

УДК 577.112.7

ЗЕЛЕНИЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ ПРОТЕЇН ТА ЙОГО АНАЛОГИ

О. П. ДЕМЧЕНКО

Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України, Київ

E-mail: alexdem@ukr.net

Унікальні властивості флуоресцентних протеїнів синтезуватись і спонтанно складатися з утворенням флуоресцентної групи привернули увагу багатьох дослідників, що сприяло створенню нових перспективних технологій у дослідженнях клітини. В огляді аналізуються властивості зеленого флуоресцентного протеїну з *Aequorea Victoria* та низки інших протеїнів зі схожими характеристиками і розглядається застосування їх як внутрішньоклітинних молекулярних міток і сенсорів.

Ключові слова: флуоресцентні протеїни, маркери протеїнового синтезу, мічення клітинних протеїнів, внутрішньоклітинні сенсори.

Присудження Нобелівської премії 2008 року Osamu Shimomura, Martin Chalfie і Roger Tsien стало визнанням важливості унікальних властивостей зеленого флуоресцентного протеїну медузи *Aequorea Victoria* і схожих протеїнів інших морських організмів. Ці протеїни давно стали об'єктами та інструментами досліджень учених, що зумовило низку важливих відкриттів, знахідок, публікацій. Так, на сьогодні в базі даних PubMed на ключове слово «fluorescent protein» є посилання на 151 000 публікацій, а в Google Scholar — майже на 1 млн. друкованих матеріалів, де воно згадується. Спостерігається справжня революція в дослідженнях живої клітини, спричинена використанням цих протеїнів як інструментів досліджень. З різних морських організмів виділяють протеїни різного кольору і за допомогою генно-інженерних модифікацій створюють набір флуоресцентних протеїнів, що охоплює всю видиму область спектра. Широкий фронт досліджень і застосувань не обминає й українську науку. У цьому огляді йдеться передусім про властивості флуоресцентних протеїнів і розглянуто застосування їх як клітинних маркерів та сенсорів.

Властивості зеленого флуоресцентного протеїну

Коли в 1960-х роках японський дослідник Osamu Shimomura вперше виділив і до-

слідив люмінесцентну речовину з медузи *Aequorea Victoria* (рис. 1), він зовсім не передбачав її унікальних властивостей. Ці дослідження розвивалися повільно до тих пір, коли Martin Chalfie вперше застосував цей протеїн у живій клітині як маркер експресії генів [1]. Це стало можливо після того, як було з'ясовано, що утворення флуоресцентного центру в цьому протеїні відбувається спонтанно і без участі інших факторів. Відтоді розпочалися важливі дослідження, до яких долучилися фотохіміки, фізики, клітинні біологи. Що ж собою являє зелений флуоресцентний протеїн (англійська абревіатура GFP)?



Рис. 1. Дрібна медуза *Aequorea Victoria*, використання якої у дослідженнях дало поштовх для розвитку цілої галузі науки і технологій

Цей невеликий протеїн, що складається з 238 амінокислотних залишків (26, 9 kDa), формує структуру з 11 тяжів (β -barrel). Його розмір — 40 Å в довжину і 30 Å у діаметрі (рис. 2). У її середині, сформованій невеликою α -спіральною ділянкою, міститься хромофор, завдяки якому відбувається поглинання світла і флуоресцентне випромінювання. Детальніше з будовою цього протеїну можна ознайомитися в оглядах [2–4]. Як же створюється такий хромофор? Адже з підручників добре відомо, що жодна природна амінокислота не має властивостей поглинати й випромінювати світло у видимій області, і ланцюг, синтезований з таких амінокислот, подібних властивостей мати не може. Проте хромофор може створюватися в хімічній реакції між амінокислотами, що саме й має місце в GFP. Відбувається циклізація й окиснення в сегменті послідовності Ser-Tyr-Gly, що міститься в позиціях 65–67 первинної структури (рис. 3). Схему цих перетворень показано на рис. 4.

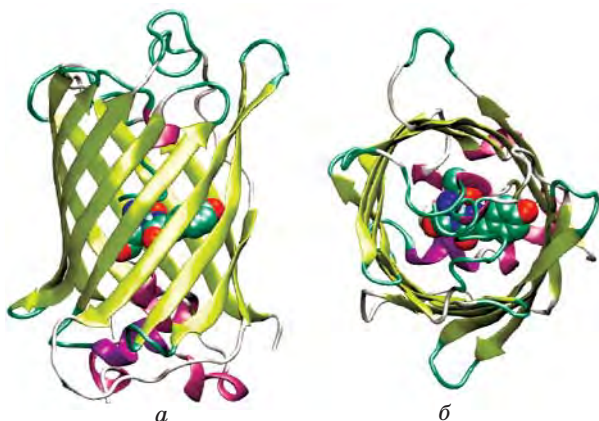


Рис. 2. Тривимірна структура зеленого флуоресцентного протеїну (GFP) у двох проекціях.

Ланцюг з 238 амінокислотних залишків утворює 11 β -структурних тяжів, що складаються в структуру бочки (β -barrel). У її порожнині міститься сегмент α -спіралі, що утворює хромофор, добре захищений від взаємодії з оточенням

Важливим є те, що ані додаткових генів, ані додаткових учасників (ензимів) у цій реакції не потрібно. Синтез хромофору задається амінокислотною послідовністю самого протеїну. З уведенням у клітину його гена здійснюється синтез цієї послідовності на рибосомі і її складання в тривимірну структуру. Далі відбувається спонтанний синтез хромофору і виникає його здатність до флуоресценції. Більше того, ген GFP може бути з'єднаний з геном іншого протеїну і таким чином уведений у клітину. Отже, ми може-

мо не лише контролювати синтез протеїнів у клітині під час уведення чужорідних генів, а й візуалізувати в мікроскопі утворені таким протеїном структури [5].

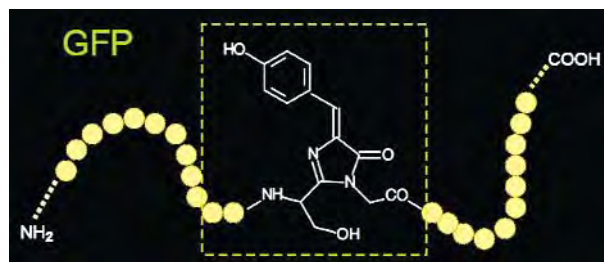


Рис. 3. Поліпептидний ланцюг молекули GFP, де показано структуру хромофору, утворену залишками Ser-Tyr-Gly

Виявилось, що зелений не є єдиним кольором, світло якого можуть випромінювати протеїни цього типу. Зараз одержано багато варіантів GFP. Серед них є голубий (BFP), ціановий (CFP) і жовтий (YFP) протеїни [6]. В останній час флуоресцентні протеїни, подібні до GFP, було одержано з різних морських організмів (*Anthosoa*, *Hydrozoa*, *Copepoda*). Найбільший їх вміст — у коралах (рис. 5).

Оптимізація властивостей цих протеїнів відбувається шляхом генних модифікацій, причому важливі не лише амінокислотні залишки, що формують хромофор, а й ті, що містяться поряд [7]. Суттєвою є β -структурна «діжка», що забезпечує жорстке гідрофобне оточення хромофору (рис. 2). Одержання флуоресцентних протеїнів з різних джерел та їх мутації дозволили одержати флуоресцентні протеїни усіх кольорів веселки (рис. 6). Вони мають різний квантовий вихід флуоресценції — від 0,17 для BFP до 0,79 для дикої форми GFP, але він залежить

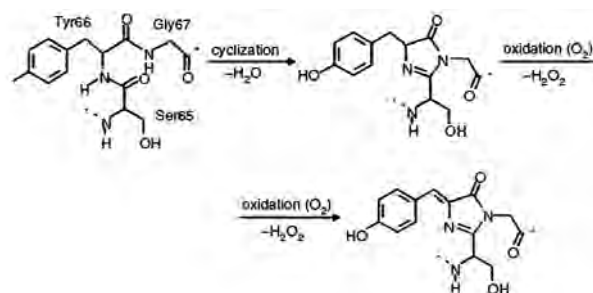


Рис. 4. Схема хімічних перетворень у послідовності Ser-Tyr-Gly, що зумовлює утворення хромофору GFP.

Перший етап — нуклеофільна атака аміногрупи Gly-67 на карбоніл Ser-65. Подальше виключення молекули води веде до утворення імідазолідинового кільця. На другому етапі зв'язок C_{α} - C_{β} в Tyr-66 окиснюється, утворюючи велику делокалізовану π -електронну систему p -гідроксibenзиліденімідазолінону

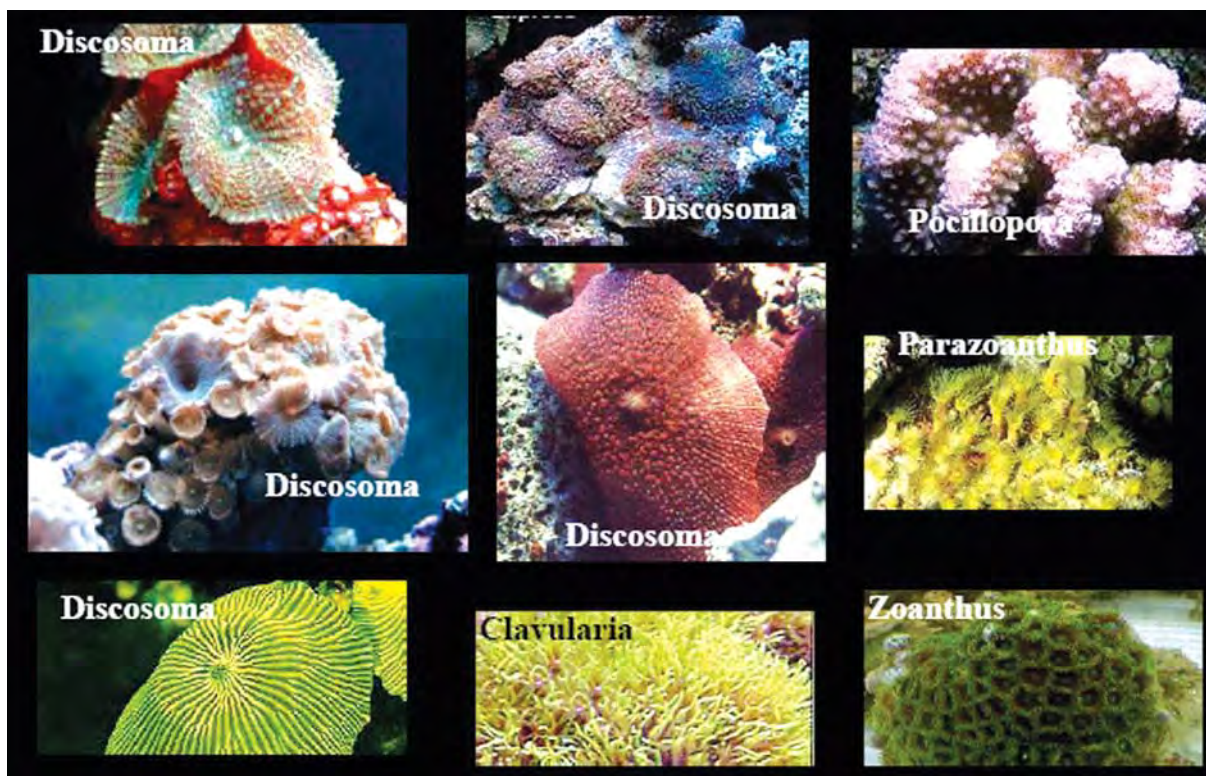


Рис. 5. Фотографії морських організмів (тропічні корали), в яких знайдено флуоресцентні протеїни

від температури, рН, концентрації кисню та інших умов [8]. Властивості цих протеїнів невпинно поліпшуються.

Багатообіцяльним у цьому сенсі є червоний флуоресцентний протеїн із коралів *Anthozoa* (DsRed) завдяки не лише його спектру, істотно зміщеному в довгохвильову область, а й відмінній флоресцентності і незалежності спектрів від рН в діапазоні 5,0–12,0 [9]. Йому притаманні висока молярна абсорбція ($57\,000\text{ м}^{-1}\text{см}^{-1}$) і квантовий вихід 79%, що конкурують із цими показниками для GFP. У разі збудження за довжини хвиль 558–578 нм цей протеїн випромінює при 583–605 нм. Маючи такі властивості, він є цінним маркером у різних дослідженнях з клітинної біології.

Певних зусиль вимагало одержання мономерних форм цих протеїнів, які в природі існують у формі тетрамерів. Це вкрай потрібно для досліджень живої клітини. Так, їх молекулярні гібриди з різними протеїнами використовують для вивчення їхньої локалізації і в дослідженнях міжмолекулярних взаємодій.

Застосування в клітинній біології

Отже, GFP та інші флуоресцентні протеїни дозволяють створювати центри випромінювання флуоресценції безпосередньо в жи-

вій клітині з використанням механізму синтезу протеїну цією клітиною. Більше того, на генетичному рівні можна здійснити приєднання цього протеїну до якогось іншого протеїну, що буде тепер флуоресцентно міченим. На сьогодні це єдині повністю генетично кодовані флуоресцентні маркери, доступні дослідникам. Найчастіше їх застосовують для встановлення структурної близькості протеїнів у різних органелах, а також вивчення взаємодії між розчинними протеїнами чи цих протеїнів з органелами [8]. Віддалена мета цих досліджень — встановити всю карту взаємодії між протеїнами в клітині (так званий інтерактом). Такі дослідження ґрунтуються на ферсторівському резонансному перенесенні енергії (FRET) між хромофорами, тому це вимагає зв'язування з обома компонентами взаємодії різних флуоресцентних протеїнів. Один є донором флуоресценції, а другий — акцептором. Донор поглинає енергію світла і передає її акцептору. Акцептор випромінює на іншій довжині хвилі, ніж донор. Якщо донор і акцептор не перебувають на близькій відстані, то таке перенесення не відбувається. Таким чином, інформацію про близькість розташування двох протеїнів можна одержати зі спектрів флуоресценції зв'язаних з ними флуоресцентних протеїнів, наприклад

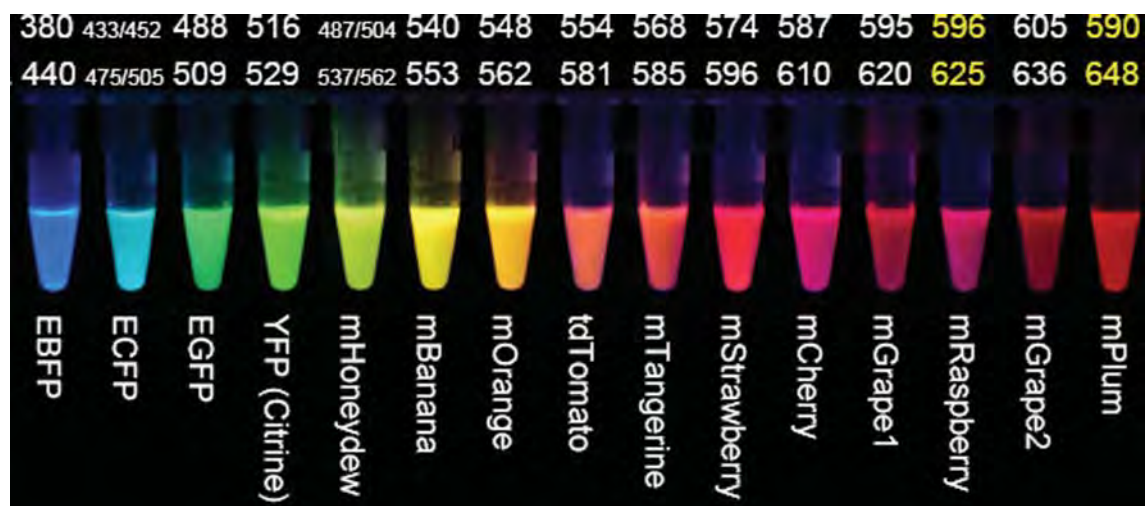


Рис. 6. Флуоресцентні протеїни різного кольору (виділені з різних організмів і мутантні), що доступні у вигляді мономерів.

Цифри означають положення максимуму спектра поглинання (верхній ряд) і флуоресценції (нижній ряд) у нанометрах

GFP і YFP. Інші флуоресцентні протеїни можуть бути використані як донорно-акцепторні пари [6]. Звісно, їхній розмір може перешкоджати міжпротеїновій взаємодії, і це слід враховувати.

Другим за поширеністю є застосування флуоресцентних протеїнів як молекулярних сенсорів для визначення різних речовин у клітині та її органелах. У таких розробках часто також використовують FRET. Так, технічно досить простим є визначення гідролазної активності шляхом з'єднання двох флуоресцентних протеїнів через сегмент, розрив у якому відбувається під час гідролізу (рис. 7, А). Складнішим завданням є визначення низькомолекулярних речовин, зокрема іонів. Розглянемо більш детально як працює один з таких запропонованих сенсорів. Це гібридна молекула, що слугує для визначення іонів кальцію і одержала назву «хамелеон» [10]. Два флуоресцентні протеїни були генетично зшиті між собою через спейсер, який є послідовністю з калмодуліну (кальційзв'язувальний протеїн) і калмодулінзв'язувального пептиду (рис. 7, В). Як відомо, калмодулін радикально змінює свою конфігурацію під час зв'язування іонів Ca^{2+} . Він обгортає пептид так, що відстань між флуоресцентними протеїнами зменшується, і це призводить до перенесення енергії між ними. Зміна кольору випромінювання, що при цьому відбувається, фіксується приладом. У флуоресцентному мікроскопі можна побачити зображення розподілу іонів кальцію в клітині.

Зупинимося на цікавих спробах використати цю методологію для визначення са-

харидів. Відомо, що протеїн з периплазми бактерій, що зв'язує мальтозу (maltose binding protein, MBP) змінює конформацію таким чином, що модифікується взаємна орієнтація доменів і відстань між їхніми окремими ділянками. Приєднання до однієї із цих ділянок (N-кінець) FRET донора, а до іншої (C-кінець) — акцептора уможливує зміну кольору флуоресценції під час зв'язування мальтози завдяки зближенню цих ділянок у разі такого зв'язування. У такий спосіб було показано захоплення мальтози клітинами дріждів [11]. Використовуючи такий підхід, можна визначити глюкозу й рибозу всередині клітин на базі конструкцій, побудованих на відповідних зв'язувальних протеїнах з подальшим вивченням розподілу і динаміки цих речовин.

Наскільки універсальним може бути такий підхід, зараз сказати важко, оскільки значні конформаційні зміни в протеїнах під час зв'язування лігандів — рідкісне явище [12].

Використання флуоресцентних протеїнів для клітинних досліджень має певні обмеження. Вони, зокрема, зумовлені їхнім великим розміром, що створює стеричні перепони при міченні та інтегруванні в структуру клітин. Окрім того, відбувається фотоокиснення їх під дією сильного лазерного променя в конфокальному мікроскопі. Проте саме завдяки їм зроблено значний крок уперед у клітинних дослідженнях з візуалізацією як структур, так і зв'язаних з ними процесів. І відповідні дослідження тривають.

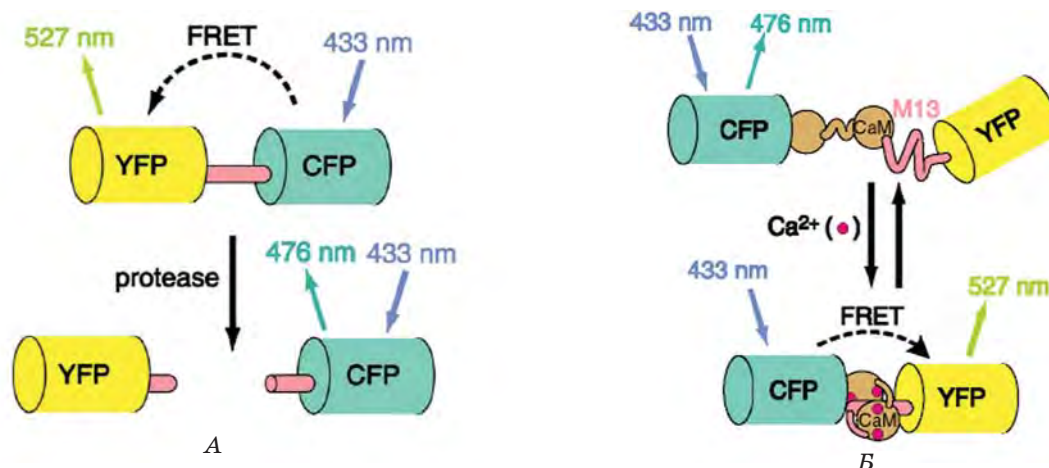


Рис. 7. Використання флуоресцентних протеїнів як клітинних сенсорів:

- А — сенсор активності протеїназ. Флуоресцентні протеїни різного кольору поєднані поліпептидним ланцюгом, що дозволяє спостерігати FRET між ними. Розщеплення цього ланцюга призводить до зникнення FRET з відповідними змінами спектрів;
- Б — сенсор клітинного кальцію, що використовує FRET між флуоресцентними протеїнами різного кольору та зміна його конформації у разі зв'язування цих іонів, що зумовлює появу FRET

Примітка. У роботі використано ілюстрації з Нобелівських лекцій Osamu Shimomura і Roger Tsien.

ЛІТЕРАТУРА

1. Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G. et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression // *Science*. — 1994. — V. 263, N 5148. — P. 802–805.
2. Miyawaki A. Fluorescence imaging of physiological activity in complex systems using GFP-based probes // *Curr. Opin. Neurobiol.* — 2003. — V. 13, N5. — P. 591–596.
3. Miyawaki A., Nagai T., Mizuno H. Engineering fluorescent proteins // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* — 2005. — V. 95. — P. 1–15.
4. Tsien R. Y. The green fluorescent protein // *Ann. Rev. Biochem.* — 1998. — V. 67. — P. 509–544.
5. Tsien R. Y. Building and breeding molecules to spy on cells and tumors // *FEBS Lett.* — 2005. — V. 579, N4. — P. 927–932.
6. Shaner N. C., Campbell R. E., Steinbach P. A. et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Drosophila* sp red fluorescent protein // *Nat. Biotechnol.* — 2004. — V. 22, N12. — P. 1567–1572.
7. Chudakov D. M., Lukyanov S., Lukyanov K. A. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging // *Trends Biotechnol.* — 2005. — V. 23, N12. — P. 605–613.
8. Giepmans B. N. G., Adams S. R., Ellisman M. H. et al. Review — The fluorescent toolbox for assessing protein location and function // *Science*. — 2006. — V. 312, N 5771. — P. 217–224.
9. Shrestha S., Deo S. K. Anthozoa red fluorescent protein in biosensing // *Anal. Bioanal. Chem.* — 2006. — V. 386, N3. — P. 515–524.
10. Miyawaki A., Griesbeck O., Heim R. et al. Dynamic and quantitative Ca^{2+} measurements using improved cameleons // *Proc. Nat. Acad. Sci.* — 1999. — V. 96, N5. — P. 2135–2140.
11. Fehr M., Frommer W. B., Lalonde S. Visualization of maltose uptake in living yeast cells by fluorescent nanosensors // *Ibid.* — 2002. — V. 99, N15. — P. 9846–9851.
12. Yesylevskyy S. O., Kharkyanen V. N., Demchenko A. P. The change of protein intradomain mobility on ligand binding: is it a commonly observed phenomenon? // *Biophys. J.* — 2006. — V. 91, N8. — P. 3002–3013.

**ЗЕЛЕНЬЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНИЙ
ПРОТЕИН И ЕГО АНАЛОГИ**

А. П. Демченко

Институт биохимии им. А. В. Палладина
НАН Украины, Киев

E-mail: alexdem@ukr.net

Уникальные свойства флуоресцентных протеинов синтезироваться и спонтанно складываться с образованием флуоресцентной группы привлекли внимание многих исследователей, что способствовало созданию новых перспективных технологий в исследованиях клетки. В обзоре анализируются свойства зеленого флуоресцентного протеина из *Aequorea Victoria* и ряда других протеинов с подобными характеристиками и рассматривается применение их как внутриклеточных молекулярных меток и сенсоров.

Ключевые слова: флуоресцентные протеины, маркеры синтеза протеина, мечение клеточных протеинов, внутриклеточные сенсоры.

**GREEN FLUORESCENT PROTEIN
AND ITS ANALOGUES**

A. P. Demchenko

Palladin Institute of Biochemistry
of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: alexdem@ukr.net

Unique properties of fluorescent proteins to synthesize and fold spontaneously with formation of the fluorescent groups have attracted attention of many researchers and led to creation of revolutionary new technologies in cell studies. In this review the properties of green fluorescent protein of *Aequorea Victoria* have been analyzed. Presently, many proteins with these unique properties were synthesized, which allows their application as potent intracellular molecular labels and sensors.

Key words: fluorescent proteins, markers of protein synthesis, label of cell proteins, intracellular sensors.