



УДК 577.112.088.3

ПРИРОДНЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ БЕЛОК, ИЗМЕНЯЮЩИЙ ЦВЕТ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ В ХОДЕ СОЗРЕВАНИЯ

© 2003 г. Ю. Г. Янушевич*, Н. Г. Гурская*, Д. Б. Староверов**,
С. А. Лукьянов*, 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

*ЗАО Евроген, Москва

Поступила в редакцию 05.07.2002 г. Принята к печати 18.07.2002 г.

Из кораллового полипа *Zoanthus* sp. клонировали ген нового красного флуоресцентного белка, названного zoan2RFP, который является гомологом хорошо известного зеленого флуоресцентного белка GFP из медузы *Aequorea victoria*. На ранних стадиях созревания белок zoan2RFP обладает зеленой флуоресценцией, которая затем сменяется красной. Подобное явление было недавно описано для мутанта E5 красного флуоресцентного белка DsRed кораллов. От E5 zoan2RFP отличает более быстрая кинетика созревания белка и полное исчезновение зеленой флуоресценции в зрелом белке. Подобные белки, найденные в природе, можно рассматривать как переходные формы между зелеными и красными флуоресцентными белками, образующиеся в ходе микроэволюции флуоресцентных белков.

Ключевые слова: GFP; DsRed, drFP583; кинетика созревания; флуоресцентный таймер; флуоресцентное мечение.

ВВЕДЕНИЕ

Зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein, GFP) из гидроидной медузы *Aequorea victoria* и его мутанты нашли широкое применение в молекулярной и клеточной биологии в качестве прижизненных генетически кодируемых меток [1–5]. Открытие GFP-подобных флуоресцентных белков (ФБ) в кораллах класса Anthozoa значительно расширило диапазон цветов потенциальных маркеров [6–9]. В частности, был клонирован ген красного ФБ drFP583 (коммерческое название DsRed) с максимумами возбуждения и эмиссии при 558 и 583 нм [6]. Кроме красной флуоресценции DsRed обладал небольшим (3–5% интенсивности красного) пиком зеленой флуоресценции с возбуждением при 480 нм и испусканием при 500 нм.

Недавно был описан интересный мутант DsRed, названный E5, который со временем изменяет цвет своей флуоресценции [10]. Этот белок обладал яркой зеленой флуоресценцией на начальных этапах созревания. Затем возникал пик красной флуоресценции, который постепенно нарастал, в то время как интенсивность зеленой эмиссии падала. Таким образом, соотношение интенсивностей зеленой и красной флуоресценции отражало “биологический возраст” белкового образца. Было показано, что E5 может быть использован в качестве флуоресцентного таймера,

который позволяет визуализировать пространственно-временную картину активации и выключения работы целевого генного промотора. Флуоресцентный таймер является принципиально новым инструментом анализа генной экспрессии.

В данной работе мы описали новый красный ФБ из *Zoanthus* sp., который проявляет свойства быстрого флуоресцентного таймера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клонирование кДНК новых флуоресцентных белков

Пытаясь найти новый красный ФБ, мы изучили экземпляр кораллового полипа *Zoanthus* sp., щупальца и ротовой диск которого обладали яркой красной и зеленой флуоресценцией. Суммарная кДНК была синтезирована на основе РНК, выделенной из кусочка одного полипа. В качестве простейшего способа получения кДНК, кодирующих новые ФБ, мы использовали ПЦР с олигонуклеотидными праймерами, соответствующими кДНК zFP506 и zFP538, двух ранее идентифицированных ФБ из другого вида *Zoanthus* [6]. Эти праймеры позволяли амплифицировать полную кодирующую область ФБ и после клонирования получить гетерологично экспрессированные функциональные ФБ в клетках *E. coli*. В случае успеха такой подход позволяет сразу получить новые ФБ в функциональном (флуоресцентном) виде, что значительно упрощает поиск и анализ рекомбинантных клонов.

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

	10	20	30	40	50
GFP	MSKGEELFTGVVPI	LVELDGDVNGHKFS	VSGEGEGDATYGK	LTLKFICTTGKLP	VPT
DsRed	MRSSKNVIKEFMR	FKVRMEGTVNGHE	FEIEGEGEGRPYE	GHNTVTKLKVT	.KGGPLPFAWDI
zoan2RFP	MAHSHKHLTDDMT	MHFRMEGCVDGHK	FVIEGNGNGNPFK	GKQFINLQVI	.EGGPLPFSEDI
zoan2GFP	--L-----F---	KY-----T-H-T-	---A---NV-----		
zFP506	--Q-----TKE---	KY-----T-E-I-Y-	---A---V-----	A---	
zFP538	-----KEE---	KYH-----N-----	T-E-I-Y-----	T-----	
	60	70	80	90	100
GFP	LVTTFYSYGVQCFS	RYPDHMKQHDFFKS	AMPEGYVQERTIF	FKDDGNYKTRAEV	KFEGD..T
DsRed	LSPQFQYGSKVYV	VKHPADIP..DYK	KLSPFEGFKWERV	MNFEDGGVVTVTQ	DSSLQDG..C
zoan2RFP	LSAAFDYGNRLFT	EYPEGIV..DYFK	NSCPAGYTWHRSF	RFEDGAVCICSA	DITVNVRENC
zoan2GFP	--TV-Q---I-----	NS-----H-Q--	LL-----A---	SLS-E-R-	
zFP506	-----N---V---	QD-----D---L-	-----N---	S-E---	
zFP538	---G-K--D-I---	QD-----G---L-	-----NV---	S-K---	
	120	130	140	150	160
GFP	LVNRIELKGI	DFKEDGNILGHK	LEYNYSNHN	VYIMADKQKNGI	KVNFKIRHNI
DsRed	FIYKVKFIGVNF	PPSDGPVM.QKK	TMGWEASTERLY	P..RDGVLKGEI	HKALKLKDGGHYL
zoan2RFP	IYHSTFYGVNFP	ADGPVM.KKMT	TNWEPSCEKI	IPINSQKILKGD	VSMYLLKDGGRYR
zoan2GFP	F---K-N-----	-----VPN-G-	-----S-----	H	
zFP506	M---K-----	-----D-----	-----VPK-G-	-----L-	
zFP538	I--K-I-N-M-----	-----A-----	-----M-VPK-G-	-----	
	180	190	200	210	220
GFP	ADHYQQNTPI	GDGPVLLPDNHYL	STQSALS	KDPNEKR	RDHMLLEFVTA
DsRed	VEFKSIYMAKK..	PVQLPGYVVYVDS	SKLDITSHNEDYT	.IVEQYERTEGR	HNHLFL
zoan2RFP	CQFDTIYKAKTE	.PKEMPDWHFIQ	HKLNREDRSDAK	NQKWQLIEHA	IASRSALP
zoan2GFP	--I-SV---S---	--K---R-----	T-----T-----	K-R-V--L-	
zFP506	-----V---SV.	-RK-----T-----	-----H-T-----	G---	
zFP538	-----V---SV.	-SK--E-----	L-----T-----	FP---A	

Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей GFP, DsRed и флуоресцентных белков из *Zoanthys*. Нумерация остатков соответствует последовательности GFP. В последовательностях zFP506, zFP538 и zoan2GFP прочерками показаны аминокислотные остатки, совпадающие с остатками zoan2RFP. Разрывы, внесенные для выравнивания последовательностей, обозначены точками. Аминокислотные остатки, боковые цепи которых погружены в белковую глобулу [13], показаны на сером фоне. Аминокислотные последовательности GFP, DsRed, zFP506, zFP538, zoan2GFP и zoan2RFP взяты из GenBank M62653, AF168419, AF168422, AF168423, AF482451 и AY059642 соответственно.

Действительно, используя ПЦР с пониженной температурой отжига праймеров, удалось получить целевую кДНК. После клонирования в экспрессионный вектор pQE30 было визуально проверено около 500 рекомбинантных клонов на наличие флуоресценции с использованием флуоресцентного бинокуляра. Среди большинства клонов, проявлявших зеленую флуоресценцию, было найдено несколько красных. Секвенирование вставок нескольких выборочных клонов показало наличие одного зеленого и одного красного ФБ, названных zoan2GFP и zoan2RFP соответственно. Как можно видеть из сравнения аминокислотных последовательностей этих белков с последовательностями GFP, DsRed, zFP506 и zFP538 (рис. 1), все ФБ из *Zoanthus* очевидно являются близкими гомологами (около 80% идентичности).

Спектральные свойства zoan2GFP и zoan2RFP

Зеленый ФБ zoan2GFP обладал спектрами возбуждения-эмиссии с максимумами при 461 и

500 нм соответственно (рис. 2а). По форме спектров этот белок очень похож на zFP506 и EGFP. Судя по полному отсутствию коротковолнового (около 400 нм) пика возбуждения, характерного для GFP дикого типа и соответствующего протонированной форме хромофора, в zoan2GFP весь хромофор находится в депротонированной (анионной) форме, характерной для большинства ФБ из кораллов. Поскольку по спектральным свойствам zoan2GFP практически не отличался от ранее описанного зеленого ФБ zFP506 [6], дальнейшее внимание было сосредоточено на новом красном ФБ.

Полностью созревший (принявший нативную конформацию) zoan2RFP обладал спектрами возбуждения-эмиссии, похожими на спектры DsRed, но с небольшим синим смещением (рис. 2б). Максимум эмиссии приходился на 574 нм, а возбуждения – на 553 нм. В отличие от DsRed в спектре зрелого zoanRFP не наблюдалось пика зеленой флуоресценции.

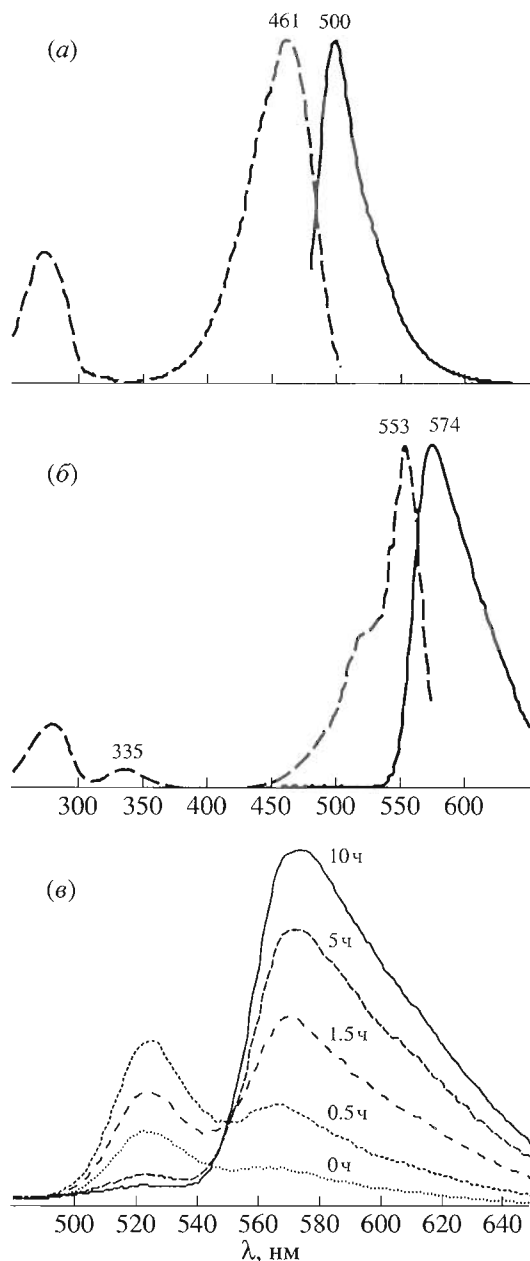


Рис. 2. Спектральные свойства новых ФБ. Спектры возбуждения (пунктирные линии) и эмиссии (сплошные линии) флуоресценции: (а) zoan2GFP; (б) полностью созревшего zoan2RFP. (в) Изменение спектра эмиссии zoan2RFP в ходе созревания (возбуждение при 280 нм). Время измерения показано над кривыми. Нулевой момент времени соответствует первому измерению образца свежевыделенного белка.

В ходе созревания zoan2RFP проходил через состояние, характеризующееся яркой зеленой флуоресценцией. Так, колонии *E. coli*, экспрессирующие этот белок, выглядели зелеными на ранних стадиях роста, затем они становились желтыми (что объясняется наложением зеленого и красного цветов) и только после прекращения роста проявляли чисто красную флуоресценцию.

Сходная динамика флуоресцентных свойств наблюдалась у мутантного белка E5 [10]. Хотя в спектрах природного белка DsRed также присутствует пик эмиссии в зеленой области, интенсивность этой зеленой флуоресценции очень мала [10, 11]. Следовательно, по своим спектральным свойствам zoan2RFP намного ближе к мутантной форме E5, чем к природному DsRed.

Далее мы сравнили кинетику созревания рекомбинантных zoan2RFP и E5, синтезированных в одинаковых условиях. Белки были выделены из ночных культур *E. coli*, инкубированных при 30°C, в условиях, когда процесс созревания ФБ был еще далек от завершения. После этого *in vitro* измеряли динамику изменения спектров флуоресценции образцов выделенных белков.

В начале наблюдения спектр испускания zoan2RFP характеризовался двумя пиками при 524 и 574 нм, причем интенсивность зеленой флуоресценции была значительно больше интенсивности красной (рис. 2в). Далее наблюдалось нарастание интенсивности обоих пиков флуоресценции (рис. 3). Затем пик зеленой эмиссии своей максимальной амплитуды и начинал падать, в то время как пик красной флуоресценции продолжал расти. В конце наблюдения интенсивность красной флуоресценции достигала максимального значения, а интенсивность зеленой снижалась практически до нуля.

Кинетика созревания E5, как это было описано ранее [10], в общих чертах носила тот же характер. Тем не менее можно выделить два существенных различия для zoan2RFP и E5. Во-первых, zoan2RFP созревал значительно быстрее, чем E5 (рис. 3). Например, при 37°C увеличение интенсивности красной флуоресценции от 20 до 80% занимало около 3 ч для zoan2RFP (кривая 2) и около 10 ч для E5 (кривая 4). Также интенсивность зеленой флуоресценции падала со 100 до 50% в течение 40 мин для zoan2RFP (кривая 1) и около 5 ч для E5 (кривая 3). Во-вторых, интенсивность зеленой флуоресценции в процессе созревания zoan2RFP стремилась к нулю, в то время как даже зрелый E5 обладал заметной зеленой эмиссией (7–8% интенсивности красного пика). Два этих различия можно рассматривать как достоинства zoan2RFP при его потенциальном применении в качестве флуоресцентного таймера. В то же время zoan2RFP примерно вдвое уступает E5 в яркости, что является его очевидным недостатком.

В данной работе мы описали два новых GFP-подобных белка из кораллового полипа *Zoanthus*. Всего из этого рода на сегодняшний день известно четыре ФБ: два зеленых (zFP506 [6] и zoan2GFP), один желтый (zFP538 [6]) и один красный, обладающий свойствами флуоресцентного таймера (zoan2RFP). Эти белки являются очень близкими гомологами. Степень идентичности ФБ из *Zoanthus* внутри рода (80% и более) намного

превосходит таковую с известными ФБ из других коралловых полипов (50% и менее), независимо от их цвета флуоресценции. Отсутствие связи между степенью близости аминокислотных последовательностей ФБ и их цветом флуоресценции – это относительно быстрые эволюционные события, постоянно происходящие в ходе микроэволюции видов коралловых полипов. Возможно, природные ФБ со свойствами таймеров можно рассматривать как переходные формы между истинно зелеными и красными ФБ, возникающие в ходе эволюции окраски кораллов.

Важной проблемой белковой химии ФБ является выяснение структурной основы разнообразия их цветов. В частности, особый интерес вызывают аминокислотные остатки, необходимые для появления красной флуоресценции, поскольку красные ФБ имеют большое практическое значение. Ранее [12], на основании сравнения аминокислотных последовательностей известных на тот момент ФБ, мы обратили внимание на остатки Ser68 и Ser/Thr112 (нумерация по GFP) как характерные только для красных ФБ и нефлуоресцентных окрашенных белков с еще большим сдвигом полосы поглощения в красную область. Более того, направленное внесение остатков Ser68 и Ser112 в зеленый ФБ dsFP483 привело к возникновению в спектрах этого белка дополнительных пиков возбуждения-эмиссии в красной области [12]. Также, гипотеза о ключевой роли Ser68 в образовании красного флуорофора была высказана на основании рентгеноструктурного анализа DsRed [13]. Исходя из этих данных, мы ожидали присутствия Ser68 и в новых красных ФБ. Тем не менее zoan2RFP не подтвердил этого правила. Этот белок содержал остатки Asp68 и Ile112, характерные для большинства зеленых ФБ (рис. 1). Возможно, zoan2RFP несет новый вариант красного флуорофора, и какие-либо другие аминокислотные остатки катализируют его формирование.

ФБ, проявляющие свойства флуоресцентного таймера, позволяют различать вновь синтезированный в клетке белок от старого. Благодаря этому они являются уникальным инструментом изучения регуляции промоторов, миграции клеток и динамики белков в живом организме. Мы полагаем, что быстрый таймер zoan2RFP может служить удобным дополнением к E5, поскольку различные процессы протекают с очень разными скоростями.

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).

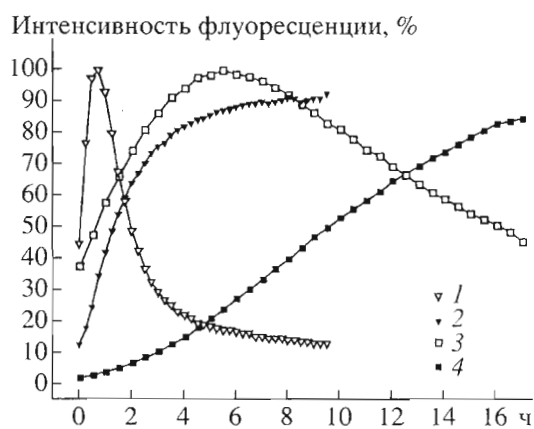


Рис. 3. Временная зависимость изменения интенсивности зеленой (1, 3) и красной (2, 4) флуоресценции в ходе созревания zoan2RFP (1, 2) и мутанта E5 (3, 4) при 37°C. Все данные нормализованы. Нулевой момент времени соответствует первому измерению образца свежесинтезированного белка.

Суммарную РНК выделяли из небольшого кусочка полипа *Zoanthus* sp., используя набор реактивов NucleoSpin RNA II (Clontech). Суммарную кДНК синтезировали и амплифицировали с помощью набора реактивов SMART PCR cDNA Synthesis (Clontech) согласно протоколу производителя. Специфическую кДНК, кодирующую ФБ, амплифицировали в ПЦР с праймерами, соответствующими ранее описанному желтому ФБ из *Zoanthus* sp. zFP538 (прямой праймер 5'GCACGGATCCGCTCATTCAAAGCAGGGT и обратный праймер 5TAGTACTCGAGGTTGGAACATTCCTATCA, сайты узнавания эндонуклеаз рестрикции *Bam*HI и *Xho*I подчеркнуты). Реакционная смесь (25 мкл) для ПЦР содержала 1x буфер для смеси полимераз Advantage KlenTaq (Clontech), смесь четырех dNTP (0.2 мМ каждый), 0.2 мкМ праймеры, 1 нг суммарной кДНК и смесь полимераз Advantage KlenTaq. Амплификацию проводили на приборе PTC-200 (MJ Research) при следующих условиях (режим вычисления истинной температуры образцов): денатурация – 95°C, 10 с, отжиг – 55°C, 20 с, синтез – 72°C, 40 с, 25 циклов. Продукт ПЦР обрабатывали *Bam*HI и *Xho*I и клонировали в экспрессионный вектор pQE30 (Qiagen, США), используя сайты *Bam*HI и *Sal*I. Визуальный отбор флуоресцентных клонов проводили с помощью флуоресцентного бинокля Olympus SZX12. Вставки кДНК из отобранных клонов секвенировали, используя CEQ2000 DNA Analysis System (Beckman, США). Нуклеотидные и соответствующие им аминокислотные последовательности идентифицированных ФБ zoan2GFP и zoan2RFP зарегистрировали в базе данных GenBank (номера AF482451 и AY059642 соответственно).

На N-конце полипептидной цепи полученные рекомбинантные белки имели дополнительную последовательность MRNNNNHGS, которая

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

позволяла быстро очищать эти белки с помощью металлоаффинной хроматографии [14].

Для наработки флуоресцентных белков штаммы *E. coli*, несущие рекомбинантные плазмиды, выращивали при 37°C в объеме 50 мл до оптического поглощения 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 А (20 мМ Трис-НСl, рН 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 А, содержащим 100 мМ EDTA. Степень очистки белков была не менее 90% по данным гель-электрофореза.

Для измерения кинетики созревания ФБ культуры *E. coli* после трансформации плазмидами рассевали на 3–5 чашек Петри и выращивали при 30°C в течение ночи и затем еще несколько часов при 37°C (до появления небольших колоний). Далее клетки смывали 4 мл буфера А и выделяли рекомбинантные белки как описано выше. Полученные образцы незрелых ФБ помещали в кварцевую кювету и оставляли созревать при 37°C, используя термостабируемый держатель в спектрофлуориметре. Спектральные изменения ФБ в ходе созревания фиксировали в автоматическом режиме, измеряя спектр эмиссии через равные промежутки времени.

Спектральные измерения проводили на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Varian). Перед измерениями образцы белков разводили буфером А до концентрации около 50 мкг/мл.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 01-04-49037) и программой физико-химической биологии РАН, а также Фондом содействия отечественной науке.

1. Belmont A.S. // Trends Cell. Biol. 2001. V. 11. P. 250–257.
2. Deo S.K., Daunert S. // Fresenius J. Anal. Chem. 2001. V. 369. P. 258–266.
3. Hanson M.R., Kohler R.H. // J. Exp. Bot. 2001. V. 52. P. 529–539.
4. Toomre D., Manstein D.J. // Trends Cell. Biol. 2001. V. 11. P. 298–303.
5. Wahlfors J., Loimas S., Pasanen T., Hakkarainen T. // Histochem. Cell Biol. 2001. V. 115. P. 59–65.
6. Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zарaisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. // Nat. Biotechnol. 1999. V. 17. P. 969–973.
7. Fradkov A.F., Chen Y., Ding L., Barsova E.V., Matz M.V., Lukyanov S.A. // FEBS Lett. 2000. V. 479. P. 127–130.
8. Lukyanov K.A., Fradkov A.F., Gurskaya N.G., Matz M.V., Labas Y.A., Savitsky A.P., Markelov M.L., Zарaisky A.G., Zhao X., Fang Y., Tan W., Lukyanov S.A. // J. Biol. Chem. 2000. V. 275. P. 25879–25882.
9. Gurskaya N.G., Fradkov A.F., Terskikh A., Matz M.V., Labas Y.A., Martynov V.I., Yanushevich Y.G., Lukyanov K.A., Lukyanov S.A. // FEBS Lett. 2001. V. 507. P. 16–20.
10. Terskikh A., Fradkov A., Ermakova G., Zарaisky 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.
11. Baird G.S., Zacharias D.A., Tsien R.Y. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 11984–11989.
12. Gurskaya N.G., Savitsky A.P., Yanushevich Y.G., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A. // BMC Biochem. 2001. V. 2.
13. Yarbrough D., Wachter R.M., Kallio K., Matz M.V., Remington S.J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 462–467.
14. Hochuli E., Dobeli H., Schacher A. // J. Chromatogr. 1987. V. 411. P. 177–184.

A Natural Fluorescent Protein that Changes Its Fluorescence during Maturation

Yu. G. Yanushevich*, N. G. Gurskaya*, D. B. Staroverov**,
S. A. Lukyanov*, and K. A. Lukyanov**

Phonelfax: +7 (095) 330-7056; e-mail: kluk@ibch.ru

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

** ZAO Evrogen, Moscow

The gene of a new red fluorescent protein zoan2RFP from a coral polyp *Zoanthus* sp., a homologue of the known green fluorescent protein from the *Aequorea victoria* jellyfish, was cloned. At early maturation stages, zoan2RFP exhibits a green fluorescence, which then turns into the red one. A similar phenomenon was recently reported for the E5 mutant of the red fluorescent coral protein DsRed. Zoan2RFP differs from E5 by faster maturation kinetics and the complete disappearance of green fluorescence in the mature protein. Naturally occurring proteins of this type can be considered as intermediate forms between the green and red fluorescent proteins, which are formed during the microevolution of fluorescent proteins. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 4; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: drFP583, DsRed, fluorescent timer, fluorescent labeling, GFP, maturation kinetics