



УДК 577.112.088.3

ВЫЯВЛЕНИЕ КЛЮЧЕВЫХ АМИНОКИСЛОТНЫХ ОСТАТКОВ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ ЦВЕТ ЗЕЛЕННОГО И ЖЕЛТОГО ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ БЕЛКОВ ИЗ КОРАЛЛОВОГО ПОЛИПА ZOANTHUS

© 2002 г. Ю. Г. Янушевич*, М. Е. Булина*,
Н. Г. Гурская*, А. П. Савицкий**, К. А. Лукьянов**

* Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

** Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва

Поступила в редакцию 02.07.2001 г. Принята к печати 26.09.2001 г.

Направленный мутагенез использован для изучения структурной основы цветового разнообразия флуоресцентных белков на примере двух близкородственных белков из одного организма (кораллового полипа *Zoanthus* sp.), один из которых обладал зеленой, а другой – желтой флуоресценцией. В результате были получены следующие переходы цветов эмиссии: из желтого в зеленый, из желтого в двухцветный (желтый и зеленый), из зеленого в желтый. Скачкообразный характер спектральных переходов и возможность проявления двухцветной флуоресценции позволяют предполагать, что за зеленую и желтую флуоресценцию ответственны химически различные флуорофорные группы. Для эффективного формирования желтого, а не зеленого флуорофора необходимо одновременное присутствие остатков Gly63, Lys65 и Asp68.

Ключевые слова: GFP, zFP506, zFP538; мутагенез.

ВВЕДЕНИЕ

Клонирование гена зеленого флуоресцентного белка (Green Fluorescent Protein – GFP) из медузы *Aequorea victoria* открыло широкие возможности использования GFP в биотехнологии в качестве прижизненного маркера генной экспрессии [1–7]. Главной особенностью этого белка, позволяющей использовать его в разнообразных гетерологичных системах экспрессии (от бактерий до млекопитающих), является способность GFP самостоятельно формировать флуорофорную группу внутри белковой глобулы без привлечения внешних органических кофакторов [8–11]. Хромофор образуется путем циклизации белкового остова во фрагменте 65–67 (Ser-Tyr-Gly) и последующего дегидрогенирования метиленового мостика боковой цепи остатка Tyr66. В результате формируется структура с системой сопряженных двойных связей, способная поглощать и испускать свет в видимой области спектра (максимум флуоресценции 508 нм). С помощью рентгеноструктурного анализа показано, что полипептидная цепь GFP уложена в форме так называемого β-бочонка, образованного 11 β-слоями, в центре которого проходит α-спираль [10, 11]. Хромофорная группа

входит в состав этой α-спирали и расположена в центральной части глобулы. Таким образом, хромофор полностью изолирован от окружающего раствора и контактирует только с теми аминокислотными остатками, боковые цепи которых погружены внутрь β-бочонка.

Многочисленные попытки изменить цвет флуоресценции GFP путем мутагенеза выявили только две аминокислотные позиции, способные существенно влиять на спектр эмиссии [12–14]. Во-первых, замена остатка Tyr66, входящего в структуру флуорофора, на остатки других ароматических аминокислот (Trp, Phe или His) приводит к сдвигу флуоресценции в синюю область (до 442 нм) [15]. Во-вторых, замена остатка Ser203 на Tyr или His вызывает красный сдвиг эмиссии до 529 нм [10].

Недавно в нашей лаборатории были клонированы кДНК, кодирующие GFP-подобные белки, которые определяют флуоресцентную окраску кораллов (класс *Anthozoa*) [16, 17]. Эти белки существенно различаются цветом флуоресценции и могут быть подразделены на четыре группы в зависимости от положения максимума спектра эмиссии в сине-зеленой (~485 нм), зеленой (~505 нм), желтой (~540 нм) и красной (>580 нм) областях спектра. Очевидно, понимание взаимосвязи между структурой белка и цветом его флуоресценции имеет большое научное и прикладное значение.

Автор для переписки (тел./факс: (095) 330-70-56; эл. почта: luk@ibch.ru).

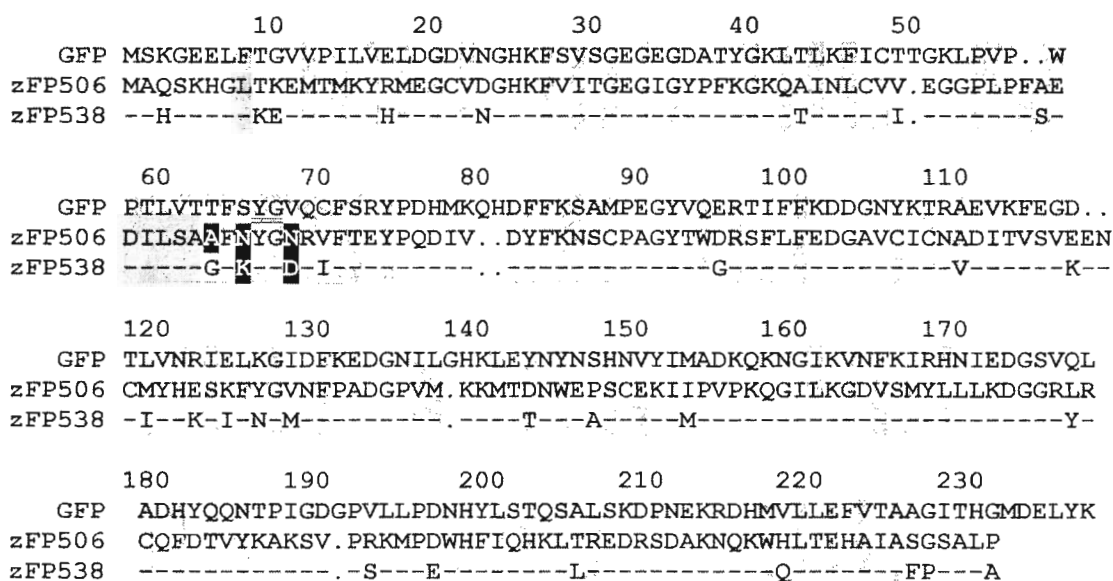


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей флуоресцентных белков GFP, zFP506 и zFP538. В последовательности zFP538 аминокислотные остатки, совпадающие с соответствующими остатками zFP506, обозначены подчеркиками. Разрывы, внесенные для выравнивания последовательностей, обозначены точками. Нумерация остатков соответствует последовательности GFP. Аминокислотные остатки, боковые цепи которых погружены в белковую глобулу [10, 11], показаны на сером фоне. Формирующие хромофор GFP остатки Tyr66 и Gly67 подчеркнуты. Остатки, которые в данной работе были мутированы, показаны на черном фоне.

В данной работе мы использовали направленный мутагенез для выяснения роли некоторых аминокислотных остатков, определяющих цвет зеленого и желтого флуоресцентных белков из кораллового полипа *Zoanthus sp.* (класс *Anthozoa*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами были клонированы кДНК двух высокоомологичных флуоресцентных белков, синтезирующихся в одном организме, коралловом полипе *Zoanthus sp.* [16] Эти белки имели четкие спектральные различия. Один из них, zFP506, флуоресцировал в зеленой области спектра (506 нм), а другой, zFP538, – в желтой области (538 нм). Высокое сходство аминокислотных последовательностей zFP506 и zFP538 (87% идентичности) делает их удобной моделью для выявления аминокислотных остатков, определяющих цвет флуоресценции.

Сравнение аминокислотных последовательностей GFP, zFP506 и zFP538 показано на рис. 1. Если принять, что пространственная структура флуоресцентных белков из кораллов сходна с β -бочонком GFP (недавно сходство с β -бочонком было показано на примере структуры красного флуоресцентного белка drFP583 [18, 19]), то можно заключить, что из 31 аминокислотной позиции, различающей zFP506 и zFP538, только восемь приходится на внутренние (погруженные в глобулу) остатки. Четыре из этих восьми остатков группируются в непосредственной близости от аминокислотных позиций

66 и 67, формирующих хромофор. Мы предположили, что три из этих остатков (позиции 63, 65 и 68) могут определять различие цветов флуоресценции zFP506 и zFP538.

Сначала мы проверили влияние замены остатка Lys65 желтого белка zFP538 на спектр его флуоресценции (этот эксперимент являлся частью более широкого проекта по мутагенезу нескольких флуоресцентных белков в положении 65). С помощью выродженного праймера для ПЦР было тестировано семь аминокислотных замен по этому положению (Leu, Ile, Met, His, Gln, Asn или Lys). Используя флуоресцентный микроскоп, около 100 клонов были визуальным образом inspected на наличие и цвет флуоресценции. Обнаружилось, что около 50 клонов флуоресцировали зеленым светом различной интенсивности, и только шесть клонов обладали желтой флуоресценцией. Анализ этих шести клонов показал, что все они содержат в положении 65 остаток Lys. Из зеленых клонов мы детально охарактеризовали самый яркий вариант, содержащий замену K65M. Этот мутант оказался практически неотличим от zFP506 как по форме и максимумам спектров возбуждения-эмиссии, так и по яркости флуоресценции (рис. 2a).

Поскольку характерной чертой остатка Lys является наличие положительного заряда на боковой цепи, мы проверили другой положительно заряженный аминокислотный остаток – Arg – на возможность замены им Lys65 с сохранением желтой флуоресценции. Был получен мутант

zFP538–K65R, который при экспрессии в *E. coli* не созрел до стадии флуоресцентного белка.

Таким образом, остаток Lys65 в zFP538 оказался ключевым аминокислотным остатком, необходимым для проявления желтой, а не зеленой флуоресценции. Полученный результат оказался неожиданным, поскольку лизин в этом положении не является уникальным для zFP538: еще один из известных флуоресцентных белков, amFP486, максимум спектра эмиссии которого лежит в сине-зеленой (486 нм) области спектра, несет остаток Lys65 [16]. Следовательно, можно заключить, что только совместное действие Lys65 и каких-либо других остатков приводит к характерному сдвигу спектра флуоресценции в длинноволновую область.

Далее мы обратили внимание на остаток Asp68, уникальный для zFP538 (остальные известные флуоресцентные белки несут в положении 68 остатки Asp, Ser или Val [16]). Замена D68N привела к двухпиковой форме эмиссионной полосы с максимумами в зеленой (506 нм) и желтой (537 нм) областях спектра (рис. 2б). Таким образом, остаток Asp68 в zFP538 важен, но не абсолютно необходим для проявления желтой флуоресценции.

В заключение мы попробовали превратить зеленый флуоресцентный белок zFP506 в желтый. Однако присутствия остатков Lys в положении 65 и Asp в положении 68 оказалось для этого недостаточно: мутант zFP506–N65K/N68D флуоресцировал в зеленой области спектра, отличаясь от зеленого белка дикого типа только пониженной яркостью (данные не представлены). Только тройной мутант zFP506–A63G/N65K/N68D приобрел желтую флуоресценцию с максимумом спектра эмиссии при 537 нм (рис. 2в). По сравнению с желтым белком zFP538 этот мутант имел несколько измененный спектр возбуждения: минорный пик при 494 нм стал более выраженным.

Таким образом, нам удалось осуществить следующие переходы цветов флуоресценции для белков zFP506 и zFP538: из желтого в зеленый, из желтого в двухцветный (желтый и зеленый), из зеленого в желтый. Следует отметить скачкообразный характер этих спектральных переходов без появления пиков флуоресценции в промежуточной области спектра.

Особый интерес представляет мутант zFP538–D68N, обладающий двухпиковой формой спектра эмиссии. Ранее подобные мутанты, имеющие максимумы флуоресценции в зеленой и красной областях спектра, были описаны для двух красных флуоресцентных белков asFP595 и drFP583 [20–24]. Структурные исследования показали, что красную флуоресценцию этих белков определяют химически различные хромофорные группы, отличающиеся также и от хромофора GFP [25, 26]. Двухпиковая флуоресценция мутантных asFP595 и drFP583 объясняется в этом случае тем, что не-

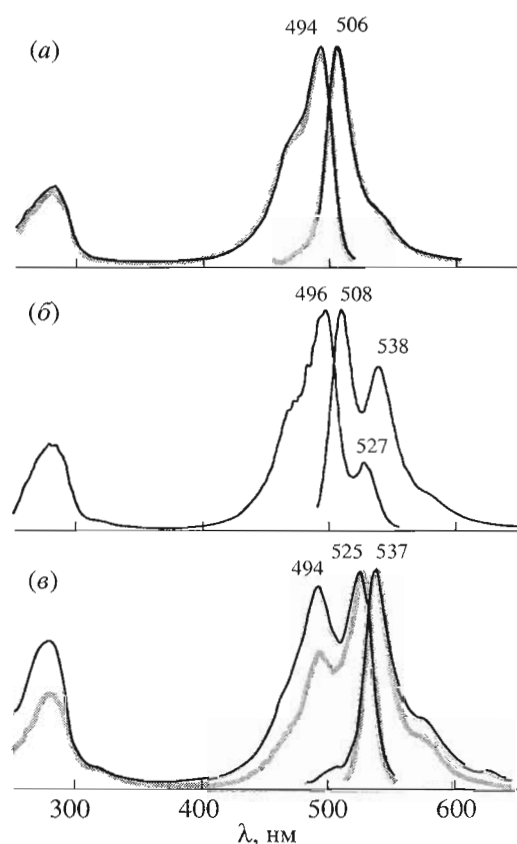


Рис. 2. Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции белков zFP506, zFP538 и их мутантов с измененным цветом флуоресценции: (а) зеленый мутант zFP538–K65M (черные линии) в сравнении с зеленым белком zFP506 (серые толстые линии); (б) зелено-желтый мутант zFP538–D68N; (в) желтый мутант zFP506–A63G/N65K/N68D (черные линии) в сравнении с желтым белком zFP538 (серые толстые линии). В каждой паре спектров более коротковолновым является спектр возбуждения, более длинноволновым – спектр эмиссии.

которые мутации затрудняют образование нативного “красного” хромофора, и в части белковых молекул формируется GFP-подобный “зеленый” хромофор. Наши результаты говорят в пользу того, что за зеленую и желтую флуоресценцию zFP506 и zFP538 ответственны химически различные флуорофоры. Можно предположить, что положительный заряд остатка Lys65 и отрицательный заряд остатка Asp68 вовлечены в катализ при формировании “желтого” хромофора, в то время как остаток Gly63 предоставляет необходимую подвижность белковой цепи.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали Трис, хлористый натрий, EDTA, нуклеотидтрифосфаты (Sigma, США); эндонуклеазы рестрикции (New England

Biolabs, США); смесь полимераз для ПЦР Advantage KlenTaq (Clontech, США).

Направленный мутагенез проводили с помощью ПЦР с праймерами, обеспечивающими целевую замену, по методу [27]. Мутантные ДНК-последовательности клонировали в экспрессионный вектор pQE30 (Qiagen), используя сайты рестрикции *Bam*HI и *Sal*I. Внесение целевых и отсутствие случайных нуклеотидных замен контролировали секвенированием на автоматическом секвенаторе SEQ 2000 (Beckman, США). Полученные рекомбинантные белки несли вместо первого остатка Met последовательность MRNHNHNGS, которая позволяет быстро очищать эти белки с помощью металлоаффинной хроматографии.

Для наработки флуоресцентных белков штаммы *E. coli*, несущие рекомбинантные плазмиды, выращивали при 37°C в объеме 50 мл до оптической плотности около 0.6. После этого экспрессию индуцировали добавлением IPTG до концентрации 0.2 мМ. Далее культуру инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующий день клетки собирали центрифугированием, ресуспендировали в буфере 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0, 100 мМ NaCl и разрушали ультразвуком. После центрифугирования образца флуоресцентные белки выделяли из растворимой фракции с помощью металлоаффинного сорбента TALON (Clontech) согласно рекомендациям производителя. Элюцию с сорбента проводили буфером 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0, 100 мМ NaCl, 100 мМ EDTA. Степень очистки белков была не менее 90% по данным гель-электрофореза.

Спектральные измерения проводили на спектрофлуориметре LS50B (Perkin-Elmer). Перед измерениями образцы белков разводили буфером 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0, 100 мМ NaCl до концентрации около 50 мкг/мл.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 01-04-49037).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chaffie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. // *Science*. 1994. V. 263. P. 802–805.
2. Kendall J.M., Badminton M.N. // *Trends Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 216–224.
3. Bajno L., Grinstead S.J. // *Immunol. Methods*. 1999. V. 232. P. 65–75.
4. Pollok B.A., Heim R. // *Trends Cell Biol.* 1999. V. 9. P. 57–60.
5. White J., Stelzer E. // *Trends Cell Biol.* 1999. V. 9. P. 61–65.
6. Gonzalez C., Bejarano L.A. // *Trends Cell Biol.* 2000. V. 10. P. 162–165.
7. Margolin W. // *Methods*. 2000. V. 20. P. 62–72.
8. Shimomura O. // *FEBS Lett.* 1979. V. 104. P. 220–222.
9. Cody C.W., Prasher D.C., Wastler W.M., Prendergast F.G., Ward W.W. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. P. 1212–1218.
10. Ormo M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. // *Science*. 1996. V. 273. P. 1392–1395.
11. Yang F., Moss L.G., Phillips G.N., Jr. // *Nature Biotechnol.* 1996. V. 14. P. 1246–1251.
12. Palm G.J., Zdanov A., Gaitanaris G.A., Stauber R., Pavlakis G.N., Wlodawer A. // *Nature Struct. Biol.* 1997. V. 4. P. 361–365.
13. Tsien R.Y., Prasher D.C. // *Green Fluorescent Protein / Eds Chalfie M., Kain S.* New York: Willey-Liss, 1998. P. 97–118.
14. Remington S.J. // *Methods Enzymol.* 2000. V. 305. P. 196–211.
15. Heim R., Prasher D.C., Tsien R.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 12501–12504.
16. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. // *Nature Biotechnol.* 1999. V. 17. P. 969–973.
17. Fradkov A.F., Chen Y., Ding L., Barsova E.V., Matz M.V., Lukyanov S.A. // *FEBS Lett.* 2000. V. 479. P. 127–130.
18. Wall M.A., Socolich M., Ranganathan R. // *Nature Struct. Biol.* 2000. V. 7. P. 1133–1138.
19. Yarbrough D., Wachter R.M., Kallio K., Matz M.V., Remington S.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. P. 462–467.
20. 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. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 25879–25882.
21. Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 11984–11989.
22. Terskikh A., Fradkov A., Ermakova G., Zaraisky A., Tan P., Kajava A.V., Zhao X., Lukyanov S., Matz M., Kim S., Weissman I., Siebert P. // *Science*. 2000. V. 290. P. 1585–1588.
23. Wiehler J., von Hummel J., Steipe B. // *FEBS Lett.* 2001. V. 487. P. 384–389.
24. Mizuno H., Sawano A., Eli P., Hama H., Miyawaki A. // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 2502–2510.
25. Gross L.A., Baird G.S., Hoffman R.C., Baldrige K.K., Tsien R.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 11990–11995.
26. Martynov V.I., Savitsky A.P., Martynova N.Y., Savitsky P.A., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 21012–21016.
27. Ho S.N., Hunt H.D., Horton R.M., Pullen J.K., Pease L.R. // *Gene*. 1989. V. 77. P. 51–59.

Key Amino Acid Residues Responsible for the Color of the Green and Yellow Fluorescent Proteins from the Coral Polyp *Zoanthus* sp.

Yu. G. Yanushevich*, M. E. Bulina*, N. G. Gurskaya*, A. P. Savitskii**, and K. A. Lukyanov*#

Phone/fax: +7 (095) 330-7056; e-mail: luk@ibch.ru

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

** Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii pr. 33, Moscow, 117071 Russia

Site-directed mutagenesis was used to study the structural basis of color diversity of fluorescent proteins by the example of two closely related proteins from one organism (coral polyp *Zoanthus* sp.), one of which produces green and the other, yellow fluorescence. As a result, the following conversions of emission colors were performed: from yellow to green, from yellow to a dual color (yellow and green), and from green to yellow. The saltatory character of the spectral transitions and the manifestation of the dual-color fluorescence suggest that chemically different fluorophores are responsible for the green and yellow fluorescence. The simultaneous presence of three residues, Gly63, Lys65, and Asp68, is necessary for the efficient formation of the yellow rather than green fluorophore. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2002, vol. 28, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: green fluorescent protein, GFP, zFP506, zFP538, mutagenesis