function in *Xenopus* embryos. *Nucl. Acids Res.* 29 : E53.
- Wiedenmann J., Ivanchenko S., Oswald F., Schmitt F., Rocker C., Salih A., Spindler K. D., Nienhaus G. U. 2004. EosFP, a fluorescent marker protein with UV-inducible green-to-red fluorescence conversion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 15 905—15 910.
- Wiehler J., von Hummel J., Steipe B. 2001. Mutants of *Discosoma* red fluorescent protein with a GFP-like chromophore. *FEBS Lett.* 487 : 384—389.
- Wilmann P. G., Petersen J., Devenish R. J., Prescott M., Rosjohn J. 2005. Variations on the GFP chromophore: a polypeptide fragmentation within the chromophore revealed in the 2.1-Å crystal structure of a nonfluorescent chromoprotein from *Anemonia sulcata*. *J. Biol. Chem.* 280 : 2401—2404.
- Wilson T., Hastings J. W. 1998. Bioluminescence. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 14 : 197—230.
- Xu Y., Piston D. W., Johnson C. H. 1999. A bioluminescence resonance energy transfer (BRET) system: application to interacting circadian clock proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 151—156.
- Yang Y. S., Hughes T. E. 2001. Cre stoplight: a red/green fluorescent reporter of Cre recombinase expression in living cells. *Bio-techniques*. 31 : 1036—1041.
- Yanushevich Y. G., Staroverov D. B., Savitsky A. P., Fradkov A. F., Gurskaya N. S., Bulina M. E., Lukyanov K. A., Lukyanov S. A. 2002. A strategy for the generation of non-aggregating mutants of Anthozoa fluorescent proteins. *FEBS Lett.* 511 : 11—14.
- Yarbrough D., Wachter R. M., Kallio K., Matz M. V., Remington S. J. 2001. Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral, at 2.0-Å resolution. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 98 : 462—467.
- Yuste R., Miller R. B., Holthoff K., Zhang S., Miesenbock G. 2000. Synapto-pHluorins: chimeras between pH-sensitive mutants of green fluorescent protein and synaptic vesicle membrane proteins as reporters of neurotransmitter release. *Methods Enzymol.* 327 : 522—546.
- Zacharias D. A., Baird G. S., Tsien R. Y. 2000. Recent advances in technology for measuring and manipulating cell signals. *Curr. Opin. Neurobiol.* 10 : 416—421.
- Zimmer M. 2002. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem. Rev.* 102 : 759—781.
- Zimmermann T., Rietdorf J., Pepperkok R. 2003. Spectral imaging and its applications in live cell microscopy. *FEBS Lett.* 546 : 87—92.
- Zlokarnik G., Negulescu P. A., Knapp T. E., Mere L., Burres N., Feng L., Whitney M., Roemer K., Tsien R. Y. 1998. Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. *Science*. 279 : 84—88.

FLUORESCENT PROTEINS: PHYSICAL-CHEMICAL PROPERTIES AND APPLICATION  
IN CELL BIOLOGY*Olesya V. Stepanenko,<sup>1</sup> V. V. Verkhusha,<sup>2</sup> I. M. Kuznetsova,<sup>1</sup> K. K. Turoverov<sup>1</sup>*<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia, and <sup>2</sup> Department of Anatomy and Structural Biology,  
Albert Einstein College of Medicine, New York 10461, USA;<sup>1</sup> e-mail: kkt@mail.cytspb.rssi.ru

Green fluorescent protein (GFP) from jellyfish *Aequorea victoria* is the most extensively studied and widely used in cell biology protein. At present novel naturally occurring GFP-like proteins have been discovered and enhanced mutants of *Aequorea* GFP have been created. These mutants differ from wild-type GFP by stability, value of quantum yield, absorption and fluorescence spectra position and photochemical properties. GFP-like proteins are the fast growing family. This review is an attempt to characterize the main groups of GFP-like proteins, describe their structure and mechanisms of chromophore formation and summarize the main trends of their utilization as markers and biosensors in cell and molecular biology.

Key words: fluorescent proteins, chromoproteins, photoactivated proteins.

---